



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Instituto de Química
Campus Araraquara

Síntese, estudos estruturais e biológicos do peptídeo hilina a1 e análogos.

EDSON CRUSCA JUNIOR

Araraquara
2010

EDSON CRUSCA JUNIOR

Síntese, estudos estruturais e biológicos do
peptídeo hilina a1 e análogos.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

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

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

C957s Crusca Junior, Edson
 Síntese, estudos estruturais e biológicos do peptídeo hilina a1 e análogos /
Edson Crusca Junior. – Araraquara : [s.n], 2010
 110 f. : il.

 Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
 Orientador: Eduardo Maffud Cilli
 Co-orientador: Reinaldo Marchetto

 1. Bioquímica. 2. Peptídeos. 3. Ressonância magnética nuclear. 4. Estudos
 estruturais. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

EDSON CRUSCA JUNIOR

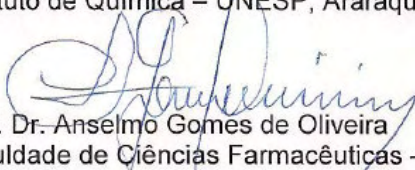
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 24 de fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA



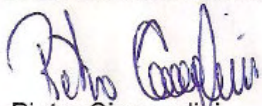
Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Profª Drª Taís Maria Bauab
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Pietro Ciancaglini
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Profª Drª Maria Terêsa Machini de Miranda
Instituto de Química – USP, São Paulo

*A minha esposa Juliana,
Que me ajudou a superar todas as
Dificuldades com paciência, carinho e muito amor.*

*“Quem nada conhece, nada ama.
Quem nada pode fazer, nada compreende.
Quem nada compreende, nada vale.
Mas quem compreende, ama, observa, vê.
Quanto mais conhecimento houver, tanto maior o amor.
Aquele que imagina que todos os frutos amadurecem ao mesmo tempo,
como as cerejas, nada sabe a respeito das uvas”.*

Paracelso

Agradecimentos

Agradeço ao meu pai e a minha mãe (*In Memoriam*) pelos sacrifícios realizados para manter meus estudos que me levaram a realizar esta Tese.

Às minhas irmãs Juliana, Janaína e Jaqueline por permanecerem sempre ao meu lado me incentivando a buscar novos horizontes.

Aos meus cunhados e sobrinhos que juntos tornam nossos momentos familiares muito divertido.

Ao meu orientador, mestre e amigo Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli que me ajudou a completar essa importante etapa da minha vida.

Aos meus queridos sogros Luigi e Regina pelo apoio incondicional as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pelo trabalho de Co-Orientação e companheirismo por todos estes anos.

Aos meus amigos Saulo, Lentilha, Wanessa e Simone que além da amizade e os momentos de descontração que deixaram saudades, me ajudaram a superar momentos difíceis durante minha passagem por Araraquara.

Ao meu melhor amigo e irmão Luis Henrique Freitas de Oliveira que apesar da distância, está sempre presente dando o seu apoio e sábios aconselhamentos, muito obrigado Luisão!!

Ao Prof. Dr. Alberto Spisni e sua esposa Dra. Thelma Pertinhez por terem ampliado ainda mais meus horizontes, me oferecendo a grande oportunidade de trabalhar na *Università degli Studi di Parma*, introduzindo a técnica de RMN na minha formação acadêmica-científica e me propiciar a experiência incrível de vivenciar uma cultura diferente.

A Elena Ferrari e Lorela Franzoni, professoras italianas, que me acolheram e me ajudaram a compreender os costumes e modo de vida dos italianos.

Ao Instituto de Química, em especial a Seção de pós-graduação: Célia, Sandra, Patrícia e Wennia por toda orientação e ajuda com as formalidades e toda a documentação para obter o título de Doutor.

Ao grupo técnico do Departamento de Bioquímica do IQ: Fátima, Zilda, Fernando, Valdenir e Tarciso pela imprescindível assistência aos laboratórios de pesquisa.

A Prof. Dra. Mariana S. Castro pela colaboração de sucesso com o nosso grupo nos fornecendo informações importantes para executar este projeto.

Aos órgãos financiadores deste projeto: FAPESP (projeto de pesquisa), CNPq (bolsa de estudo) e CAPES (bolsa do programa de doutoramento no exterior – PDÉE).

E antes de tudo, a Deus.

"O impossível não existe quando se acredita verdadeiramente nos sonhos".

(Ayrton Senna)

Resumo

A existência de cepas resistentes aos antibióticos tradicionais aumenta a necessidade do desenvolvimento e estudo de novas drogas. Um grupo destas moléculas é o dos peptídeos antimicrobianos (PAMs). A ação dos PAMs é atribuída à formação de poros na membrana, aumentando sua permeabilidade e levando a morte celular. Somado aos estudos visando à elucidação dos mecanismos de ação dos PAMs, outros vêm sendo conduzidos para avaliar a importância de cada região da sequência em sua atividade biológica. Esta tese apresentou os estudos estruturais e biológicos de um peptídeo bioativo, proveniente da secreção cutânea da rã *Hypsiboas albopunctatus*, nomeado hilina a1 (Hy-a1) (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂). O peptídeo hy-a1 é um peptídeo bioativo proveniente da secreção cutânea da rã *Hypsiboas albopunctatus*. Esta molécula mostrou atividade contra diversos tipos celulares, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, além de capacidade hemolítica. Este trabalho avaliamos a importância da carga e da estrutura da região N-terminal deste peptídeo. Para isto o peptídeo hy-a1, 4 análogos contendo o Trp substituindo a Leu na posição 6 e com modificações em sua extremidade N-terminal ([Trp⁶]hy-a1, Acetil-[Trp⁶]hy-a1, Lys-[Trp⁶]hy-a1 e Asp-[Trp⁶]hy-a1), e outros 2 análogos contendo alterações pontuais no meio da cadeia, foram manualmente sintetizados por meio da técnica de síntese de peptídeo em fase sólida. Os resultados obtidos demonstram que a síntese, por meio do protocolo Fmoc/tBu, utilizado na síntese dos peptídeos deste trabalho, foi viável. O processo de purificação dos materiais brutos obtidos por meio de HPLC também se mostrou eficiente e viabilizou a obtenção do material com índice de pureza superior a 95%. As atividades biológicas dos peptídeos obtidos foram determinadas por meio da análise da capacidade antibacteriana, antifúngica e hemolítica. Os resultados demonstraram que: 1) a maioria dos peptídeos possuem atividade em escala μmol/L, mas com CIMs diferentes para os diferentes sistemas biológicos testados; 2) a alteração da carga da extremidade N-terminal afeta não só a atividade do peptídeo, mas também sua especificidade. A ausência de carga positiva no grupo N-terminal, torna os peptídeos ineficientes para bactérias Gram-negativas; 3) modificações pontuais no meio da cadeia podem tornar os peptídeos menos tóxicos (baixa atividade hemolítica), mantendo em parte a atividade contra bactérias Gram-negativas e fungos. Conjuntamente, os dados obtidos mostraram que a carga da extremidade N-terminal afeta diretamente a especificidade e atividade biológica dos peptídeos, quanto mais carregada positivamente esta região, maior e mais ampla é sua atividade. Adicionalmente, estudos estruturais dos peptídeos frente à presença de um indutor de estrutura e miméticos de membranas (micelas de LPC e α -DPC e LUVs contendo esfingomielina), utilizando técnicas de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear, também foram realizados. A análise dos dados obtidos demonstrou que os peptídeos possuem diferentes capacidades em adotar a hélice alfa e de interagir com os modelos utilizados. No entanto, não foi possível correlacionar diretamente o teor de estruturação global obtido por dicroísmo circular, ou os outros parâmetros físico-químicos avaliados, tidos na bibliografia como fundamentais no mecanismo de ação dos PAMs, tais como anfipaticidade, número de cargas do peptídeo, e hidrofobicidade, com as variações das atividades biológicas das diferentes sequências estudadas. Este resultado mostrou a necessidade de avaliar a contribuição de cada um destes parâmetros na atividade biológica, por meio do desenvolvimento de uma equação matemática. Os resultados obtidos por RMN, no entanto, mostraram, que a estruturação da região N-terminal desempenhou um papel importante nos processos de interação e formação de poros nas membranas.

Abstract

The presence of microorganisms that are resistant to conventional antibiotics, has led to the search of new drugs. One group of these molecules is the antimicrobial peptides (AMPs). The AMPs make the bacterial membrane permeable, which increases its permeability leading to cell death. Several studies towards the mechanism of action are being performed, as well as studies to analyze the importance of each region of the peptide sequence in its function. In this work, we present the structural and biological studies of a bioactive peptide, which was first isolated from the skin secretion of the frog *Hypsiboas albopunctatus*, named hylin a1 (Hy-a1) (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂). The bioactive peptide hy-a1 has shown activity against several kind of microorganism, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungus, moreover presents hemolytic activity. In the present work we evaluated the importance of the charge and the structure of the N-terminal region of this peptide. In this manner, the original peptide hy-a1, 4 analogues containing a Trp substituted for Leu at position 6 with modifications at the N-terminal ([Trp⁶]hy-a1, Acetil-[Trp⁶]hy-a1, Lys-[Trp⁶]hy-a1 and Asp-[Trp⁶]hy-a1), and 2 others analogues containing modifications in the middle of the chain, were manually synthesized by solid phase peptide synthesis. The results demonstrated that the Fmoc/tBu synthesis protocol was viable. The purification process of the crude peptides by HPLC also was efficient and allowed to obtain peptide. The biological activity of the peptides was assayed by the antibacterial, antifungal and hemolytic activities. The results demonstrated that: 1) the greater number of the peptides presented activity at a concentration of $\mu\text{mol/L}$, but with different minimal inhibitory concentration (MICs) for differ microorganism; 2) modifications on the N-terminus charge affect the activity and the specificity. The absence of a positive charge in the N-terminal group generates peptides which are inefficient towards Gram positive bacteria; 3) modifications in the middle of the chain may generate less toxic peptides (low hemolytic activity), but with partial activity against Gram negative bacteria and fungus. Altogether, these data show that the charge of the N-terminal region directly affects the specificity and the biological activity of the peptides, as higher the positivity as bigger the activity. In addition, structural studies of the peptides was realized in the presence of a TFE and mimetic membranes (LPC and d_{38} -DPC micelles and LUVs containing sphigomielins) using techniques such as circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy and nuclear magnetic resonance. The data showed that the different peptides have different capability to adopt alpha helix and to interact with the models tested. However, no direct correlation between the global structure obtained by CD or other physical-chemical parameters, such as amphipaticity, total charge and hidrophobicity, was obtained with the biological activity of the different sequences studied. These results reveal the need to evaluate the contribution of each of these parameters on the biological activity through the development of a math equation. The NMR results suggest that the structure of the N-terminal region play an important role in the interaction process and the pore formation in the membranes.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação do modelo forma de barril como mecanismo de permeabilização de membranas. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente.	3
Figura 2. Representação do modelo tipo carpete como mecanismo de permeabilização de membranas. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente.	4
Figura 3. Representação do modelo poro toroidal como mecanismo de permeabilização de membranas. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente. Em amarelo está ressaltada a cabeça polar dos lipídios participante do poro.....	5
Figura 4. Fotografia da espécie de rã <i>Hypsiboas albopunctatus</i> , comumente encontrada na região do cerrado. Ao lado secção transversal da pele dorsal de uma espécie de rã, demonstrando a epiderme (E), a glândula granulosa (G) e a glândula mucosa (M) (Nascimento, 2007).	6
Figura 5. Estratégias empregadas na síntese de peptídeos em fase sólida.....	8
Figura 6. Diagrama de Jablonski. As energias necessárias para a excitação são representadas na figura por $h\nu_A$, a energia resultante da fluorescência é dada por $h\nu_F$ e a energia resultante do processo de fosforescência, $h\nu_P$. Modificado de Lakowicz, 1983.....	10
Figura 7. Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos ϕ e Ψ	11
Figura 8. Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (a) hélice alfa, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica (Greenfield; Fasman, 1969).....	12
Figura 9. Espectros de ^1H RMN: à esquerda, obtido na década de 50, da ribonuclease a 40 MHz e à direita, mais recentemente, o espectro da lisozima obtido a 750 MHz.	13
Figura 10. Esquema de padrões de NOEs (representados por flechas) observados para estruturas em fita- β antiparalela (β), paralela (β_p) e hélice alfa (WÜTHRICH, 1986).	15
Figura 11. Protocolo de síntese utilizado na obtenção dos peptídeos.....	19
Figura 12. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Hy-a1 bruto (a) e fração purificada (b), com 89% e 97% de pureza, respectivamente.	30
Figura 13. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo [Trp6]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. [Trp6]hy-a1 bruto (a) e fração purificada (b), com 89% e 97% de pureza, respectivamente.	30
Figura 14. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Acetil-[Trp6]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Acetil-[Trp6]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 87% e 96% de pureza, respectivamente.	31
Figura 15. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Lys-[Trp6]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Lys-[Trp6]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 76% e 98% de pureza, respectivamente.	32
Figura 16. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Asp-[Trp6]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de	

1,5 mL e detecção em 220 nm. Asp-[Trp6]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 80% e 98% de pureza, respectivamente.	32
Figura 17. Espectro de massas do peptídeo purificado hy-a1.....	33
Figura 18. Espectro de massas do peptídeo purificado [Trp6]hy-a1.	34
Figura 19. Espectro de massas do peptídeo purificado Acetil-[Trp6]hy-a1.	34
Figura 20. Espectro de massas do peptídeo purificado Lys-[Trp6]hy-a1.	35
Figura 21. Espectro de massas do peptídeo purificado Asp-[Trp6]hy-a1.....	35
Figura 22. Aminograma obtido da análise de um padrão contendo 17 aminoácidos, com coluna de troca iônica acoplada a um detector de fluorescência (exc: 350 nm e emiss: 450 nm) com o método de derivatização pós-coluna (OPA).....	36
Figura 23. Aminograma obtido da análise de aminoácido do peptídeo hy-a1. Analisador de aminoácidos, com coluna de troca iônica acoplado a um detector de fluorescência (exc: 350 nm e emiss: 450 nm) com o método de derivatização pós-coluna (OPA).	37
Figura 24. Cromatogramas obtidos por HPLC fase-reversa do hy-a1 e dos peptídeos análogos. As condições de análise foram: coluna de C18 (150 mm x 4,5 mm; tamanho de partícula 5 µm e dimensão de poro 300 Å). Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN, 5-95% de solvente B em 30 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. Sequência de eluição: Lys-[Trp6]hy-a1 (1), [Trp6]hy-a1 (2), Asp-[Trp6]hy-a1 (3) e Acetil-[Trp6]hy-a1 (4).	37
Figura 25. Espectros de CD para os peptídeos análogos. Os espectros foram obtidos em solução aquosa (a), na presença de TFE 60% (v/v) (b). A concentração peptídica foi de 80 µmol/L para todos os experimentos.	41
Figura 26. Espectros de CD para os peptídeos análogos. Os espectros foram obtidos na presença de 10 mmol/L LPC. A concentração peptídica foi de 80 µmol/L para todos os experimentos.	41
Figura 27. Variação do comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência dos peptídeos em função da concentração de vesículas de SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) em tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10 µmol/L.....	43
Figura 28. Gráfico da relação de Stern-Volmer obtidos nos ensaios de supressão de fluorescência, variando a concentração de acrilamida para os peptídeos [Trp6]hy-a1 (■ e □), Acetil-[Trp ⁶]hy-a1 (▼ e ▽), Lys-[Trp ⁶]hy-a1 (▲ e △) e Asp-[Trp ⁶]hy-a1 (● e ○). Os símbolos em preto e em branco indicam a presença e a ausência de vesículas, respectivamente. As concentrações de peptídeos e vesículas utilizadas foram de 10 µmol/L e 1 mmol/L, respectivamente.....	45
Figura 29. <i>Helical wheel</i> do peptídeo [Trp6,Lys13]hy-a1, destacando a alteração realizada na face apolar da α-hélice anfipática.	48
Figura 30. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo endo-Pro7a[Trp14]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Endo-Pro7a[Trp14]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 85% e 98% de pureza, respectivamente.	49
Figura 31. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo [Trp6,Lys13]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação em HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H ₂ O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. [Trp6,Lys13]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 85% e 98% de pureza, respectivamente.	50
Figura 32. Espectro de massas do peptídeo purificado endo-Pro7a[Trp14]hy-a1.	50
Figura 33. Espectro de massas do peptídeo purificado [Trp6,Lys13]hy-a1.	50

Figura 34. Espectros de CD para os peptídeos [Trp6]hy-a1 (—), endo-Pro7a[Trp14]hy-a1 (—) e [Trp6,Lys13]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos em solução aquosa (a), na presença de TFE 60% (v/v) (b). A concentração peptídica foi de 80 µmol/L para todos os experimentos.	53
Figura 35. Espectros de CD para os peptídeos [Trp6]hy-a1 (—), endo-Pro7a[Trp14]hy-a1 (—) e [Trp6,Lys13]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos na presença de 10 mmol/L d38-DPC. A concentração peptídica foi de 80 µmol/L para todos os experimentos.	54
Figura 36. Espectros de CD para os peptídeos [Trp6]hy-a1 (—), endo-Pro7a[Trp14]hy-a1 (—) e [Trp6,Lys13]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos em solução tampão Tris.HCl 0,01 mmol/L pH 7,4 (a) e na presença de 0,8 mmol/L de vesículas SM/PA/PC (b). A concentração peptídica foi de 80 µmol/L para todos os experimentos.	55
Figura 37. Gráfico da cinética da liberação CF (%) de vesículas de SM/PA/PC após a adição de 4 µmol/L de peptídeo [Trp6]hy-a1 (—), endo-Pro7a[Trp14]hy-a1 (—) e [Trp6,Lys13]hy-a1 (—). A porcentagem de liberação de CF foi calculada de acordo com a equação descrita no item 3.7.2. Os experimentos foram realizados em triplicatas a 25 °C utilizando um sistema de controlador de temperatura Peltier.	56
Figura 38. Ilustração da transferência de magnetização que ocorre nos experimentos 1H COSY e TOCSY. Os átomos em vermelho são os núcleos que serão observados e os átomos em verdes, estão envolvidos na transferência de magnetização, mas não são observados no espectro final (http://www.nanuc.ca/research/pulse.php).	59
Figura 39. Ilustração da transferência de magnetização que ocorre nos experimentos 1H NOESY. Os átomos em vermelho são os núcleos que serão observados (http://www.nanuc.ca/research/pulse.php).	59
Figura 40. <i>Chemical Shift Index</i> para os átomos de H α dos peptídeos análogos [Trp6]hy-a1 (a), [Trp6,Lys13]hy-a1 (b) e endo-Pro7a[Trp14]hy-a1 (c).	60
Figura 41. Estrutura tridimensional do [Trp6]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do <i>backbone</i> e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).	62
Figura 42. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo [Trp6]hy-a1.	63
Figura 43. Estrutura tridimensional do [Trp6,Lys13]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do <i>backbone</i> e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).	65
Figura 44. Seção do plano 1H-1H do espectro 2D NOESY 250 ms de 1 mmol/L do peptídeo [Trp6,Lys13]hy-a1 em solução aquosa, 5% D ₂ O, 100 mmol/L de d38-DPC pH 5,02 e 37 °C. Os sinais do espectro correspondem ao acoplamento HC-HN da cadeia lateral do triptofano na forma <i>trans</i> (mais intenso) e na forma <i>cis</i> (menos intenso).	66
Figura 45. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo [Trp6,Lys13]hy-a1.	66
Figura 46. Estrutura tridimensional do endo-Pro7a[Trp14]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do <i>backbone</i> e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).	68
Figura 47. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo endo-Pro7a[Trp14]hy-a1.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de peptídeos antimicrobianos e suas atividades biológicas.....	3
Tabela 2. Sequências do peptídeo nativo hy-a1 e dos análogos estudados neste projeto.	17
Tabela 3. Sequência de aminoácidos e algumas características dos peptídeos.....	29
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIMs) contra microrganismos e concentração necessária para produzir 50% de hemólise em eritrócitos humanos (HC ₅₀).....	40
Tabela 5. Comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência do Trp e valores de K _{SV} para os peptídeos análogos na concentração de 10 µmol/L em tampão Tris ou na presença de mmol/L de SM/PA/PC em pH 7,4 a 25 °C.....	44
Tabela 6. Sequência de aminoácidos e algumas características dos peptídeos.....	47
Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIMs) contra microrganismos e concentração necessária para produzir 50% de hemólise em eritrócitos humanos (HC ₅₀).....	52
Tabela 8. Emissão máxima de fluorescência do Trp e valores de K _{SV} para os peptídeos análogos na concentração de 10 µmol/L em pH 7,4 a 25 °C.....	57
Tabela 9. Restrições e estatísticas da estrutura de 20 estruturas em solução do peptídeo [Trp ⁶]hy-a1 em 100 mmol/L d ₃₈ -DPC a 37° C em pH 5,18.	64

Lista de Abreviaturas

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

Boc	<i>t</i> -butoxicarbonila
CD	Dicroísmo Circular
CF	carboxifluoresceína
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
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-fluorenilmetiloxicarboxila
HBTU	<i>o</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico
HC₅₀	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
SM	Esfingomielina
TFA	ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol

TIS	triisopropilsilano
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Luz ultravioleta e visível
WT	<i>Wild Type</i> , peptídeo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	2
1.1.1. <i>Hilina aI</i>	6
1.2. Síntese de peptídeos em fase sólida - SPFS.....	7
1.3. Espectroscopia de Fluorescência.....	9
1.4. Dicroísmo Circular.....	10
1.5. Ressonância Magnética Nuclear.....	12
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Síntese dos peptídeos.....	18
3.2. Purificação dos peptídeos.....	20
3.3. Análise de aminoácidos.....	20
3.4. Espectrometria de massas.....	21
3.5. Atividade Biológica.....	21
3.5.1. <i>Testes de atividade antibacteriana</i>	21
3.5.2. <i>Testes de atividade antifúngica</i>	22
3.5.3. <i>Testes de atividade hemolítica</i>	23
3.6. Espectroscopia de fluorescência.....	23
3.6.1. <i>Interação com Miméticos de Membrana</i>	23
3.6.2. <i>Estudos de permeabilização</i>	24
3.6.3. <i>Estudos de Supressão de Fluorescência</i>	25
3.7. Dicroísmo Circular.....	25
3.8. Ressonância Magnética Nuclear.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Capítulo I.....	28
4.2. Capítulo II.....	47
5. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Em 1929, Sir Alexander Fleming, médico e bacteriologista escocês, deixou uma placa de Petri descoberta contendo bactérias estafilococos e, quando retornou, percebeu que havia desenvolvido na placa uma espécie de fungo. Após um exame mais aprofundado, Fleming observou que a área ao redor do fungo não apresentou crescimento bacteriano. Este fungo foi nomeado como *Penicillium* e o produto químico produzido por ele de penicilina. Por esta descoberta histórica e pelos avanços obtidos no isolamento e produção da penicilina, Fleming e colaboradores foram agraciados com a entrega do Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1945. Durante a II Guerra Mundial, a penicilina foi largamente utilizada, estimulando ainda mais a busca de outros agentes químicos antibióticos.

No final da década de 40 e durante os anos 50, antibióticos como a estreptomicina, o cloranfenicol e a tetraciclina foram introduzidos no mercado. A descoberta de novas moléculas e o aumento no consumo desta classe de medicamentos prosseguiu pelas décadas seguintes até que nos anos 80 e 90, os cientistas passaram a investigar formas de melhoria destas moléculas, tornando-as mais ativas e com menor efeito colateral.

Setenta anos depois da descoberta de Fleming, foi publicado pelo Comitê Britânico, *Medical Advisory Committee*, o Relatório Permanente *The Path of Least Resistance*, (1998) que relatou: "Nos últimos anos do século, há uma sensação desconfortável de que os microrganismos estão ficando à frente e que as opções terapêuticas estão diminuindo". Este problema está associado à resistência das bactérias as drogas, que por sua vez está relacionada principalmente ao uso indiscriminado e não criterioso dos antibióticos (PARISIEN et al., 2008; DONADIO et al., 2002a; DONADIO et al. 2002b). Isto vem sendo evidenciado pela predominância de cepas que são tratadas de forma eficaz apenas por meio da associação de drogas antimicrobianas, como é o caso do *Mycobacterium tuberculosis* causador da tuberculose, doença que infecta e mata milhões de pessoas no mundo. De acordo com dados estatísticos, de 2000 a 2004, 20% dos casos de tuberculose foram resistentes aos tratamentos convencionais e 2% resistentes a medicamentos considerados de segunda linha (WRIGHT et al., 2006). Outras espécies *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.* e *Streptococcus sp.* entre outras, também estão apresentando resistência aos antibióticos tradicionais. Assim sendo, há

urgente necessidade do desenvolvimento de novas drogas contra esses microorganismos (WOODFORD; SUNDSFJORD, 2005). Neste contexto, um dos campos que mais crescem é a procura e aplicação de novas drogas, particularmente os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (CUDIC; OTVOS, 2002; AUVYNET, C.; ROSENSTEIN, 2009).

1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Os PAMs são encontrados em muitos organismos, que vão desde insetos a mamíferos, e são produzidos pelo sistema imune com a finalidade de defesa contra o ataque e a invasão de microrganismos. Estes peptídeos possuem um grande espectro de ação contra bactérias, fungos, leveduras e protozoários e, em alguns casos, apresentam outras atividades biológicas, agindo como antivirais e antitumorais (HANCOCK; DIAMOND, 2000; WANG; WANG, 2004; WANG; LI; WANG, 2009). Na tabela 1 estão representados alguns PAMs e suas diferentes atividades.

O grupo dos PAMs que apresentam estrutura linear e hélice alfa anfipática são moléculas pequenas de até 5 kDa, possuem de 8 a 50 resíduos de aminoácidos e apresentam natureza catiônica, devido à presença de dois ou mais resíduos de arginina e/ou lisina. Outra característica, é a presença de uma sequência primária constituída por cerca de cinquenta por cento de resíduos hidrofóbicos, formando uma hélice alfa de caráter anfipática (CASTRO et al., 2009; HUANG, 2006; ANDREU; RIVAS, 1998). Estas propriedades estão diretamente relacionadas ao modo de ação dos PAMs, que agem por meio da formação de poros na membrana, aumentando sua permeabilidade (SHAI, 1995; TOKE, 2005) e causando rapidamente a morte celular.

Tabela 1. Exemplos de peptídeos antimicrobianos e suas atividades biológicas.

Atividade	Exemplos
Antibacteriana	Defensinas, indolicidina, protegrina e LL-37
Antifúngica	Protegrina, indolicidina e histatinas
Antiendotoxinas	LL-37
Antiviral	Defensinas, indolicidina, protegrina
Antitumoral	Defensinas e indolicidina
Cicatrizante	Defensinas e PR39
Antiparasitária	Defensinas e indolicidina

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a formação de poros pelos PAMs, sendo os 3 mais aceitos: (i) forma de barril (“barrel-stave”), (ii) tipo carpete (“carpet like”) e (iii) poro toroidal (“toroidal pore”) (SHAI, 1999; SENGUPTA et al., 2008).

O modelo conhecido como “barrel-stave” descreve a formação de poros ou canais intramembranares na forma de barril, onde cada aduela pode ser representada por uma cadeia peptídica na forma de uma hélice alfa (“ α -helix”) anfipática (figura 1). Neste modelo, a face hidrofóbica do peptídeo interage com a cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a superfície hidrofílica permanece com a face voltada para o interior, formando um poro orientado perpendicularmente a cadeia hidrocarbonada dos fosfolipídios.

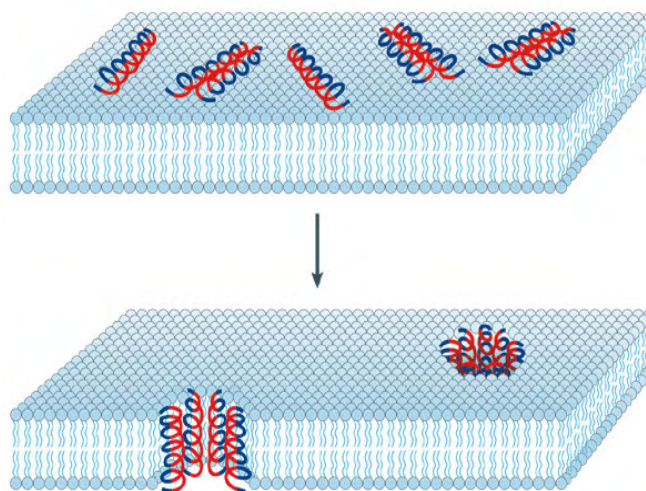


Figura 1. Representação do modelo forma de barril como mecanismo de permeabilização de membrana. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente.

O mecanismo denominado “carpet-like” propõe a permeabilização da membrana por meio da ação detergente dos peptídeos. Assim, a partir de uma determinada concentração de peptídeos na superfície da membrana (sugerindo a forma de carpete) ocorre a formação de

agregados micelares, iniciando o processo de permeabilização (figura 2). O mecanismo é desencadeado sob duas condições: a) se toda a superfície da membrana estiver preenchida com monômeros de peptídeos; ou b) se houver uma alta concentração local do complexo peptídeo-membrana.

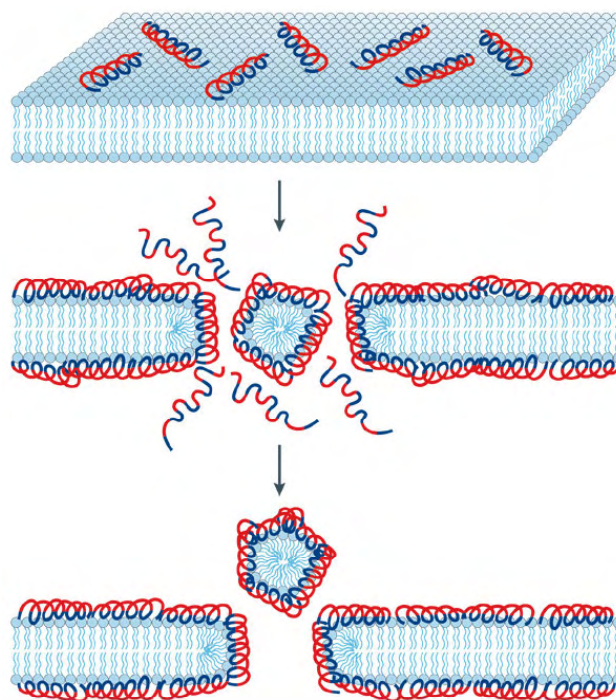


Figura 2. Representação do modelo tipo tapete como mecanismo de permeabilização de membrana. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente.

No terceiro modelo proposto, os peptídeos promovem a formação de poros por meio de um mecanismo nomeado como “toroidal pore”. Este modelo propõe que os peptídeos permaneçam associados com as cabeças dos fosfolipídios, induzindo uma curvatura na bicamada lipídica, formando o poro. Este modelo difere do “barrel-stave”, pois além dos peptídeos, as cabeças polares dos lipídios constituem o interior polar do poro formado (figura 3).

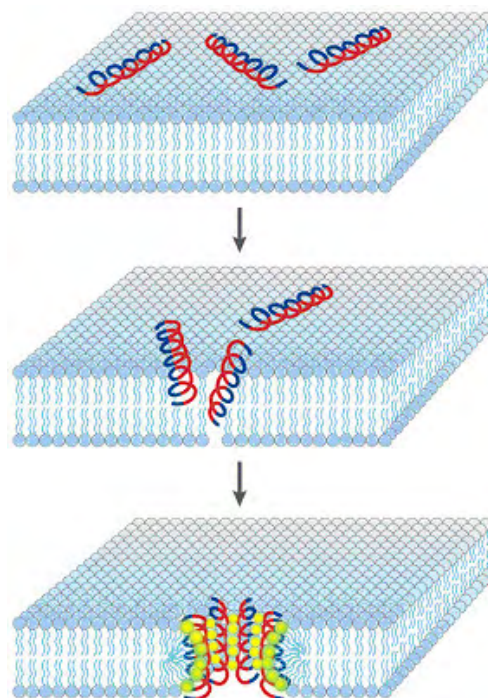


Figura 3. Representação do modelo poro toroidal como mecanismo de permeabilização de membrana. As regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos peptídeos estão coloridas em azul e em vermelho, respectivamente. Em amarelo está ressaltada a cabeça polar dos lipídios participante do poro.

Somado aos estudos visando à elucidação em detalhes dos mecanismos de ação dos PAMs, outros vêm sendo conduzidos para avaliar a importância de cada região e/ou resíduos em sua atividade biológica. Entre os estudos realizados, podemos citar a modificação da região C-terminal, que promove uma perturbação da estrutura anfipática do peptídeo e na sua capacidade de alterar a membrana plasmática (SFORÇA et al., 2004; SFORÇA et al., 2005; MACHADO ET AL., 2007). Somando a este, outros trabalhos mostraram que a substituição de L- por D-aminoácidos (CHEN et al., 2005; HONG et al., 1999) e de aminoácidos apolares por carregados positivamente, na face apolar da hélice alfa anfipática acarretam uma diminuição da hidrofobicidade e anfipaticidade do peptídeo, aumentando o índice terapêutico (PAL et al., 2005). Nestes estudos, Chen e colaboradores (2005) demonstraram que quanto maior a anfipaticidade, hidrofobicidade e heliticidade maior a toxicidade medida pela atividade hemolítica. Em contraste, a atividade antimicrobiana foi menos dependente destes fatores. Adicionalmente, experimentos de truncamento do C-terminal da dermaseptina S4 combinada com a adição de uma carga positiva na região N-terminal resultou em uma baixa atividade hemolítica (SHALEV; MOR; KUSTANOVICH, 2002), enquanto que a remoção dos 5 primeiros resíduos de aminoácidos da região N-terminal, promoveu a inatividade total

do peptídeo (ZAIRI et al., 2008). Apesar destes estudos, a importância da região N-terminal ainda é um tema em aberto, necessitando de estudos mais aprofundados.

1.1.1. *Hilina a1*

O Grupo de Pesquisa em Toxinologia da Universidade de Brasília, coordenado pela Prof^a Dr^a Mariana S. Castro tem trabalhado com princípios ativos de origem animal, particularmente da secreção cutânea de anfíbios. Uma das rãs estudadas é a *Hypsiboas albopunctatus* (FAIVOVICH et al., 2005) pertencente à biota do cerrado (figura 4). Embora o gênero *Hyla* seja representativo mundialmente, poucos trabalhos foram publicados contendo peptídeos desta espécie (MASTROMEI et al., 1991; PRATES et al., 2004; CASTRO et al., 2005). Este grupo em colaboração com o nosso, isolou, identificou e caracterizou um peptídeo bioativo a partir da secreção cutânea da rã *Hypsiboas albopunctatus*, nomeado hy-a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂). Esta molécula mostrou atividade contra diversos tipos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e eritrócitos (CASTRO et al., 2009).



Figura 4. Fotografia da espécie de rã *Hypsiboas albopunctatus*, comumente encontrada na região do cerrado. Ao lado secção transversal da pele dorsal de uma espécie de rã, demonstrando a epiderme (E), a glândula granulosa (G) e a glândula mucosa (M) (Nascimento, 2007).

A estrutura primária deste peptídeo assemelha-se a de outros peptídeos da classe das *bombininas*, os quais possuem atividades antibacterianas (MANGONI, 2006). De acordo com estudos de dicroísmo circular e de predição de estrutura secundária, esta molécula apresenta alto teor de hélice alfa com caráter anfipático (CASTRO et al., 2009). Desta maneira, um estudo mais detalhado da estrutura e função deste peptídeo pode propiciar resultados interessantes sobre seu modo de ação, bem como na elucidação do processo de formação de poro dos PAMs.

1.2. Síntese de peptídeos em fase sólida - SPFS

O grande interesse pelos PAMs levou à necessidade de sintetizar estas moléculas e análogos (derivados com modificações pontuais), viabilizando os estudos fisiológicos, químicos, físicos, farmacológicos e bioquímicos. De fato, estas moléculas são extraídas de fontes biológicas em quantidades insuficientes para desenvolver todos esses estudos. Assim, entre os métodos mais comumente empregados para a obtenção destes compostos em número e escala variada está a síntese de peptídeo em fase sólida – SPFS (MERRIFIELD, 1963; MACHADO et al., 2004).

Neste método, a síntese ocorre na presença de um suporte polimérico insolúvel em todos os solventes orgânicos utilizados. Esta propriedade permite o uso de excesso de reagentes que, por meio de uma placa porosa, são eliminados após cada etapa por simples filtração, juntamente com os solventes e subprodutos. Além disto, a resina permanece no mesmo frasco do início ao fim da síntese, evitando a perda de material e fazendo com que o processo seja mais prático, rápido e vantajoso, permitindo inclusive a automatização.

A introdução do primeiro aminoácido à resina ocorre geralmente por meio do grupo α -carboxila, que é ligado covalentemente ao grupo funcional da resina por meio de ligações éster ou amida. Após esta etapa, a síntese ocorre no sentido do grupo carboxi-terminal para o amino-terminal, por meio de adições monoméricas dos aminoácidos posteriores. Para isso, é utilizado no meio reacional um reagente químico para ativar o ácido carboxílico de um N^α -acil-aminoácido ($R^1\text{COOH}$), o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo amino alfa do aminoácido que está ligado à resina ($\text{H}_2\text{N}-R^2$) resultando na formação da ligação peptídica ($R^1\text{CONHR}^2$). Ressaltamos que, como o grupo amino do aminoácido livre e sua cadeia lateral, se reativa, estão protegidos por grupamentos protetores, e o grupo carboxila do outro aminoácido está ligado a resina, a síntese é direcionada somente para a formação do produto $R^1\text{CONHR}^2$.

Atualmente são empregadas duas estratégias para a SPFS, que diferem em relação ao tipo e características dos protetores utilizados: 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 base-lábil 9-fluorenilmetiloxicarboxila como grupo protetor (figura 5). Atualmente, a estratégia utilizando o protetor Fmoc é a mais utilizada para a obtenção dos peptídeos. Nesta estratégia, a região N-terminal do aminoácido é protegida temporariamente pelo grupo Fmoc e suas cadeias laterais se reativas são protegidas por grupos tais como o *t*-

butiloxycarbonila (Boc), tritila (Trt) e *t*-butila (tBu). Esta estratégia envolve condições químicas mais brandas do que a química Boc, sendo que o grupo Fmoc é removido por aminas secundárias como a piperidina, evitando assim a manipulação de ácidos muito fortes, como o fluoreto de hidrogênio, na química Boc.

Após a síntese, os peptídeos são separados da resina em uma etapa denominada de clivagem, que consiste da separação simultânea do peptídeo da resina e dos grupos protetores da cadeia lateral, obtendo-se posteriormente o material bruto purificado. A SPFS está bem estabelecida e, em princípio, é aplicável a qualquer sequência e por sua concepção, R. B. Merrifield foi agraciado com o Nobel de Química em 1984.

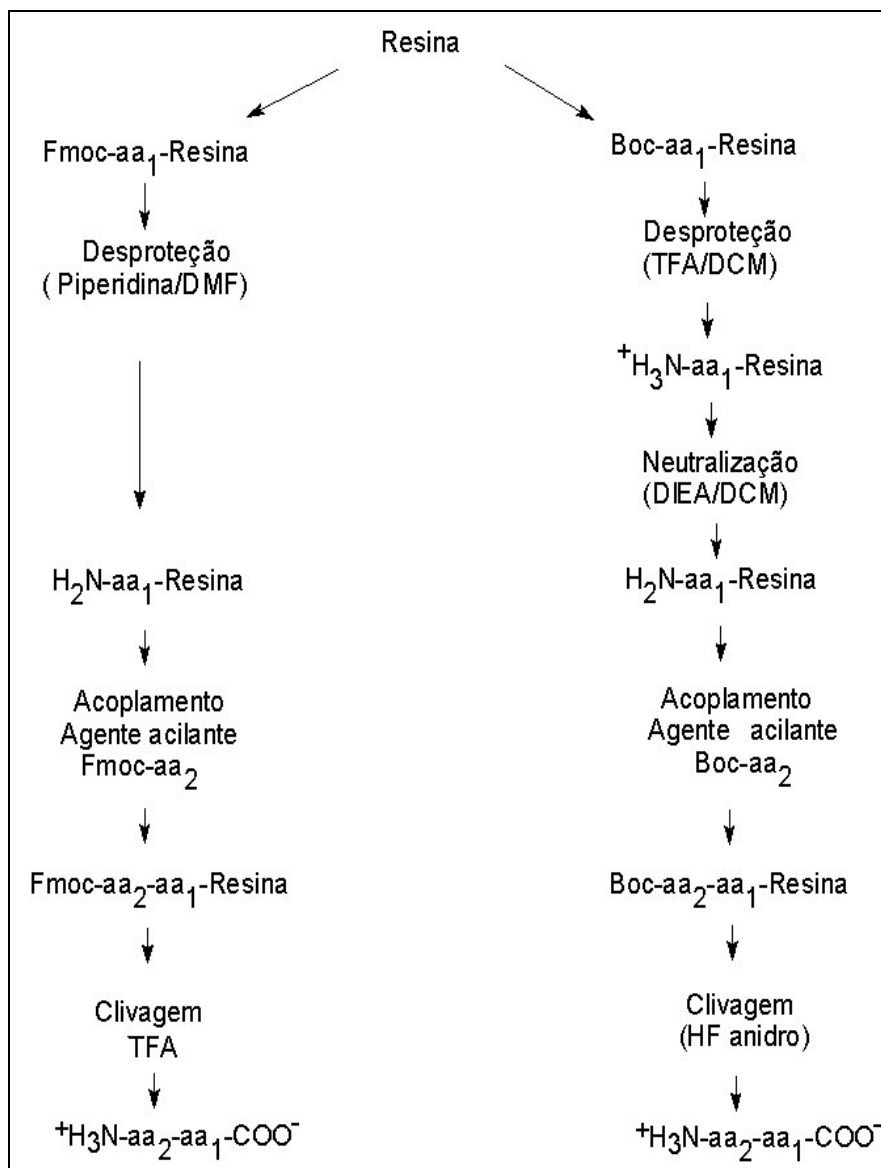


Figura 5. Estratégias empregadas na síntese de peptídeos em fase sólida.

1.3. Espectroscopia de Fluorescência

Uma das metodologias experimentais mais utilizadas para estudar alterações conformacionais em proteínas e peptídeos é a espectroscopia de fluorescência (LAKOWICZ, 1983). Essa técnica se baseia na propriedade que alguns grupos, chamados fluoróforos, possuem de emitir luz. A emissão de radiação eletromagnética é devido às transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estado fundamental, mais especificamente, quando o estado excitado singleto (S_1) decai para o estado singleto fundamental (S_0) (CANTOR, 1980). Além da fluorescência, ocorrem simultaneamente outros tipos de decaimento, como a conversão interna, a fosforescência e o cruzamento intersistemas. Estes processos, esquematizados na figura 6, competem com a fluorescência, fazendo com que a intensidade da luz emitida dependa de sua ocorrência.

Os fluoróforos usados em análises de macromoléculas podem ser do tipo intrínsecos (contidos nas macromoléculas) e/ou extrínsecos (adicionados ao sistema). Nos estudos de peptídeos, se utiliza principalmente a radiação emitida pelos fluoróforos intrínsecos, triptofano e tirosina. A fenilalanina também apresenta fluorescência, mas por possuir um rendimento quântico muito baixo, a emissão deste resíduo raramente é utilizada. Experimentos de fluorescência de peptídeos são feitos por meio da excitação no comprimento de onda de máxima absorção, em torno de 280 nm, onde o espectro de emissão se deve à contribuição tanto do triptofano como da tirosina. Contudo, é possível excitar seletivamente o Trp entre 295 e 305 nm.

Como os fluoróforos são sensíveis ao ambiente que os circunda, a interação destas moléculas com o meio pode alterar a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão. Assim, propriedades como comprimento de onda de máxima emissão (λ_{max} de emissão), rendimento quântico (Φ_F), tempo de vida do fluoróforo (τ_F), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para avaliar as propriedades estruturais dos peptídeos.

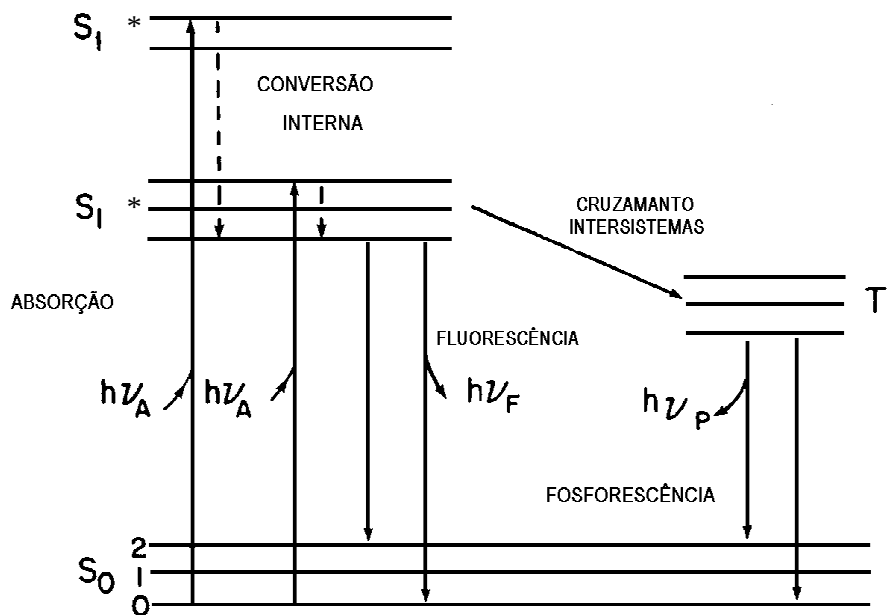


Figura 6. Diagrama de Jablonski. As energias necessárias para a excitação são representadas na figura por $h\nu_A$, a energia resultante da fluorescência é dada por $h\nu_F$ e a energia resultante do processo de fosforescência, $h\nu_P$. Modificado de Lakowicz, 1983.

Sendo assim, mudanças observadas nos espectros de fluorescência podem nos fornecer informações a respeito da estrutura e dinâmica de uma macromolécula, interações com modelos de membrana e associação intracadeias.

1.4. Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (“circular dichroism” - CD) detecta a atividade óptica de moléculas quirais originada pela interação de centros assimétricos com a luz circularmente polarizada. Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são compostas de muitas unidades opticamente ativas ou enantiômeras (desviam o plano da luz polarizada para lados diferentes), que provocam alteração na polarização da luz incidente. A técnica de CD detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à direita (*d*, dextrógiro) e à esquerda (*l*, levógiro) após esta passar através de uma amostra. Em proteínas e em peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são as ligações amida, os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina e as pontes dissulfeto (MULKERRIN, 1996; SREERAMA; WOODY, 1994; WOODY, 2005).

A rotação ao redor da ligação O=C–NH (amida) peptídica é restrita devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH. Desta forma, existem apenas duas ligações cuja rotação é permitida: C α –NH, cujo ângulo de rotação é denominado ϕ e C α –CO, cujo ângulo de rotação é nomeado Ψ (figura 7). Deste modo, por meio dos ângulos específicos ϕ e Ψ é possível determinar a estrutura dos peptídeos.

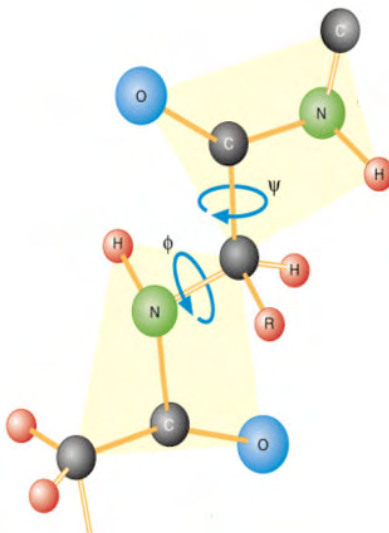


Figura 7. Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos ϕ e Ψ .

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 estrutura randômica, 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 $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada em 196 nm, as quais são originadas pelos elétrons desemparelhados do oxigênio da carbonila. O espectro de uma hélice alfa possui essas mesmas bandas. Contudo, ele é mais complicado, pois nele a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é desdobrada em $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\perp$), centrada em 191 nm, e $\pi \rightarrow \pi^*$ ($//$) centrada em 208 nm. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm. Desta maneira, a forma do espectro de CD das proteínas depende do tipo e do conteúdo de estrutura secundária (SAXENA e WETLAUFE, 1971). Isto permite que as proporções de hélices, estruturas β , alças (turns) e estrutura aleatória sejam determinadas.

Ao contrário da fluorescência, que permite apenas a visualização de mudanças conformacionais, a espectroscopia de CD permite obter o tipo de estrutura secundária

(PEDONE, 2006) existente no peptídeo de interesse, nas diferentes condições estudadas (CASALLANOVO, 2005). A figura 8 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

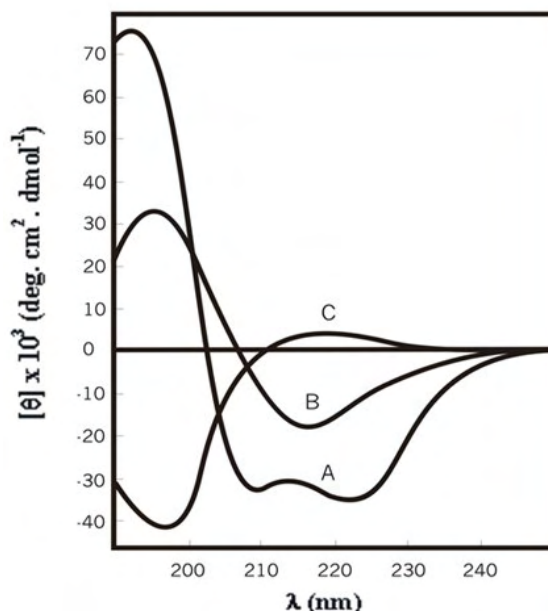


Figura 8. Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (a) hélice alfa, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica (GREENFIELD; FASMAN, 1969).

1.5. Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear – RMN é relacionada com a propriedade da absorção da radiação eletromagnética por núcleos submetidos a um intenso campo magnético (WÜTHRICH, 1986). Esta técnica espectroscópica, considerada de alta resolução, é muito utilizada na área biológica, pois permite a determinação de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas de até aproximadamente 50 kDa, além de fornecer informações sobre o modo de interação, dinâmica molecular e estereoquímica da molécula.

Um ano após a descoberta histórica de Watson e Crick, Jacobson e colaboradores, em 1954, demonstraram o efeito da hidratação do ácido desoxirribonucléico, sendo a primeira aplicação da RMN em uma amostra biológica (JACOBSON; ANDERSON; ARNOLD, 1954). Três anos depois, Saunders e colaboradores obtiveram o primeiro espectro de ^1H RMN de uma proteína (figura 9), a ribonuclease, utilizando um equipamento com a frequência de 40 MHz (SAUNDERS; WISHNIA; KIRKWOOD, 1957). Em um intervalo de cerca de 40 anos, o campo da espectroscopia de RMN sofreu uma revolução, culminando no Prêmio Nobel de

Química de 1991 entregue a Richard Ernst, um dos pesquisadores mais importantes no desenvolvimento desta técnica. No início dos anos 80, estudos feitos por Ernst, Kurt Wüthrich e colaboradores, demonstraram que era possível obter, com resolução atômica, a estrutura de pequenas proteínas utilizando a técnica de RMN (KUMAR; ERNST; WUTHRICH, 1980; NAGAYAMA et al., 1980).

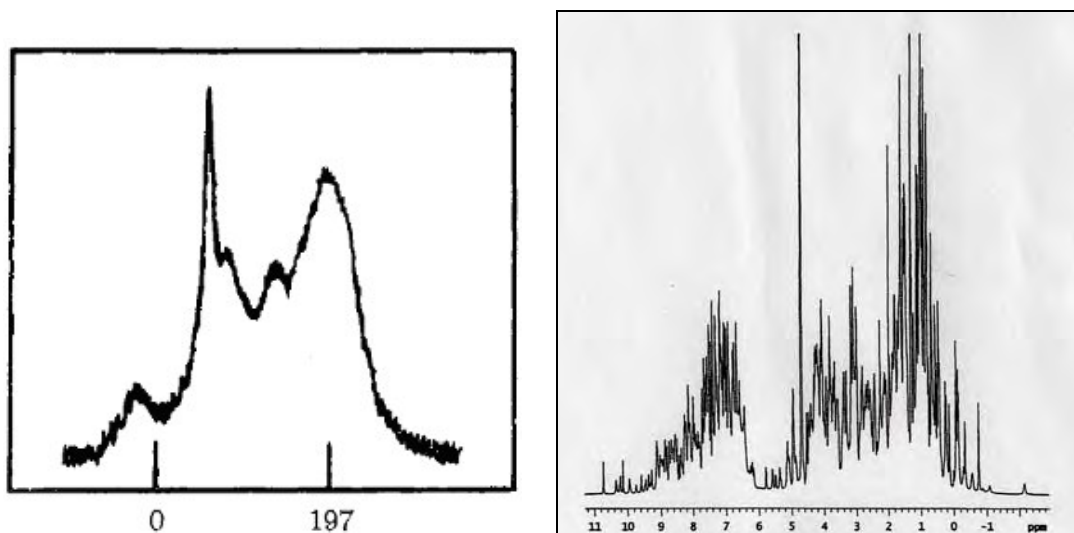


Figura 9. Espectros de ^1H RMN: à esquerda, obtido na década de 50, da ribonuclease a 40 MHz e à direita, na década de 90, o espectro da lisozima obtido a 750 MHz.

Desde então, muitos trabalhos foram desenvolvidos e nas últimas décadas, a espectroscopia de RMN emergiu e se estabeleceu como uma técnica poderosa para a determinação da estrutura 3D de macromoléculas biológicas em solução, contribuindo para estudos de mecanismos moleculares. Grande parte desta evolução é atribuída aos inúmeros trabalhos realizados por Kurt Wüthrich, responsável por grandes avanços nos procedimentos de obtenção e análise de espectros de RMN de macromoléculas biológicas em solução. Por tais contribuições, lhe foi concedido o Prêmio Nobel de Química de 2002. O avanço da RMN pode ser constatado comparando-se o espectro obtido para a ribonuclease, em 1957, com a da lisozima obtido na década de 90, a 750 MHz, onde é possível verificar um grande aumento na definição das linhas espectrais (figura 9).

Os experimentos de RMN são baseados em uma propriedade mecânica quântica do núcleo: o *spin*. Associado ao *spin* está o momento magnético, que nesse caso pode ser interpretado como um dipolo magnético. Esses dipolos atômicos podem se orientar paralela ou antiparalelamente a um campo magnético externo. As duas orientações possíveis correspondem a energias diferentes e os *spins* podem “pular” de uma orientação à outra,

absorvendo ou emitindo a diferença de energia na forma de radiação eletromagnética (WÜTHRICH, 1986; EVANS, 1995).

Os experimentos de RMN são realizados em espectrômetros compostos de um magneto supercondutor, que produz um campo magnético estático extremamente forte e homogêneo, e um console que pode gerar ondas eletromagnéticas, permitindo por meio desta irradiação a manipulação da magnetização pelos espectroscopistas de RMN. A frequência da irradiação deve ser igual à diferença de energia entre os dois estados possíveis do *spin* e, que em geral abrange a radio-frequência entre 50-900 MHz. Após a perturbação do equilíbrio dos *spins*, através de vários pulsos de radiação de radiofrequência o sinal de RMN pode ser observado (HORE, 1995).

Uma propriedade fundamental explorada na técnica de RMN é o fato de que o momento magnético de núcleos individuais pode interagir com pequenos campos magnéticos criados por *spins* vizinhos. Essa interação *spin-spin* é usada para correlacionar diferentes núcleos em uma molécula. Os núcleos podem interagir diretamente, através do espaço, ou indiretamente, através da ligação química. As análises de um espectro de RMN são baseadas nessas correlações entre ligação química e espaço. Porém, em particular, as informações obtidas através do espaço provêm a base para as informações geométricas requeridas para determinar a estrutura de moléculas em solução e são medidas através do Efeito Nuclear *Overhauser* (*nuclear Overhauser effect* ou NOE). O NOE reflete a transferência de magnetização entre *spins* que estão interagindo via seus dipolos associados. Assim, no caso de proteínas, os núcleos que estão envolvidos na correlação de NOE podem pertencer aos resíduos de aminoácidos que estão separados na estrutura primária, mas que estão próximos no espaço a uma distância menor que 5 Å (WÜTHRICH, 1986), permitindo a determinação da estrutura tridimensional de biomoléculas (figura 10).

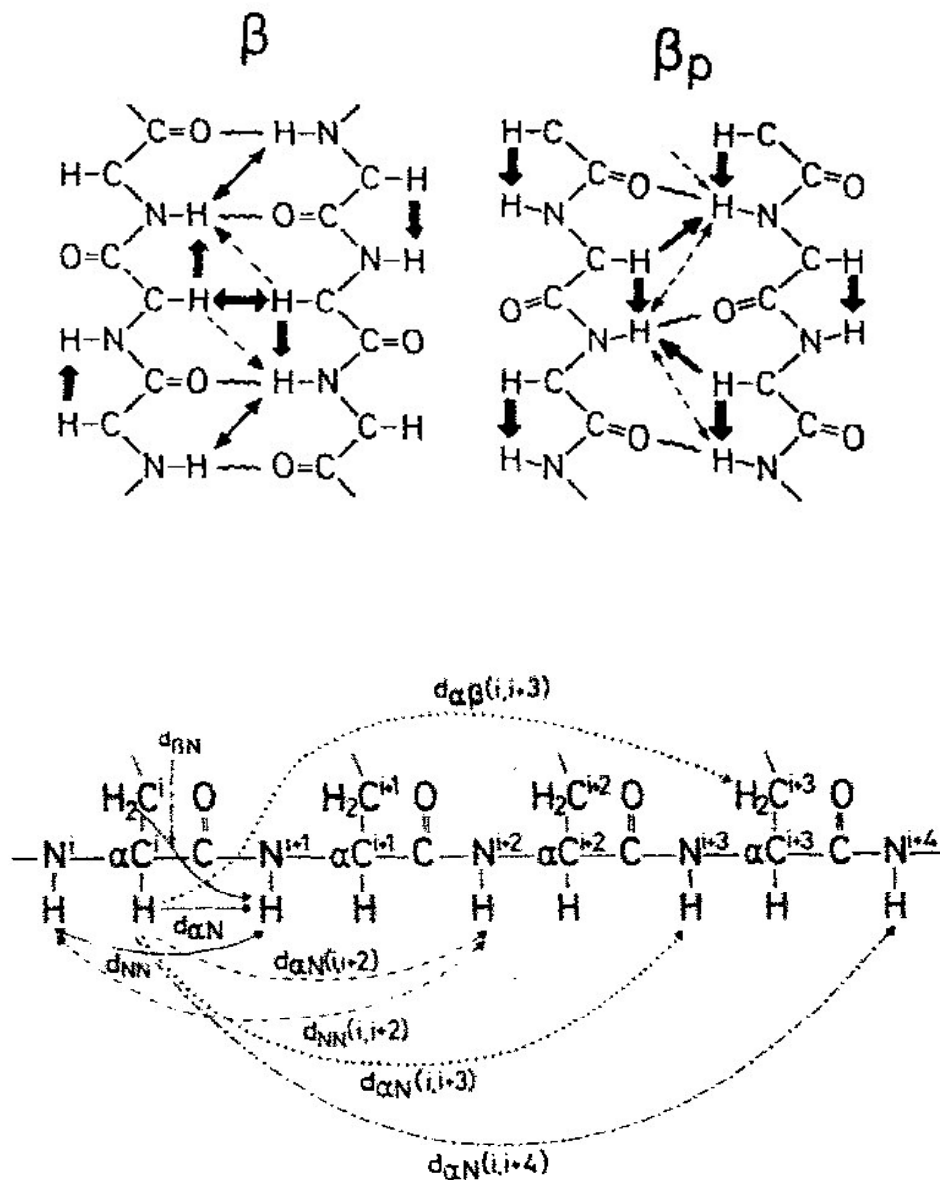


Figura 10. Esquema de padrões de NOEs (representados por flechas) observados para estruturas em fita- β antiparalela (β), paralela (β_p) e, hélice alfa (WÜTHRICH, 1986).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As características estruturais dos PAMs estão diretamente relacionadas ao seu modo de ação, que possui como principal mecanismo a ligação à membrana do patógeno, aumentando sua permeabilidade (SHAI, 1995; TOKE, 2005), causando a desestruturação da sua bicamada lipídica e morte celular. No estudo do modo de ação de macromoléculas, a membrana também é um alvo importante, principalmente por ser a superfície mais externa da célula. Desta forma, os estudos de interação entre peptídeos e modelos de membrana são muito importantes para o entendimento de seu mecanismo de ação (ZASLOFF, 2002). Nos estudos envolvendo a interação da membrana com macromoléculas são utilizados miméticos artificiais constituídos por detergentes e lipídeos com propriedades básicas, ácidas ou neutras, além da presença de lipídios com propriedades especiais como colesterol, esfingomielinas, cardiolipinas e outros (ELEGBEDE; HINDERLITER; ALMEIDA, 2006).

O peptídeo hilina a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂), que é o alvo deste projeto, apresentou potencial como molécula antimicrobiana. Em estudos preliminares, este peptídeo apresentou atividade contra algumas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Além disso, a estrutura primária deste peptídeo foi semelhante a outros peptídeos da classe das *bombininas*, os quais possuem comprovadamente atividades antibacterianas (MANGONI, et al., 2000). Portanto, um estudo mais detalhado da estrutura/função deste peptídeo pode propiciar resultados interessantes sobre seu modo de ação.

Deste modo, para o entendimento do mecanismo de ação deste peptídeo, modificações estruturais em sua seqüência primária e estudos conformacionais variando-se o ambiente em que ele se encontra foram realizados.

Dentro deste contexto, o projeto teve como objetivo central obter informações sobre o mecanismo de ação do peptídeo hílina a1, além de desenvolver moléculas com maior probabilidade de aplicação terapêutica. Somado a isto, devido ao pequeno número de informações referentes à região N-terminal dos PAMs, vários análogos modificando-se a carga desta extremidade foram sintetizados e avaliados em função de sua estrutura e atividade biológica. Adicionalmente, modificações pontuais foram realizadas e os possíveis efeitos biológicos e estruturais, ocasionados a partir da desestabilização da hélice alfa anfipática, foram avaliados. Nestes estudos, os peptídeos foram obtidos pela síntese de peptídeo em fase sólida e avaliados utilizando métodos espectroscópicos, tais como, dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e ressonância magnética nuclear.

Para se atingir estes objetivos, realizamos as seguintes etapas experimentais:

- Síntese dos peptídeos descritos na tabela 2, através da técnica de síntese em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc;
- Purificação e caracterização dos peptídeos hy-a1 e seus análogos por técnicas de HPLC-fase reversa e espectrometria de massas;
- Determinação das atividades biológicas dos peptídeos sintetizados: antimicrobiana, e hemolítica.
- Análise das alterações conformacionais por meio da espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular destes peptídeos na presença de indutor de estrutura TFE e em membranas modelo, tais como, micelas de LPC e vesículas (LUVs).
- Determinação da estrutura tridimensional de alguns dos peptídeos por meio da ressonância magnética nuclear na presença de d_{38} -DPC.

Tabela 2. Sequências do peptídeo nativo hy-a1 e dos análogos estudados neste projeto.

Peptídeo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Hy-a1	-	I	F	G	A	I	L	P	L	A	L	G	A	L	K	N	L	I	K	-
Acetil-[Trp ⁶]hy-a1	Ac	I	F	G	A	I	W	P	L	A	L	G	A	L	K	N	L	I	K	-
Lys-[Trp ⁶]hy-a1	K	I	F	G	A	I	W	P	L	A	L	G	A	L	K	N	L	I	K	-
Asp-[Trp ⁶]hy-a1	D	I	F	G	A	I	W	P	L	A	L	G	A	L	K	N	L	I	K	-
[Trp ⁶]hy-a1	-	I	F	G	A	I	W	P	L	A	L	G	A	L	K	N	L	I	K	-
[Trp ⁶ ,Lys ¹³]hy-a1	-	I	F	G	A	I	W	P	L	A	L	G	A	K	K	N	L	I	K	-
Endo-Pro ^{7a} [Trp ¹⁴]hy-a1	-	I	F	G	A	I	L	P	P	L	A	L	G	A	W	K	N	L	I	K

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese de peptídeos

Os peptídeos envolvidos neste projeto foram obtidos manualmente pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) empregando a estratégia Fmoc (FIELDS e NOBLE, 1990). As sínteses foram realizadas na “Unidade de Síntese e Purificação de Peptídeos”, do Departamento de Bioquímica - Instituto de Química – UNESP. O protocolo de síntese utilizado consiste de passos cíclicos seriados de acoplamento e desproteção do amino-grupo alfa terminal (figura 11). Na etapa de acoplamento foi utilizado o par de ativação HOBt/DIC e os Fmoc-aminoácidos (Fmoc-AA) com 3 vezes de excesso em relação a quantidade inicial de grupos funcionalizados na resina, usualmente, em DMF, e eventualmente utilizando 50% DCM/DMF. A desproteção do grupo Fmoc base-lábil foi efetivada pelo tratamento da resina em piperidina/DMF (2:8) em duas etapas de 2 e 20 minutos, respectivamente. A cada passo foram efetuadas lavagens alternadas com os solventes orgânicos DMF e DCM, respectivamente. Os Fmoc-aminoácidos glicina, leucina e valina foram empregados sem protetores em sua cadeia lateral, enquanto que a treonina, serina, asparagina, lisina e triptofano foram utilizados com os seguintes grupos protetores das cadeias laterais: *tBut*, *tBut*, *Trt*, *Boc* e *Boc*, respectivamente.

O sucesso de cada etapa de acoplamento e desproteção foi monitorado por meio do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). No caso de resultado positivo, a reação de acoplamento foi repetida utilizando outro protocolo composto por TBTU/HOBt na presença de DIEA, em 50% NMP/DCM.

Ao fim da síntese, para separar o peptídeo do suporte sólido e dos grupos protetores de cadeias laterais utilizados, foi realizada uma reação de clivagem utilizando uma solução, cuja composição dependeu dos resíduos presentes na cadeia peptídica. Quando resíduos de triptofano estiveram presentes utilizou-se a solução composta por 5% de água, 2,5% de fenol, 2,5% de EDT e 5% de tioanisol (V/V) em 82,5% de TFA, conhecido como *Reagente K* (KING et al., 1990). No entanto, quando este aminoácido não esteve presente na cadeia

utilizou-se 90% TFA, 5% de cresol e 5% de água tipo *milli-Q*. Independente do “coquetel” utilizado, a relação 1 mL de solução para cada 100 mg de resina foi mantida (PENNINGTON e DUNN, 1994). A solução acima, contendo a resina, foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Após este período foi adicionado éter etílico gelado, para precipitação do peptídeo. O precipitado foi filtrado através de uma placa porosa ou separado por centrifugação. Ao precipitado contendo o peptídeo e a resina foi adicionada uma solução contendo 0,045% de TFA em água. A solução foi filtrada e ou centrifugada, separando a resina insolúvel da solução peptídica, que foi concentrada no rotavapor e liofilizada, obtendo-se um pó branco floculoso denominado de peptídeo bruto.

Os ativadores e os Fmoc-AA foram adquiridos das empresas Fluka, Nova Biochem Corp, Synpep e/ou Advanced Chemtech. Os solventes utilizados como meio de reação foram DMF, DCM adquiridos do laboratório LabSynth e NMP da empresa Acros Organics (USA), todos classificados como *PA*. Os demais reagentes utilizados foram adquiridos dos laboratórios Merck, Fluka, Sigma/Aldrich e Acros Organics.

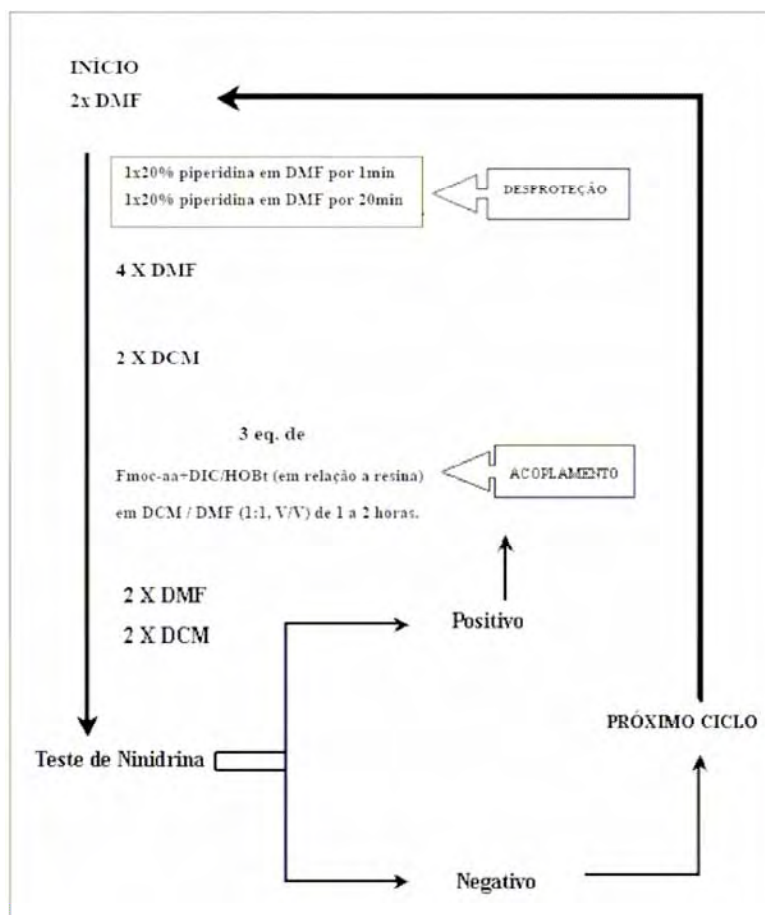


Figura 11. Protocolo de síntese utilizado na obtenção dos peptídeos.

3.2. Purificação dos peptídeos

A purificação do material bruto foi realizada em modo semipreparativo utilizando um HPLC System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C18 Waters DeltaPack dimensão 2 x 30 cm, 300 Å, 5 µm. O grau de pureza das frações foi determinado em um HPLC Shimadzu LC-10A/C-47A, com coluna 4,6 mm x 25 cm de fase reversa C18 Phenomenex, 300 Å, 5 µm.

As condições cromatográficas foram:

Modo Preparativo

Solventes: A: 0,045% TFA/H₂O

B: 0,036% TFA/ACN

Gradiente: 0,33%/min de solvente B durante 90 minutos.

Fluxo: 5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Modo Analítico

Solventes: A: 0,045% TFA/H₂O

B: 0,036% TFA/ACN

Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos

Fluxo: 1,5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

A confirmação do sucesso da síntese e purificação foi realizada através de análise de aminoácidos e por espectrometria de massas.

3.3. Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por *orto*-phtalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema foi periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra. Os peptídeos (0,2 - 1 mg) foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6 mol/L, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H₂O, a 110

°C por 72 horas em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado à vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no aparelho. Para o cálculo da proporção relativa dos aminoácidos da amostra, determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média (FOUNTOULAKIS e LAHM, 1998).

3.4. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos por injeção direta por bomba de infusão (Fluxo 200 µl/min) em um sistema LC-MS-MS Bruker ultrOTOF_Q - ESI-TOF Mass Spectrometer (USP – Ribeirão Preto). O modo de detecção foi positivo para todas as amostras.

As análises também foram realizadas por injeção direta em um aparelho Fisom Plataform – ESI com bomba Shimadzu LC – 10AD. Este equipamento está localizado no Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Química Orgânica. Esta técnica baseia-se em um analisador de massa quadrupolo que apresenta como resultado final a razão massa carga (m/z).

3.5. Atividade Biológica

3.5.1. Testes de atividade antibacteriana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram baseados no trabalho de Mor e colaboradores (1994). Cepas de referência de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), foram inicialmente crescidas em 5 mL de meio Mueller Hinton, a 37 °C, sob agitação. Quando a DO_{590nm} = 1,0 foi alcançada, a suspensão bacteriana foi diluída em meio Mueller Hinton fresco (1:50 para bactérias Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas). As células bacterianas (alíquotas de 50 mL contendo 2×10^5 a 7×10^5 UFCs dependendo das células bacterianas utilizadas) foram incubadas com os peptídeos sintéticos dissolvidas em água tipo *milli-Q*. Diluições seriadas de uma solução estoque estéril a 256 µmol/L do peptídeo foram incubadas com a suspensão bacteriana diluída 1:1 (v/v) em microplacas estéreis de 96 poços (“wells”). Depois de 18h de incubação a 37 °C, a placa foi analisada a 595 nm em um

leitor de microplaca da BioRad modelo 3550-UV. Cada experimento foi realizado em triplicata. Como controle a suspensão bacteriana foi incubada (1:1, v/v) com água tipo *milli-Q* ou 0,4% (v/v) de formaldeído. O CIM foi definido como a menor concentração de peptídeo em que não houve crescimento bacteriano após o período de 21 h a 37 °C de incubação. 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).

3.5.2. Testes de atividade antifúngica

Foram utilizados os seguintes microorganismos *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012). Os microorganismos foram obtidos do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP. As leveduras foram crescidas e mantidas em ágar Sabouraud dextrose por 24 e 48h, em temperatura de 35 °C.

Os testes da atividade antifúngica foram executados usando o método da microdiluição em caldo como descrito na M27-A2 documento do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) com modificações (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2002). Foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-glutamina em pH 7,0, com 0,165 mol/L de ácido morpholinopropanosulfônico (MOPS), enriquecido com 2% de glicose.

As amostras peptídicas foram preparadas dos peptídeos, 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 preparada previamente. As placas foram incubadas sob agitação a 37 °C por 24h para as espécies do gênero *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. O controle utilizado foi fluconazol, adquirido da empresa Sigma. Essa etapa do projeto foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica.

3.5.3. Testes de 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 Tris-HCl pH 7.4 contendo 0,15 mol/L NaCl. Uma suspensão celular a 1% (v/v) e uma solução a 128 µmol/L do peptídeo foram preparadas no mesmo tampão. Em tubos plásticos de 1,5 mL diluições seriadas da solução do peptídeos foram usadas para determinar a HC₅₀ e o volume final em cada tubo foi 200 µL (100 µL da solução diluída do peptídeo e 100 µL da suspensão celular).

Depois da 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 microplaca da BioRad modelo 3550-UV. A referência de 100% de lise foi 100 µL da suspensão celular misturada com 100 µL de 1% (v/v) Triton X-100. A referência de 0% de lise foi 100 µL da suspensão celular com 100 µL de tampão Tris. O ensaio foi realizado em triplicatas. O valor da HC₅₀ (concentração do peptídeo que causou 50% de hemólise) foi determinada por regressão logarítmica. Os ensaios foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do laboratório da Prof^a. Dr^a. Mariana S. Castro, da Universidade de Brasília (UNB).

3.6. Espectroscopia de fluorescência

3.6.1. Interação com Miméticos de Membrana

Para a realização dos estudos de interação peptídeo-membrana por meio da espectroscopia de fluorescência foram utilizadas vesículas e micelas como miméticos de membrana. A preparação das vesículas foi baseada em métodos já descritos (MAYER; HOPE; CULLIS, 1986; MacDONALD et al., 1991) e modificados de acordo com a composição lipídica desejada. Os fosfolípidios utilizados foram esfingomielina (SM), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfato (DPPA) e 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina (DPPC), todos adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids e utilizados na proporção de (47,5:5:47,5). Deste modo, 5,2 mg de SM, 0,5 mg de DPPA e 5,23 mg de DPPC foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio/metanol (1:4) e evaporados sob fluxo de N₂ até a secagem completa da

solução, possibilitando a formação de um fino filme lipídico na parede do tubo. Posteriormente, o solvente residual foi eliminado sob vácuo durante 12 horas (“over-night”).

Em seguida, adicionou-se ao tubo, 1 mL de tampão Tris.HCl 0,01 mol/L; NaCl 0,15 mol/L pH 7,0, para promover a hidratação da fase lipídica até a obtenção uma suspensão. A solução foi submetida a 6 ciclos de congelamento-descongelamento, sendo submetida posteriormente a um extrusor composto de duas seringas e equipado com duas membranas de polycarbonato de 100 nm de diâmetro no qual foram realizadas 31 passagens. As medidas de fluorescência foram realizadas através da adição de determinadas concentrações de lipídio (concentração teórica em média de 1 mmol/L) em uma solução contendo 10 µmol/L de peptídeo, em um volume final de 600 µL em Tris.HCl 0,01 mol/L NaCl 0,15 mol/L pH 7,0 a 25 °C com controle termostatizado Peltier.

Foram utilizados também como miméticos de membrana detergentes de LPC e d_{38} -DPC, variando-se a concentração de 0 a 50 mmol/L adicionadas em pequenas alíquotas em uma solução aquosa de 10 µmol/L de peptídeo. As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão foi registrada entre 300 e 500 nm. A aquisição dos dados foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Varian.

3.6.2. Estudos de permeabilização

O procedimento utilizado na preparação das vesículas utilizadas neste estudo seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente, diferindo nas etapas posteriores a obtenção do filme lipídico. Nestes estudos, o filme foi resuspendido em 1 mL de uma solução de carboxifluoresceína (CF) (PM: 376,3) 80 mmol/L, promovendo a formação de vesículas contendo este fluoróforo em seu interior e exterior. A CF não incorporada no interior das vesículas foi removida por filtração em gel utilizando uma coluna Sephadex G50 de 1 x 12 cm estabilizada com tampão Tris.HCl 0,01 mol/L; NaCl 0,15 mol/L; pH 7,0 (BREUKINK et al., 1997).

A capacidade de permeabilização dos peptídeos foi avaliada mediante a liberação de CF das vesículas após a adição de 4 µmol/L de peptídeo. Esta por sua vez, foi determinada por meio do aumento da intensidade de fluorescência em 520 nm (comprimento de onda de excitação = 490 nm). Os experimentos foram realizados a 25 °C com controle termostatizado Peltier. A determinação do valor correspondente a 100% de liberação de CF (100% de permeabilização) foi realizada após a adição de 10% do detergente Triton X-100 (25 µL). O volume de vesícula colocado foi aquele que proporcionou o aumento de 4 vezes em relação ao

valor inicial. Os dados obtidos foram apresentados em função da porcentagem de liberação de CF após a adição de peptídeo no sistema, por meio da equação:

$$R\% = [(F_{\text{fin}} - F_{\text{in}})/(F_{\text{max}} - F_{\text{in}})] \times 100$$

onde F_{in} e F_{fin} representam a fluorescência inicial e final antes e após à adição do peptídeo. F_{max} é a fluorescência após a adição de Triton-X. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.6.3. Estudos de Supressão de Fluorescência

Para a realização desse estudo pequenas alíquotas de acrilamida 6 mol/L ou de iodeto de potássio (KI) 6 mol/L foram adicionadas a 10 $\mu\text{mol/L}$ de uma solução aquosa de peptídeo, na presença ou ausência de miméticos de membranas (vesículas de SM/PA/PC e micelas de LPC e $\text{d}_{38}\text{-DPC}$). Os experimentos foram realizados a 25 °C. As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão de fluorescência foi registrada entre 300 e 500 nm. As análises dos dados foram realizadas de acordo com a equação de Stern-Volmer (EFTINK e GHIRON, 1976), por meio da equação:

$$F_0/F = 1 + K_{\text{sv}}[Q]$$

onde F_0 e F representam a intensidade de fluorescência na ausência e presença de supressor de fluorescência (Q) (“quencher”), no comprimento de onda de máxima emissão respectivamente, e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer (valor da exposição do Trp ao supressor). Como os agentes supressores são de caráter polar (De KROON et al., 1990), o valor de K_{SV} pode ser relacionado com a taxa de supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano expostos à fase aquosa.

3.7. Dicroísmo Circular

Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J-715, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 16 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm.

Os espectros de CD foram realizados a partir de uma solução 80 $\mu\text{mol/L}$ de peptídeos em solução, 60% de TFE/ H_2O , 10 mmol/L de LPC, 10 mmol/L de DPC e 0,8 mmol/L de vesículas (descritas no item 3.6.1). Os dados foram expressos em elipticidade molar ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) que é calculado pela equação:

$$[\theta] = \theta / (10.l.c.n)$$

onde θ é a elipticidade observada, l é o caminho óptico em cm, c é a concentração em molar e n é o número de resíduos do peptídeo.

A porcentagem de α -hélice (f_H) presente no peptídeo foi estimada de acordo com Chen et al. (1974), utilizando-se a equação:

$$[\theta]_{222}^{obs} = (f_H - ik / n).[\theta]_{\infty}$$

onde $[\theta]_{222}^{obs}$ é a elipticidade observada no comprimento de onda de 222 nm, i é o número de segmentos helicoidais (considerado 1 para esse peptídeo), k é uma constante dependente do comprimento de onda (2,57), n é o número total de resíduos e $[\theta]_{\infty}$ a elipticidade residual máxima para uma hélice de tamanho infinito ($-39.500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) (CHEN et al., 1974; FASMAN, 1996).

Cabe salientar que o equipamento utilizado está instalado na Universidade de São Paulo, junto ao Instituto de Física de São Carlos, sob a coordenação dos professores Dra. Leila Maria Beltramini e Dr. Antônio José da Costa Filho.

3.8. Ressonância Magnética Nuclear

Para obter informações a respeito da estrutura secundária do peptídeo, foram realizados experimentos mono e bidimensionais: *Total Correlation Spectroscopy* (65 ms TOCSY), *Correlated spectroscopy* (COSY), *Double Quantum Filtered* (DQF-COSY) e *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* (250 ms NOESY). A aquisição de dados foi realizada a 37 °C no espectrômetro Varian Inova 600 (campo magnético de 14.1 Tesla) operando a frequência de ^1H de 599,730 MHz. Os peptídeos foram dissolvidos em 95% $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a uma concentração final de 1 mmol/L. A esta solução, foi adicionado 100 mmol/L

de d_{38} -DPC e o pH foi ajustado em torno de 5. Todos os dados obtidos foram processados e otimizados em estações *Silicon Graphics Octane*, utilizando o pacote de programas NMRpipe/NMRview, DYANA, Insight II/Discover e PROCHECK (DELAGLIO et al., 1995; JOHNSON; BLEVINS, 1994; GÜNTERT; MUMENTHALER; WÜTHRICH, 1997).

A supressão da água foi feita pela técnica de pré-saturação. Os espectros foram adquiridos utilizando-se janela de 8000 Hz, em ambas as dimensões com 512 t_1 incrementos de 32 transientes com 1024 pontos para cada indução de decaimento livre.

A determinação tridimensional dos peptídeos foi realizada por meio da análise da distância entre os prótons ^1H , calculada a partir do efeito nuclear *Overhauser* (NOE), tendo como referência os valores de deslocamento químico (“chemical shift index – CSI”) (WISHART; SKYKES, 1994). Os dados obtidos foram processados usando nmrPIPE/nmrVIEW (DELAGLIO et al., 1995). As distâncias interprotônicas foram obtidas através da seguinte equação:

$$r_{ij} = [r_{\text{ref}} (\sigma_{\text{ref}}/\sigma_{ij})]^{1/6}$$

onde r é a distância e σ o volume dos picos de correlação do espectro de NOESY adquirido com “*mixing time*” de 250 ms. A calibração foi realizada usando a distância de 1,8 Å para os prótons β geminais como referência. As distâncias interprotônicas aproximadas foram derivadas das intensidades dos sinais dos NOEs. Para isso, os picos de correlação foram divididos em três grupos, relacionando-se as seguintes distâncias interatômicas: 1,8-2,8 Å para NOEs de intensidade forte, 1,8-4,0 Å para NOEs de intensidade média e 1,8-5,0 Å para NOEs de intensidade fraca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Capítulo I

Importância da carga da extremidade N-terminal na atividade dos peptídeos.

Inúmeros trabalhos relacionando a estrutura com a função dos PAMs foram realizados (seção 1), sendo que a região N-terminal foi até o momento pouco estudada não havendo um estudo sistemático entre a carga desta extremidade e a função dos PAMs. Dentro deste contexto, inicialmente analisamos a importância desta carga na atividade biológica do peptídeo hy-a1.

Neste estudo foram sintetizadas cinco sequencias: uma sem alteração, uma contendo um triptofano substituindo a leucina na posição 6 da sequência e três contendo, além do triptofano, alterações na posição “zero” da cadeia. Desta forma, foram obtidos os peptídeos, hy-a1, [Trp⁶]hy-a1, Acetil-[Trp⁶]hy-a1, Lys-[Trp⁶]hy-a1 e Asp-[Trp⁶]hy-a1 - tabela 3. As diferenças entre os peptídeos são: a adição de um grupo acetil que remove a carga positiva do amino grupo terminal; um resíduo de aspartato que possui uma carga negativa na cadeia lateral, formando uma extremidade dipolar e um resíduo de lisina que adiciona uma carga positiva a esta extremidade. O resíduo de leucina situado na posição 6 da cadeia foi substituído pelo triptofano para permitir o estudo de interação destas moléculas com miméticos de membrana por meio da fluorescência do peptídeo. Estudos anteriores mostraram que este tipo de substituição não afeta negativamente a atividade de peptídeos formadores de poros, potencializando-a em alguns casos (CRUSCA, 2006), o que foi confirmado pelos dados apresentados nesta tese.

As sínteses foram realizadas em resina Rink-amida (grau de substituição 0,55 mmol/g), de forma que os peptídeos obtidos contêm uma extremidade carboxi-amida, semelhante ao selvagem (“*wild type*”).

Tabela 3. Sequência de aminoácidos e algumas características dos peptídeos.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos	Tempo de Retenção ^a (min)	Carga N-terminal ^b	Teor de hélice alfa (%) ^c	M _r (g/mol)
Hy-a1	IFGAILPLALGALKNLIK	19,3	+1	84	1864,2
[Trp ⁶]hy-a1	IFGAI W PLALGALKNLIK	19,3	+1	96	1937,4
Acetil-[Trp ⁶]hy-a1	Ac -IFGAI W PLALGALKNLIK	23,0	Neutra	91	1979,5
Lys-[Trp ⁶]hy-a1	K IFGAI W PLALGALKNLIK	18,3	+2	57	2065,6
Asp-[Trp ⁶]hy-a1	D IFGAI W PLALGALKNLIK	20,4	+1(-1)*	67	2052,5

^a Valores obtidos por HPLC de fase reversa usando método gradiente de análise: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Os peptídeos foram eluídos sob fluxo de 1,5 mL/min e detectados a 220 nm.

^b Para um pH ~ 5.

^c Obtido de acordo com a equação descrita na seção 3.7 na presença de 10 mmol/L de LPC.

* Presença do ânion carboxilato do resíduo do aspartato.

O peptídeo hy-a1 foi o primeiro peptídeo a ser sintetizado (“*wild type*”). A escala inicial de síntese foi de 0,20 mmol de resina (quantidade de grupos reativos disponíveis). A síntese e a clivagem foram realizadas de acordo com os protocolos descritos anteriormente (seção 3.1), segundo a estratégia Fmoc. Ao fim da síntese foram clivados 350 mg de resina obtendo 210 mg de peptídeo bruto (figura 12). Após o processo de purificação obteve-se 57 mg da fração mais pura (figura 12). Foram obtidas também frações com grau de pureza entre 85-94% de (dados não apresentados) que foram estocadas para repurificação.

Para obter o peptídeo [Trp⁶]hy-a1, foram utilizados 270 mg de resina e escala de 0,20 mmol. A massa final de peptidil-resina foi de 802 mg e cerca de metade desta peptidil-resina (400 mg) foi utilizada na etapa de clivagem. A massa total do peptídeo [Trp⁶]hy-a1 bruto obtida foi 162 mg. Como a quantidade de resina clivada foi de 0,1 mmol e o peso molecular do peptídeo sem protetor 1937 g/mol, podemos calcular a massa teórica de peptídeo que seria obtida, isto é, de 193,7 mg. Portanto o rendimento até esta etapa foi de 83,7% para o peptídeo [Trp⁶]hy-a1. Após a etapa de purificação e liofilização foi obtida uma fração de 58 mg apresentando teor de pureza superior a 95% (figura 13) – rendimento de 30%.

Para a obtenção do peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1, uma porção de 0,033 mmol da peptidil-resina acima foi submetida a uma reação de acetilação com anidrido acético no solvente DMF, conferindo a região N-terminal carga neutra. Para se obter o peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1, foi realizado mais um ciclo de síntese e desproteção com o resíduo de Fmoc-Lys(Boc) em 0,033 mmol de resina, atribuindo a região N-terminal mais uma carga positiva.

E por fim, para a obtenção do peptídeo Asp-[Trp⁶]hy-a1, foi realizado este mesmo procedimento com um resíduo de Fmoc-Asp(tBu) em 0,033 mmol de resina.

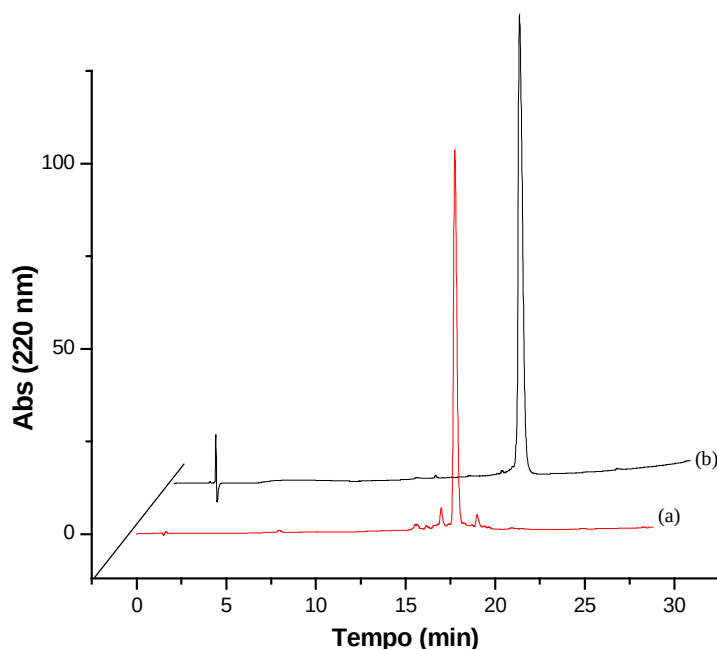


Figura 12. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Hy-a1 bruto (a) e fração purificada (b), com 89% e 97% de pureza, respectivamente.

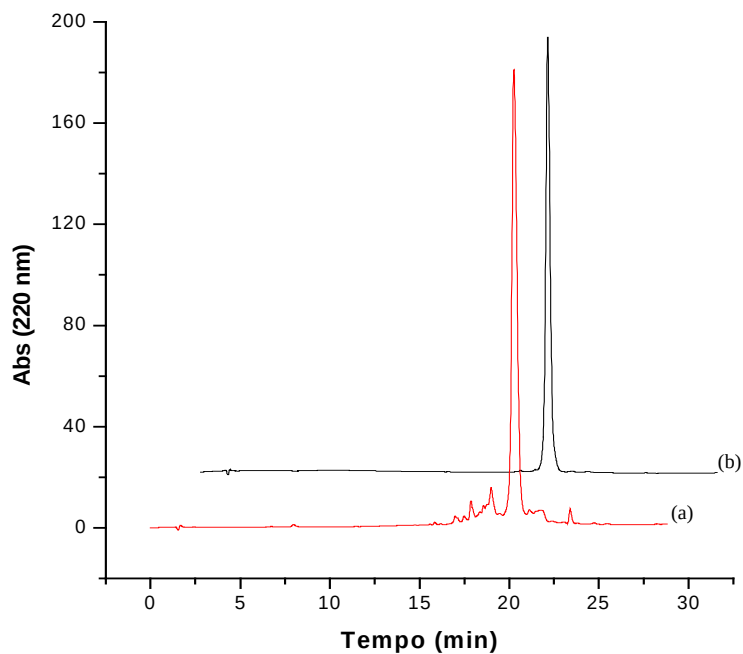


Figura 13. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo [Trp⁶]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. [Trp⁶]hy-a1 bruto (a) e fração purificada (b), com 89% e 97% de pureza, respectivamente.

No processo de clivagem do peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 foram utilizados 110 mg de resina, obtendo-se após toda etapa de clivagem, extração e liofilização, um material branco floculoso (peptídeo bruto) com massa de 43,1 mg e 87% de grau de pureza por HPLC. Este material foi purificado obtendo-se uma fração com 96% de grau de pureza (figura 14). A massa final de material purificado foi de 20 mg. Também foi obtida na etapa de purificação uma fração impura (não mostrada), de massa igual á 6,0 mg, apresentando 85% de grau de pureza, que foi armazenada para futura repurificação.

De modo semelhante ao Acetil-[Trp⁶]hy-a1, os demais peptídeos foram purificados e caracterizados. Para realizar a clivagem do peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1, foram utilizados 110 mg de resina, resultando ao final da etapa de clivagem/extração 56,7 mg de peptídeo bruto liofilizado com 76% de pureza. Após o processo de purificação, foi possível obter uma fração de 22 mg com 98% de pureza (figura 15). Para o peptídeo Asp-[Trp⁶]hy-a1 foram clivados cerca de 110 mg de resina, obtendo-se 59,6 mg de material bruto com mais de 80% de pureza, o qual foi purificado obtendo-se uma fração de 32 mg com grau de pureza $\geq 98\%$ (figura 16).

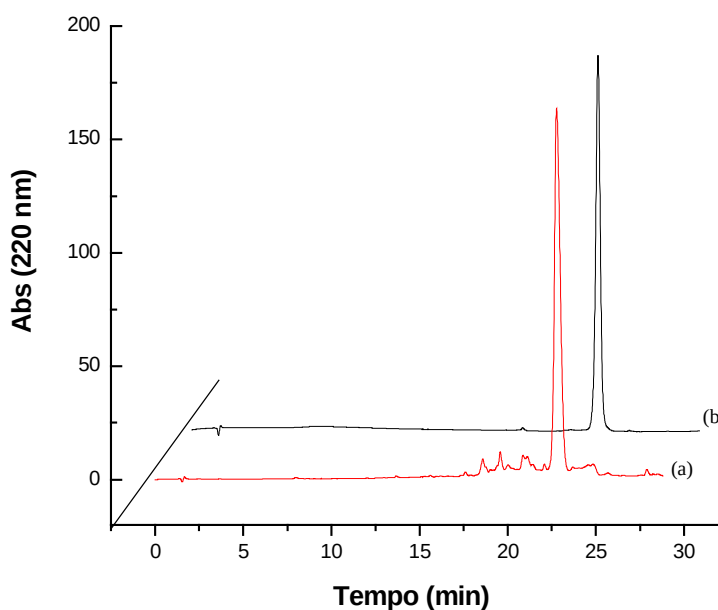


Figura 14. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Acetil-[Trp⁶]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 87% e 96% de pureza, respectivamente.

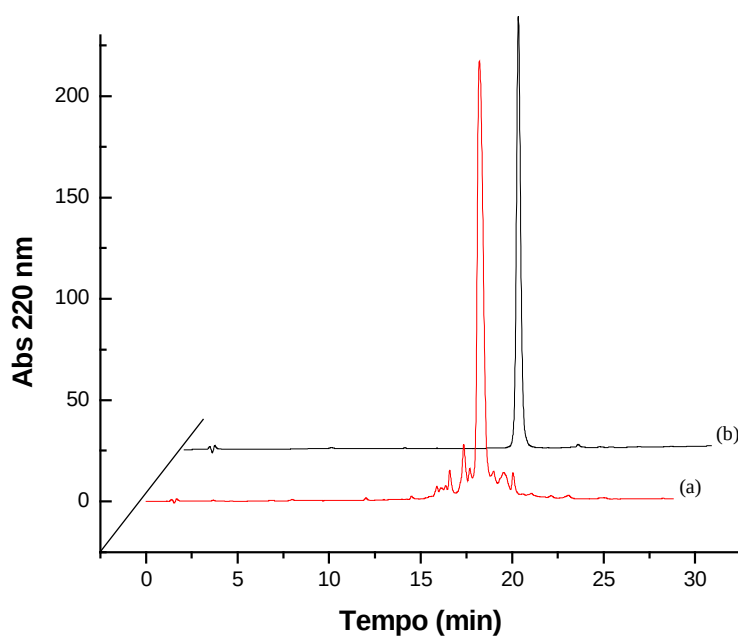


Figura 15. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Lys-[Trp⁶]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 76% e 98% de pureza, respectivamente.

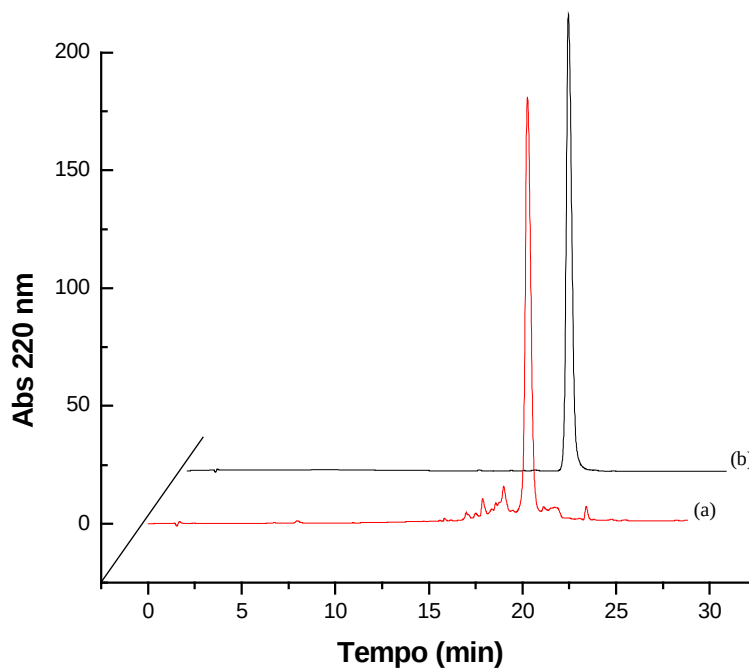


Figura 16. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo Asp-[Trp⁶]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Asp-[Trp⁶]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 80% e 98% de pureza, respectivamente.

Os peptídeos obtidos foram caracterizados por espectrometria de massas e mostraram resultados coerentes com o teórico esperado. O espectro adquirido do peptídeo hy-a1 apresentou picos de 1864 (carga +1); 933 (Z=+2); e 622 (Z=+3), peso molecular igual ao teórico (figura 17), confirmando o sucesso da síntese. O espectro de massa do peptídeo [Trp⁶]hy-a1 (figura 18) também confirmou a obtenção do material desejado, apresentando picos nos valores 1938 (Z=+1); 969,5 (Z=+2); e 647 (Z=+3), compatíveis com o teórico de 1937 g/mol.

A obtenção do peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 também foi confirmada, com um espectro de massas com valores de 1879 g/mol (carga +1), 990 (Z=+2) e 660 (Z=+3) (figura 19). O mesmo aconteceu para os peptídeos Lys-[Trp⁶]hy-a1 e Asp-[Trp⁶]hy-a1, cujos pesos moleculares obtidos foram condizentes com os teóricos: 2067 (carga +1) e 2053 (carga +1), respectivamente (figuras 20 e 21).

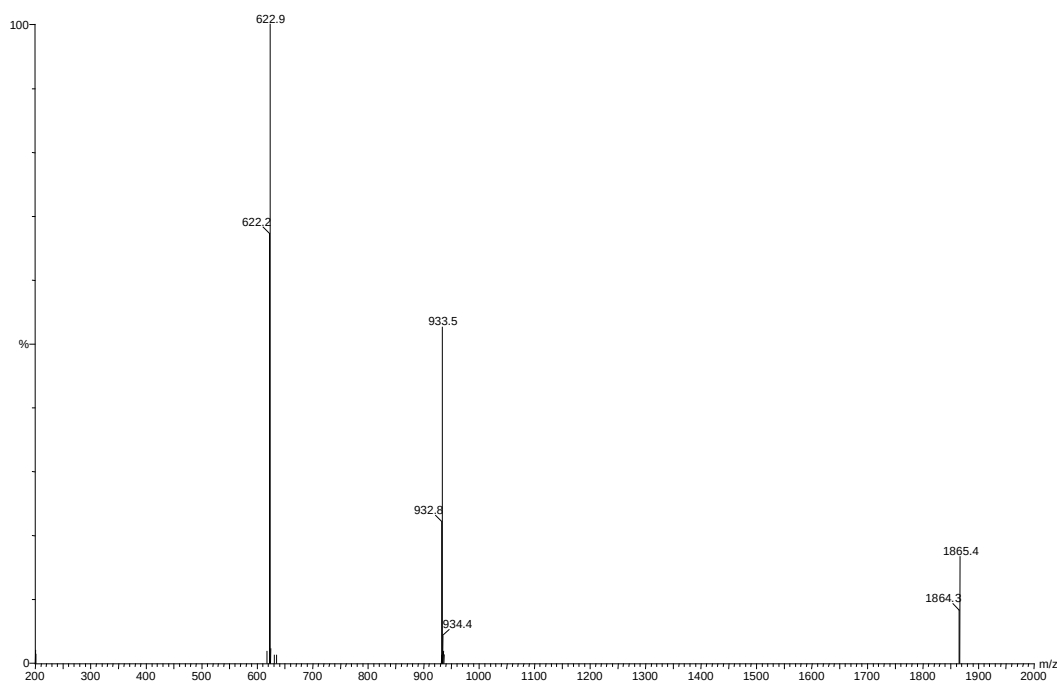


Figura 17. Espectro de massas do peptídeo purificado hy-a1.

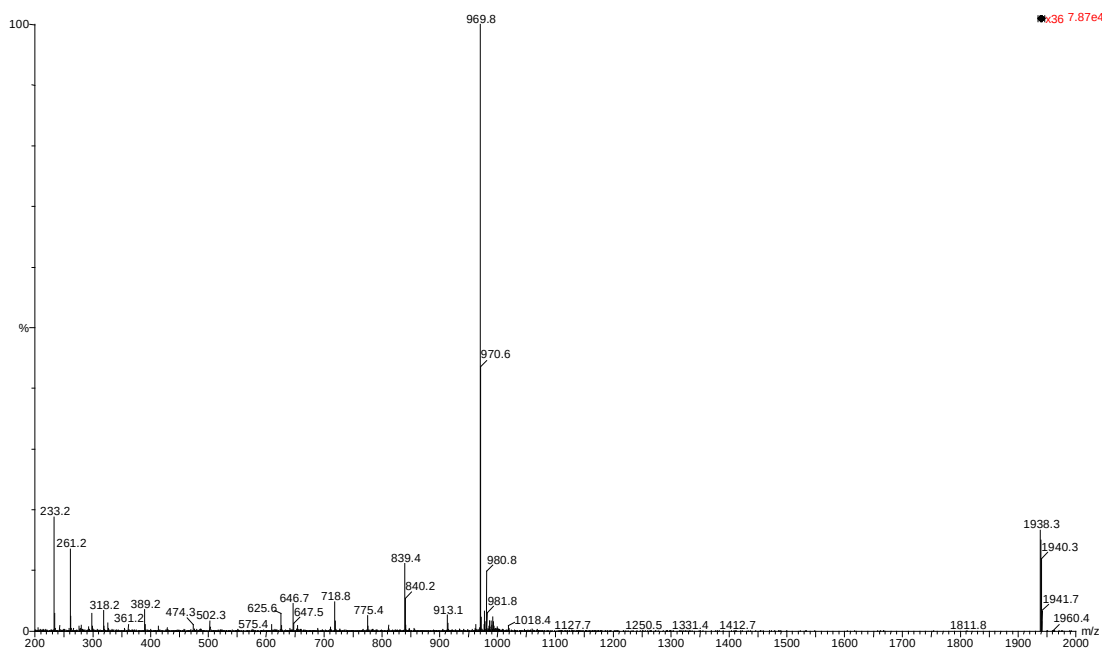


Figura 18. Espectro de massas do peptídeo purificado [Trp⁶]hy-a1.

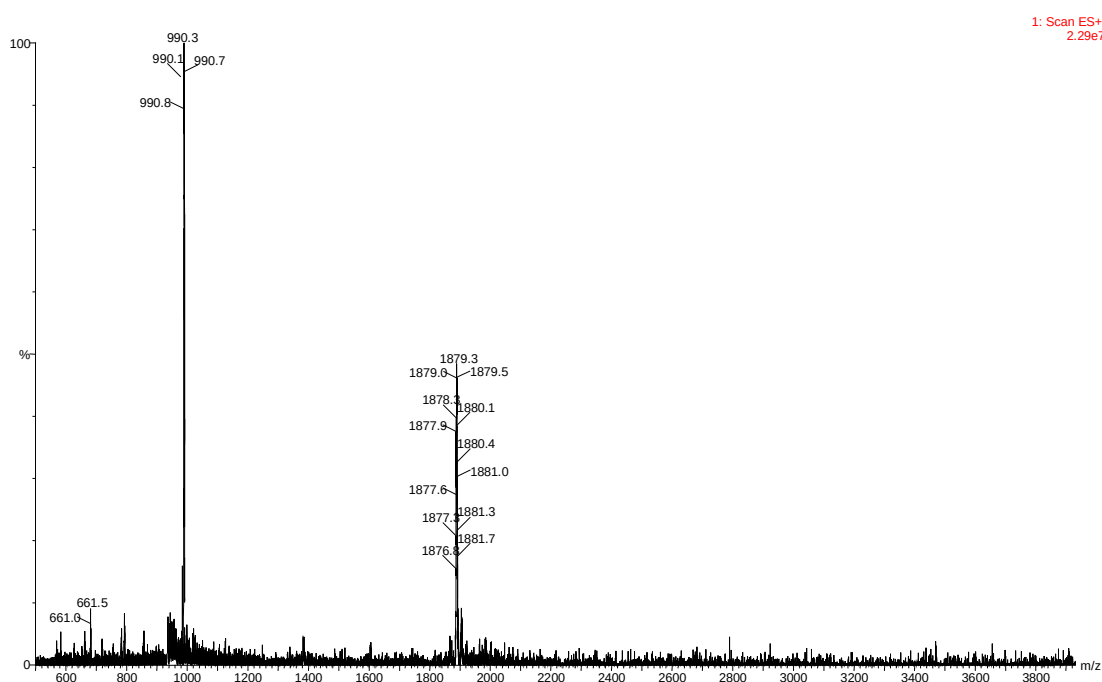


Figura 19. Espectro de massas do peptídeo purificado Acetil-[Trp⁶]hy-a1.

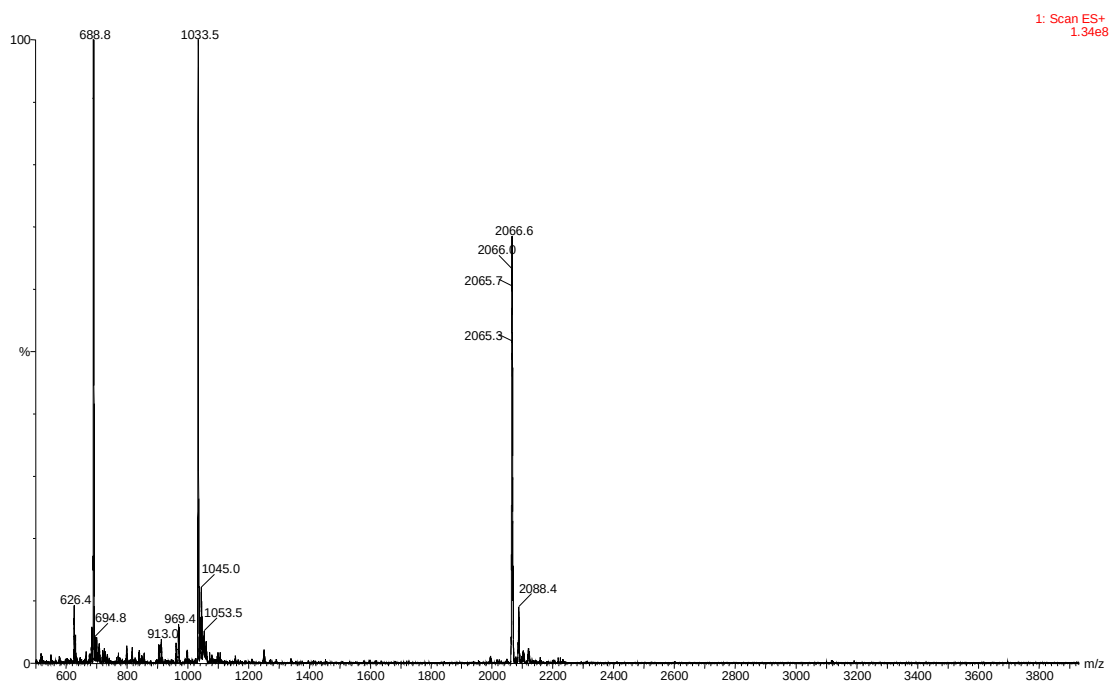


Figura 20. Espectro de massas do peptídeo purificado Lys-[Trp⁶]hy-a1.



Figura 21. Espectro de massas do peptídeo purificado Asp-[Trp⁶]hy-a1.

Para confirmar o sucesso da síntese, as amostras purificadas foram submetidas a análises de aminoácidos, de acordo com o procedimento descrito na seção 3.3. Isso nos possibilitou confirmar a composição de aminoácidos dos peptídeos obtidos na síntese, além de nos fornecer o conteúdo peptídico de cada fração obtida na etapa de purificação. A figura 22 mostra um aminograma de uma amostra padrão contendo os 17 aminoácidos mais comuns encontrados em proteínas. A asparagina e glutamina na clivagem ácida são convertidos em aspartato e glutamato, respectivamente, e o triptofano é degradado nas condições utilizadas na hidrólise. As análises de aminoácidos das amostras foram realizadas com sucesso e os perfis cromatográficos condizentes com o esperado (figura 23). Para calcular a proporção de aminoácidos da sequência e o conteúdo peptídico elaboramos uma planilha de cálculos matemáticos, utilizando o *software* Excel – *Microsoft* - que correlaciona o número de mmol obtido com, os valores do peso molecular do material, o tipo e quantidade de aminoácidos, a massa analisada e o volume de diluição usado com a relação área x concentração da amostra padrão.

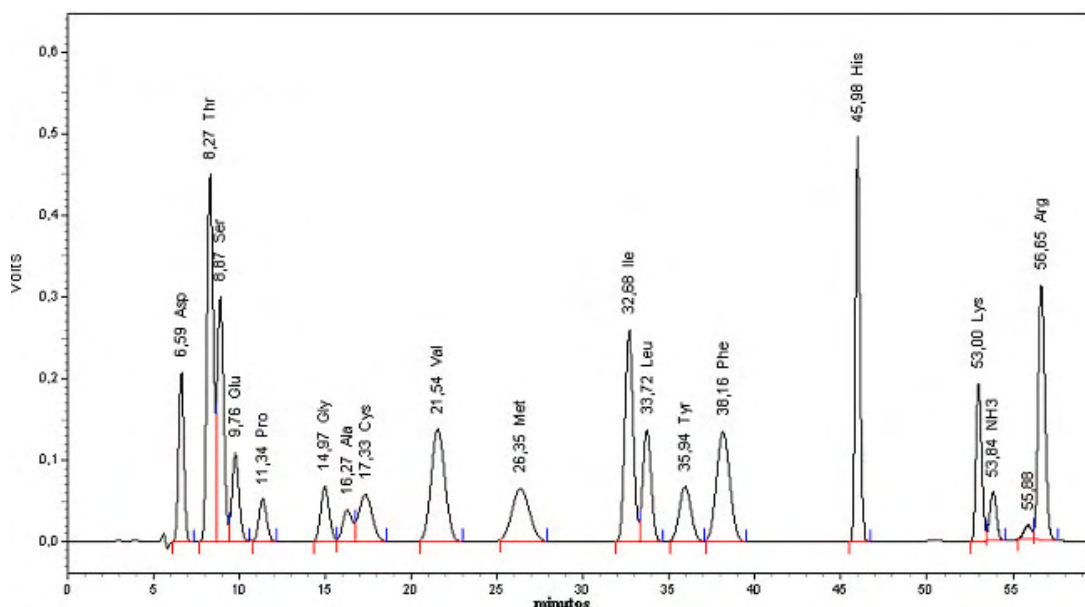


Figura 22. Aminograma obtido da análise de um padrão contendo 17 aminoácidos, em coluna de troca iônica acoplada a um detector de fluorescência (*exc*: 350 nm e *emiss*: 450 nm) com o método de derivatização pós-coluna (OPA).

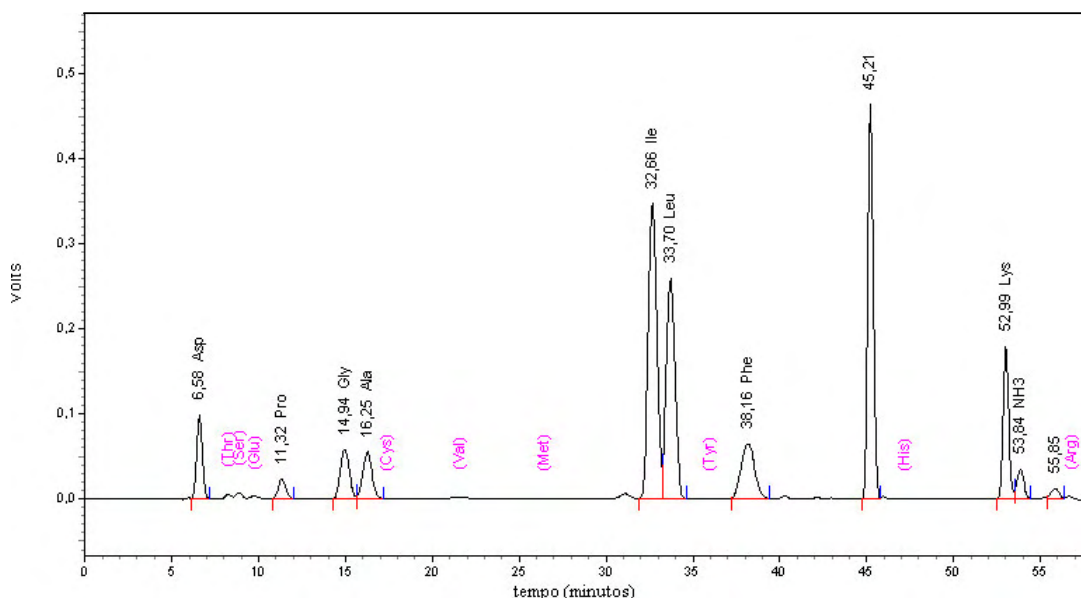


Figura 23. Aminograma obtido da análise do peptídeo hy-a1. Analisador de aminoácidos, com coluna de troca iônica acoplada a um detector de fluorescência (*exc*: 350 nm e *emiss*: 450 nm) com o método de derivatização pós-coluna (OPA).

Aproveitando os dados de HPLC obtidos realizamos uma comparação entre a polaridade das sequências peptídicas obtidas. Estudos anteriores mostraram que o tempo de eluição obtido por HPLC em fase reversa pode ser utilizado para medir a hidrofobicidade relativa de diferentes peptídeos (CHEN et al., 2005; LEE; HODGES, 2003). Desta forma os tempos de retenção de cada um dos análogos foram determinados e comparados entre si (figura 24). Neste caso, como esperado, a hidrofobicidade dos peptídeos seguiu a ordem: Acetil-[Trp⁶]hy-a1 > Asp-[Trp⁶]hy-a1 > [Trp⁶]hy-a1 = Hy-a1 > Lys-[Trp⁶]hy-a1. Estes resultados sugerem que a carga negativa da cadeia lateral do Asp neutraliza – em parte – a carga positiva da extremidade N-terminal. Ressaltamos que a substituição do resíduo de Leu por Trp não alterou a hidrofobicidade da molécula, pois a sequência sem esta substituição apresentou o mesmo tempo de retenção do peptídeo [Trp⁶]hy-a1.

Após a obtenção dos peptídeos, as amostras purificadas foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas de bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*.

A análise biológica nos fornece informações preciosas sobre o nível de interação com a membrana natural. É importante ressaltar que cada tipo de célula possui uma composição diferente de fosfolípidios em sua membrana plasmática (COOPER, 2000), e estas diferenças são refletidas no grau de interação entre o peptídeo e a superfície da membrana, mais

precisamente com a cabeça polar do fosfolipídio (“*head-group*”), que pode conter cargas positivas, negativas ou ambas as cargas (zwitteriônico).

Desta forma, a atividade antifúngica foi testada em *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* (todos envolvidos em diversos processos infecciosos). A atividade hemolítica foi determinada como parâmetro de toxicidade para células eucarióticas. Os valores da atividade antimicrobiana foram expressos em CIM (concentração inibitória mínima) e a capacidade hemolítica destes peptídeos expressa em HC₅₀ (concentração que causa 50% de hemólise).

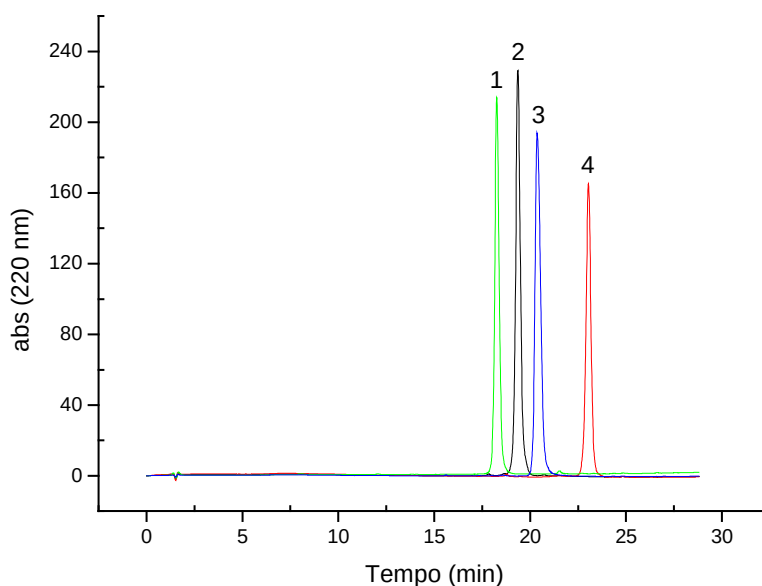


Figura 24. Cromatogramas obtidos por HPLC fase-reversa do hy-a1 e dos peptídeos análogos. As condições de análise foram: coluna de C18 (150 mm x 4,5 mm; tamanho de partícula 5 µm e dimensão de poro 300 Å). Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN, 5-95% de solvente B em 30 minutos com fluxo de 1,5 mL/min. Sequência de eluição: Lys-[Trp⁶]hy-a1 (1), [Trp⁶]hy-a1 (2), Asp-[Trp⁶]hy-a1 (3) e Acetil-[Trp⁶]hy-a1 (4).

Os dados de atividade hemolítica mostraram que, o peptídeo nativo hy-a1 possui uma alta capacidade de hemólise (CASTRO et al., 2009). O valor de HC₅₀ determinado para esta molécula foi de 18 µmol/L, enquanto que, todos os análogos apresentaram valores de aproximadamente 4 µmol/L (tabela 4), portanto, uma maior atividade hemolítica. Este aumento pode ser atribuído à presença do Trp na posição seis da sequência. Tem sido proposto que este resíduo aumenta a afinidade dos peptídeos pela membrana, participando na etapa inicial da interação e na agregação das cadeias (WIMLEY; WHITE, 1996; RIDDER et al., 2005).

A partir dos dados da tabela 4, observamos que o peptídeo hy-a1 é mais ativo contra bactérias Gram-positivas (CASTRO et al., 2009) comparativamente às Gram-negativas (*E. Coli*, *P. aeruginosa*), comportamento seguido também pelos análogos. No entanto, a subtração da carga positiva nesta extremidade (peptídeo acetilado) ou a adição de um grupo negativo (peptídeo com o resíduo Asp) maximizaram esta diferença. Isto mostra, uma maneira de, através de mudanças pontuais, tornar o peptídeo seletivo à somente uma família de bactéria. Somado a isto, o peptídeo que possui em sua cadeia lateral mais uma carga positiva - (Lys-[Trp⁶]hy-a1) - apresentou maior atividade antimicrobiana que o peptídeo nativo contra a maioria dos microrganismos. Este resultado está de acordo com outros trabalhos que demonstraram que a introdução de cargas positivas no peptídeo promove um aumento na atividade biológica do peptídeo (FRIEDRICH et al., 2001; URBAN et al., 2007; DUVAL et al., 2009). Entretanto, este resultado difere dos obtidos por Pazos e colaboradores (2003), que demonstrou em seu trabalho que a presença de resíduos de His na extremidade N-terminal reduziu a atividade hemolítica da esticolisina II. Estes resultados indicam uma correlação entre a presença de carga na região N-terminal e a eficácia de formação do poro. Ao contrário dos obtidos para as bactérias Gram-negativas, os peptídeos Asp-[Trp⁶]hy-a1 e Acetil-[Trp⁶]hy-a1 demonstraram ação antimicrobiana similar contra as cepas de bactérias Gram-positivas (4 para 8 µmol/L) em relação ao peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1.

Em relação à atividade antifúngica, o Acetil-[Trp⁶]hy-a1 foi menos eficiente contra este tipo de microrganismo que os outros análogos. Estes resultados sugerem que a carga na extremidade N-terminal do peptídeo hy-a1 desempenhe um importante papel na ação e seletividade antimicrobiana.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIMs) contra microrganismos e concentração necessária para produzir 50% de hemólise em eritrócitos humanos (HC₅₀).

Peptídeos	Bactérias				Eritrócitos Humanos
	Gram-negativa		Gram-positiva		
	E. coli	P. aeruginosa	S. aureus	B. subtilis	
	CIM (μmol/L)				
					HC ₅₀ (μmol/L)
Hy-a1	32	64	8	8	18
[Trp ⁶]hy-a1	32	32	8	8	4
Acetil-[Trp ⁶]hy-a1	128	>128	4	4	4
Lys-[Trp ⁶]hy-a1	4	16	4	4	4
Asp-[Trp ⁶]hy-a1	>128	>128	8	4	5
Peptídeos	Fungos			Cryptococcus neoformans	
	Candida albicans	Candida krusei	Candida parapsilosis		
	CIM (μmol/L)				
Hy-a1	17	17	67	34	
[Trp ⁶]hy-a1	4	4	16	8	
Acetil-[Trp ⁶]hy-a1	32	125	125	N/D*	
Lys-[Trp ⁶]hy-a1	8	8	8	8	
Asp-[Trp ⁶]hy-a1	16	16	16	16	

*N/D: não determinada

Para tentar compreender as diferenças entre as atividades antimicrobianas, a estrutura secundária destas moléculas foi analisada por meio da espectroscopia de CD em solução aquosa, na presença de trifluoretanol (TFE) 60% v/v em água, e em 10 mmol/L de LPC (detergente zwitteriônico) com pH em torno de 5, a 25 °C.

Os espectros de CD em solução aquosa dos peptídeos exibiram uma curva típica de estrutura desordenada (“random coil”) (figura 25a). Porém, o peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 apresentou em seu espectro duas bandas negativas em 196 e 201 nm, que pode ser uma indicação de agregação entre as cadeias. No entanto, dados parecidos não são encontrados na literatura sobre este tipo de perfil espectral, podendo estas bandas serem artefatos.

Na presença de TFE, um solvente indutor de estrutura (BUCK, 1998), e de micelas de LPC, modelo de membranas biológicas (figura 25b e 26), os espectros mostraram que os peptídeos se estruturaram, passando de uma forma desordenada para hélice alfa. Isto foi indicado pelo aparecimento de uma banda positiva em cerca de 190 nm e duas negativas em 208 e 222 nm (FASMAN, 1996). Os peptídeos [Trp⁶]hy-a1 e Acetil-[Trp⁶]hy-a1 mostraram maior capacidade de estruturação sob as condições experimentais testadas, isto é, maior teor de hélice alfa. Esta conclusão é baseada no artigo de Chen e colaboradores (1974) que desenvolveram uma equação relacionando a porcentagem de hélice alfa presente no

peptídeo/proteína, em função do valor encontrado para $[\theta]_{222}^{obs}$. Quanto maior o valor do $[\theta]_{222}^{obs}$, maior a porcentagem de hélice alfa presente na estrutura. Da mesma forma, podemos afirmar também que, o peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1 na presença de LPC apresentou o menor teor de hélice alfa. Isto pode estar relacionado com a presença de duas cargas positivas na extremidade N-terminal, que pode estar sob efeito de repulsão do dipolo inerente da hélice alfa formada, desestabilizando esta estrutura.

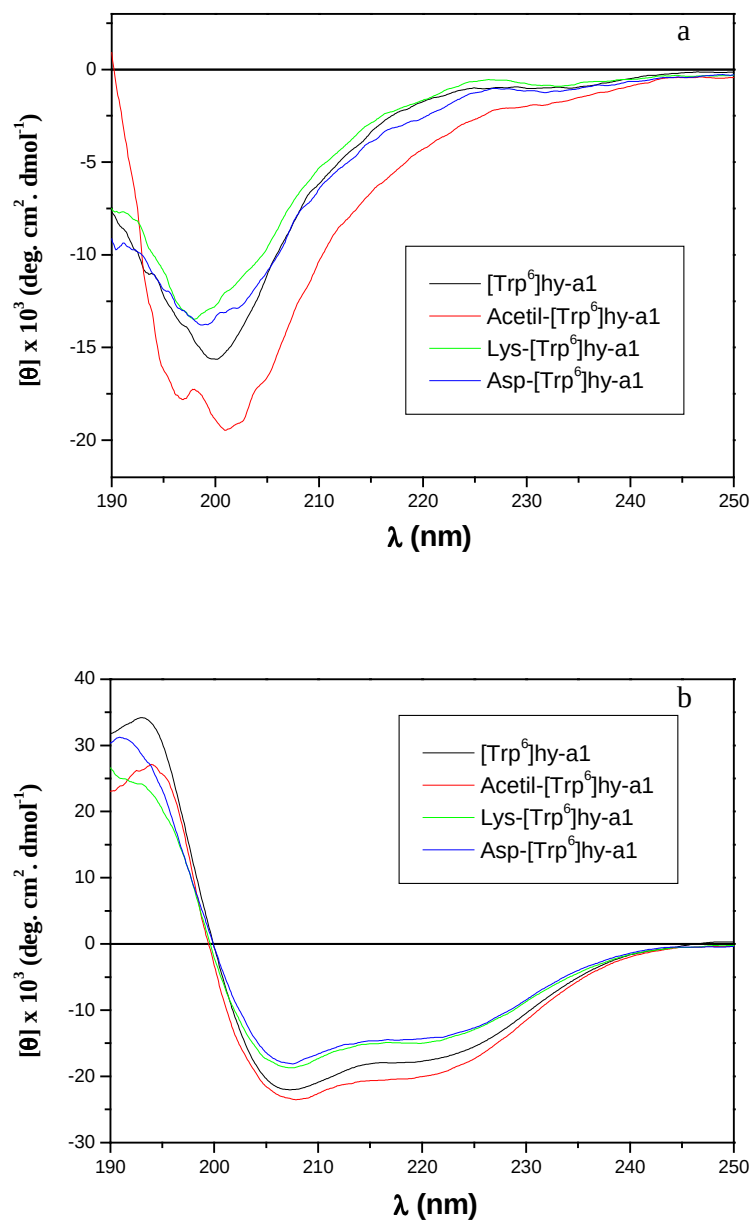


Figura 25. Espectros de CD para os peptídeos análogos. Os espectros foram obtidos em solução aquosa (a) e na presença de TFE 60% (v/v) (b). A concentração peptídica foi de 80 μ mol/L para todos os experimentos.

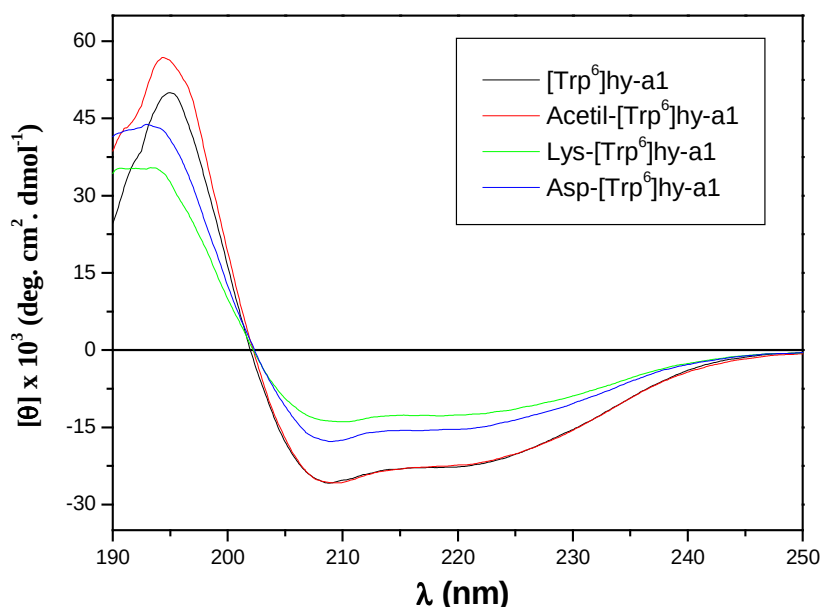


Figura 26. Espectros de CD para os peptídeos análogos. Os espectros foram obtidos na presença de 10 mmol/L LPC. A concentração peptídica foi de 80 $\mu\text{mol/L}$ para todos os experimentos.

Os dados obtidos demonstraram que não há uma correlação direta entre o teor de estrutura secundária obtido e as atividades antimicrobianas e hemolítica. Na verdade os resultados sugerem que outros fatores como a presença de cargas na extremidade N-terminal e a hidrofobicidade também são importantes no mecanismo de ação destes peptídeos.

Para obter maiores informações visando uma melhor explicação das diferentes atividades existentes entre os peptídeos, foram realizados experimentos de interação com vesículas unilamelares grandes (“large unilamellar vesicles” - LUVs) utilizando a espectroscopia de fluorescência. As vesículas são modelos de membrana mais completos, pois formam uma bicamada lipídica, ao contrário dos detergentes que formam micelas. Nestes estudos foram verificadas mudanças no espectro de emissão do Trp existente no peptídeo, com a adição de diferentes concentrações de LUVs. Como todos os peptídeos contêm um resíduo de Trp na posição 6, este pode sofrer alterações no comprimento de onda de máxima emissão quando migra de um meio polar para um apolar, resultando em um deslocamento deste valor para o azul (figura 27 e tabela 5), indicando interação com os modelos de membrana. Os espectros obtidos estão representados no Anexo 1.

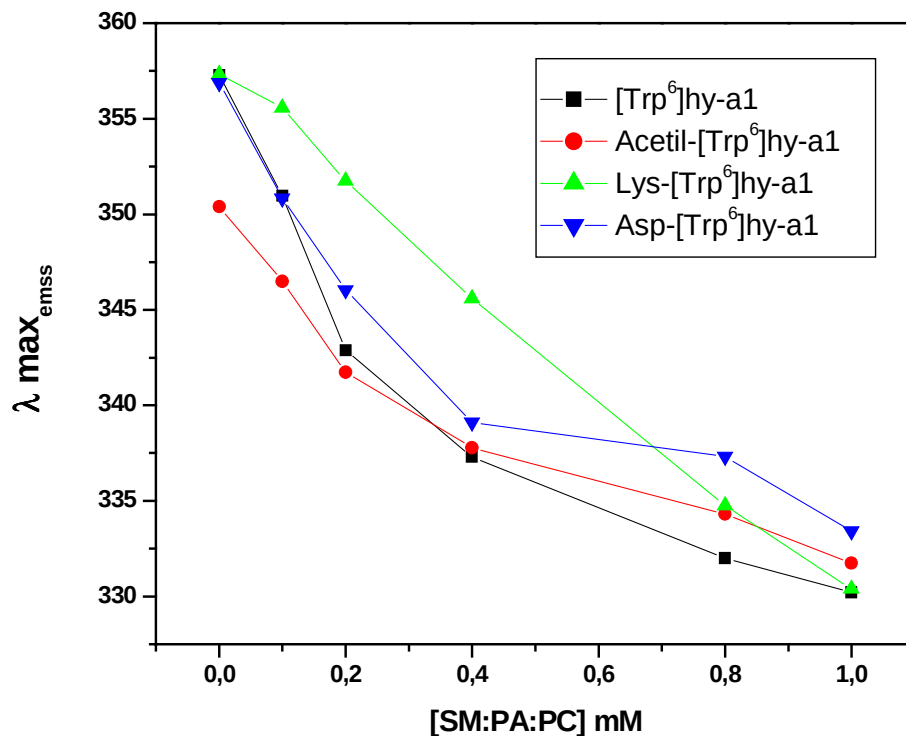


Figura 27. Variação do comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência dos peptídeos em função da concentração de vesículas de SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) em tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10 $\mu\text{mol/L}$.

O valor do comprimento de onda de emissão máxima obtida para os peptídeos em solução foi em torno de 357 nm, sugerindo que as estruturas não estão agregadas. Este resultado foi similar ao N-acetil-L-triptofanamida (NATA) em solução aquosa, molécula utilizada para representar um sistema sem agregação (WISHART; NIP, 1998). Estas informações foram confirmadas através dos ensaios de supressão de fluorescência utilizando acrilamida (figura 28 e tabela 5), no qual os valores de K_{SV} obtidos são próximos aos encontrados para o NATA em solução (WISHART; NIP, 1998). Os valores de K_{SV} podem ser utilizados para avaliar a agregação de um peptídeo ou sua inserção na membrana. Somente o peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 mostrou, em solução, um menor valor de K_{SV} , 13,5 M^{-1} , sendo isto uma evidência de agregação/estruturação, coerente com os dados obtidos utilizando o CD (figura 25a).

Tabela 5. Comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência do Trp e valores de K_{SV} para os peptídeos análogos na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ em tampão Tris ou na presença de 1 mmol/L de SM/PA/PC em pH 7,4 a 25 °C.

Peptídeos	Emissão Max Trp (nm)		$K_{sv} (M^{-1})$	
	Tampão Tris	SM:PA:PC	Tampão Tris	SM:PA:PC
[Trp ⁶]hy-a1	357	330	20,3	4,7
Acetil-[Trp ⁶]hy-a1	350	332	13,5	1,7
Lys-[Trp ⁶]hy-a1	357	330	20,0	2,2
Asp-[Trp ⁶]hy-a1	357	333	25,1	2,9

Na presença de vesículas, o comprimento máximo de emissão dos peptídeos foi deslocado para a região de maior energia – menor comprimento de onda (tabela 5). Este fenômeno é conhecido como “blue shift” e indica que o triptofano da cadeia está passando de um ambiente polar para um apolar, indicando a interação do peptídeo com a região apolar da bicamada lipídica. Esta interação também é observada nos estudos de supressão de fluorescência na presença de vesículas, onde foram obtidos menores valores de K_{SV} (Anexo 1). A acrilamida possui caráter polar e não consegue penetrar na bicamada lipídica, limitando assim a sua capacidade de supressão (figura 28). Curiosamente, a menor interação encontrada neste experimento foi para o [Trp⁶]hy-a1, maior valor de K_{SV} , indicando maior exposição da cadeia lateral do resíduo de Trp deste peptídeo ao solvente (figura 28).

Embora todos os peptídeos tenham demonstrado capacidade de estruturação e de interação com miméticos de membranas diferentes, estas não mostraram uma correlação direta com as atividades biológicas obtidas.

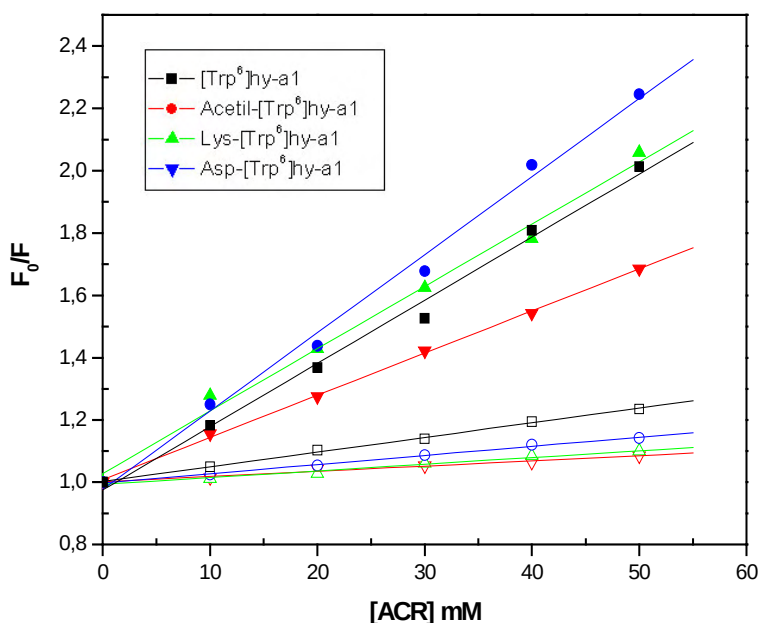


Figura 28. Gráfico da relação de Stern-Volmer obtidos nos ensaios de supressão de fluorescência, variando a concentração de acrilamida para os peptídeos [Trp⁶]hy-a1 (■ e □), Acetil-[Trp⁶]hy-a1 (▼ e ▽), Lys-[Trp⁶]hy-a1 (▲ e △) e Asp-[Trp⁶]hy-a1 (● e ○). Os símbolos em preto e em branco indicam a presença e a ausência de vesículas, respectivamente. As concentrações de peptídeos e vesículas utilizadas foram de 10 µmol/L e 1 mmol/L, respectivamente.

Estudos anteriores que relacionaram a estrutura com a atividade dos PAMs, mostraram que a capacidade hemolítica dos peptídeos está relacionada com fatores como a alta hidrofobicidade, helicidade e anfipaticidade (CHEN et al., 2005). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que estas correlações não são totalmente precisas. Quando adicionado um resíduo de lisina na região N-terminal, observou-se por estudos de CD que, houve uma redução no teor na hélice alfa do peptídeo na presença de miméticos de membrana, e no entanto, este análogo apresentou um aumento na atividade biológica, demonstrando que outras propriedades são relevantes. Este fato pode ser explicado em parte pela presença do número de cargas na extremidade N-terminal e do caráter hidrofílico da molécula. Neste caso, embora não seja suficiente para explicar todas as diferenças na atividade, a hidrofiliçidade está mais correlacionada com atividade biológica do peptídeo. Desta forma, acreditamos que vários parâmetros devam ser considerados simultaneamente na relação com a atividade biológica.

O contraste dos resultados obtidos para o Acetil-[Trp⁶]hy-a1 em eritrócitos humanos, bactérias e fungos indicou diferentes mecanismos de formação de poros. Esta colocação está de acordo com Chen e colaboradores (2005), que propuseram mecanismos de formação de poro dependentes da composição da membrana concluindo e que o modo de ação seria

diferente para células eucarióticas e procarióticas. Em células eucarióticas o modelo aplicado seria do tipo “barrel-stave”, o que promoveria a lise de eritrócitos humanos. Em contraste, para células procarióticas, a lise ocorre por meio da ação detergente do peptídeo - mecanismo “carpet like”.

A capacidade do peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 em formar sistemas agregados em solução, que poderia facilitar o mecanismo de barril, encontrada nos ensaios de CD e fluorescência, poderia estar correlacionado com a fraca atividade antimicrobiana e forte capacidade hemolítica deste peptídeo.

Adicionalmente, os resultados obtidos por fluorescência e CD estão de acordo com os modelo de formação de poro em monocamadas proposto por Lopes e colaboradores (2009) em *Saccharomyces cerevisiae*. Neste modelo, os peptídeos desorganizados seriam atraídos pelas cargas negativas dos fosfolipídeos promovendo a formação de uma hélice alfa anfipática. Depois, o peptídeo permaneceria associado com a superfície da vesícula e, ao mesmo tempo, os resíduos da região N-terminal seriam inseridos entre as caudas apolares dos fosfolipídios, promovendo a formação do poro e seu rompimento. Neste estudo foi possível ver as mudanças conformacionais do peptídeo e a interação inicial com as vesículas. Este modelo pode esclarecer a baixa atividade do Acetil-[Trp⁶]hy-a1 e Asp-[Trp⁶]hy-a1, onde as interações hidrofóbicas entre a região N-terminal e cadeia acil dos fosfolipídios poderiam ser mais intensas, estabilizando este tipo de interação e dificultando a mudança conformacional e a formação do poro.

Finalmente, a diferença entre as atividades encontradas nas bactérias Gram-negativas e positivas pode estar relacionada com a composição da membrana celular de cada sistema biológico testado, mais especificamente de lipopolissacarídeos – influenciando o processo de interação e formação de poro.

Desta maneira, os resultados demonstraram que a região N-terminal do peptídeo hy-a1 desempenha um papel importante na atividade biológica, fato estudado de maneira criteriosa neste trabalho.

4.2. Capítulo II

Efeitos de modificações pontuais na região N-terminal e na face apolar da hélice alfa anfipática.

De acordo com os dados de espectroscopia de CD e predição de estrutura, o hy-a1 tem como principal estado conformacional na membrana a forma de uma hélice alfa anfipática (CASTRO et al., 2009). Para investigar a importância desta estrutura na atividade biológica do hy-a1, modificações pontuais foram realizadas e os possíveis efeitos biológicos e estruturais, ocasionados a partir da desestabilização da hélice alfa anfipática, foram avaliados. Para isto, duas alterações foram realizadas (tabela 6): 1) introdução de um segundo resíduo de Pro na posição 7 da sequência endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1. A prolina é conhecida indutora de dobra em proteínas, e a presença de 2 resíduos subsequentes seria um fator que iria desestruturar a hélice alfa existente no peptídeo; e 2) substituição do resíduo de leucina na posição treze, localizado na face apolar da hélice alfa anfipática, por um resíduo de lisina (figura 29) [Trp⁶, Lys¹³]hy-a1. A substituição pontual de resíduos nas faces apolares da hélice alfa anfipática dos PAMs promove alterações no mecanismo de ação dos peptídeos devido aos efeitos ocasionados nas relações de hidrofobicidade/hidrofilicidade, helipticidade e anfipaticidade da estrutura (CHEN et al., 2005). Ressaltamos que, além destas substituições, os resíduos de leucina das posições quatorze e seis, foram substituídos, respectivamente, por resíduos de triptofano, para realizarmos estudos de interação com miméticos de membrana por meio da fluorescência. Destacamos que dois peptídeos contendo somente a substituição da leucina por triptofano mostraram atividades antibacterianas e antifúngicas similares a do peptídeo selvagem, mostrando que esta substituição não altera negativamente a atividade biológica desta sequência (dados do peptídeo [Trp¹³]hy-a1 não mostrados), validando seu uso.

Tabela 6. Sequência de aminoácidos e algumas características dos peptídeos.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos	Tempo de Retenção ^a (min)	Carga ^b	Teor de hélice alfa (%) ^c	M _r (g/mol)
Endo-Pro ^{7a} [Trp ¹⁴]hy-a1	IFGAILP P LALGA W KNLIK	17,6	+3	44	2034,6
[Trp ⁶ ,Lys ¹³]hy-a1	IFGAI W PLALGA K KNLIK	16,1	+4	53	1952,5

^a Valores obtidos por HPLC de fase reversa usando método gradiente de análise: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Os peptídeos foram eluídos sob fluxo de 1,5 mL/min e detectados a 220 nm.

^b Para um pH ~ 5.

^c Obtido de acordo com a equação descrita na seção 3.7 na presença de 10 mmol/L de LPC.

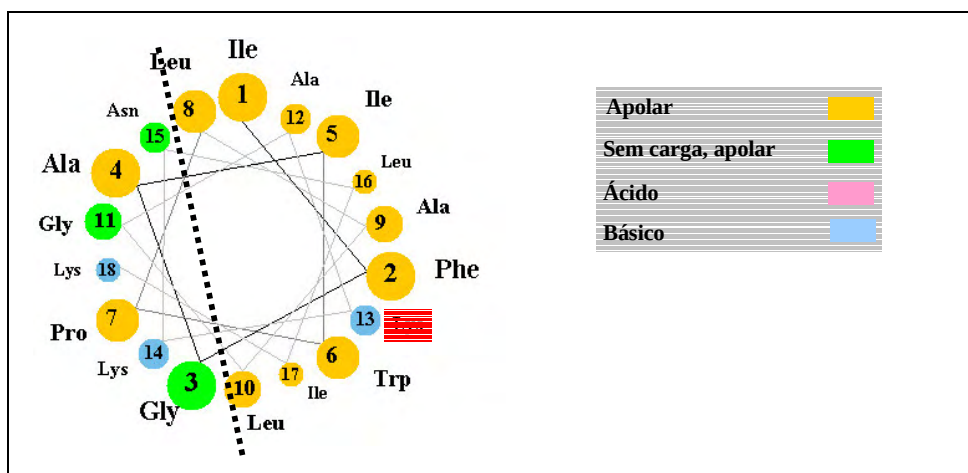


Figura 29. Helical wheel do peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1, destacando a alteração realizada na face apolar da hélice alfa anfipática.

Para a síntese do peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1, partiu-se de uma escala de 0,2 mmol de resina, cuja massa era de 600 mg. A síntese foi realizada até a posição 13 da sequência, na qual foi interrompida e dividida em duas partes de 0,1 mmol. Em uma das partes o resíduo de leucina foi substituído por um resíduo de Trp, e após isso, continuou-se com a sequência até a posição 7, onde um resíduo de Pro foi adicionado a sequência, indo até o final da síntese dando origem ao peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1. Na outra fração de 0,1 mmol de resina, o resíduo de leucina da posição 13, foi substituído por um resíduo de lisina, continuando com a síntese até a posição 6, onde ocorreu a substituição de um resíduo de leucina por um de triptofano. Ao final dessa síntese, obteve-se o peptídeo [Trp⁶, Lys¹³]hy-a1. As resinas, após secagem, foram clivadas de acordo com o protocolo descrito na seção 3.1.

Ao final da síntese do peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 foram obtidos 712 mg de resina, sendo 350 mg desta peptil-resina clivados, obtendo-se 204 mg de material bruto. Após o processo de purificação foi obtida uma fração de 44 mg com alto teor de pureza acima de 95% (figura 30) e outras frações com menor pureza, que foram armazenadas devido a presença de pequenas impurezas contidas na amostra.

A síntese do peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 forneceu 430 mg de peptil-resina e 230 mg foram clivadas, estocando o restante do peptídeo-resina. A clivagem rendeu 106 mg de peptídeo bruto com mais de 85% de grau de pureza, sendo que toda esta massa foi purificada, obtendo-se 52 mg de uma fração com mais de 98% de grau de pureza (figura 31).

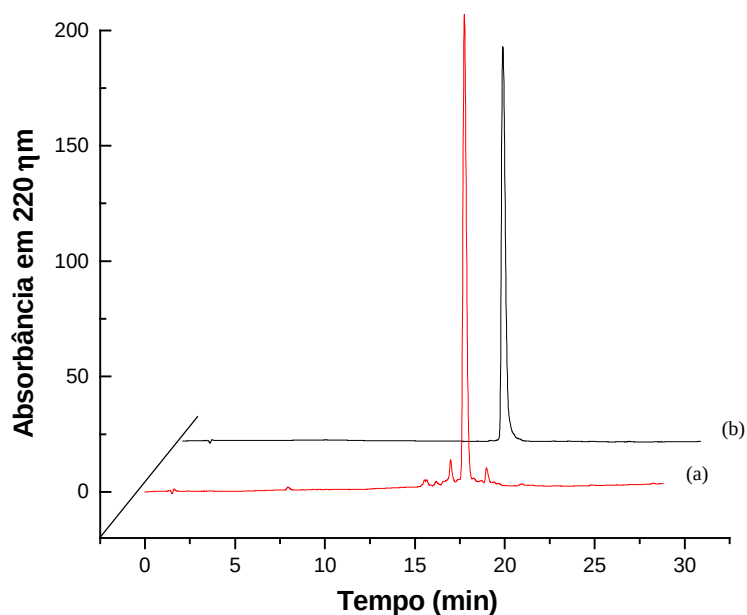


Figura 30. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. Endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1: bruto (a) e fração purificada (b), com 85% e 98% de pureza, respectivamente.

Os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas e mostraram resultados coerentes com o teórico esperado. Os espectros de massas obtidos dos peptídeos endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 mostraram peso molecular teórico de 2036 (pico de 1019 com Z = +2) e 1952 (carga +1), respectivamente (figuras 32 e 33), confirmando a obtenção do material desejado.

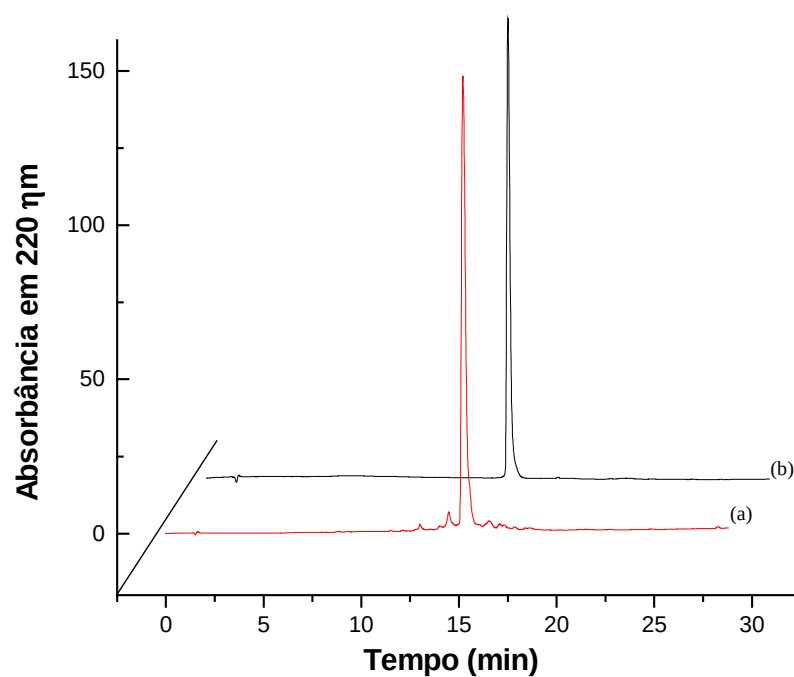


Figura 31. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$: (a) bruto e (b) após purificação por HPLC. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA/ H_2O e B: 0,036% TFA/ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$: bruto (a) e fração purificada (b), com 85% e 98% de pureza, respectivamente.

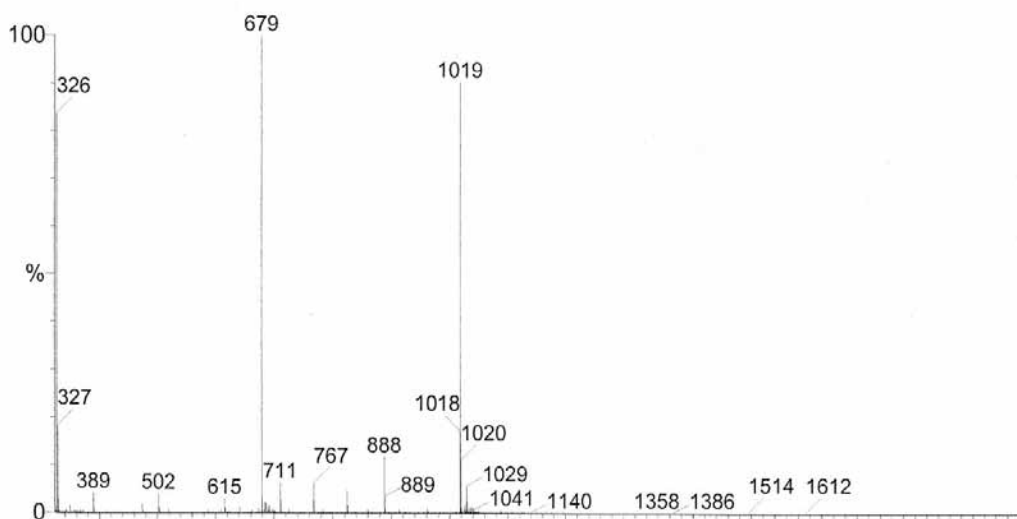


Figura 32. Espectro de massas do peptídeo purificado endo- $\text{Pro}^{7a}[\text{Trp}^{14}]\text{hy-a1}$.

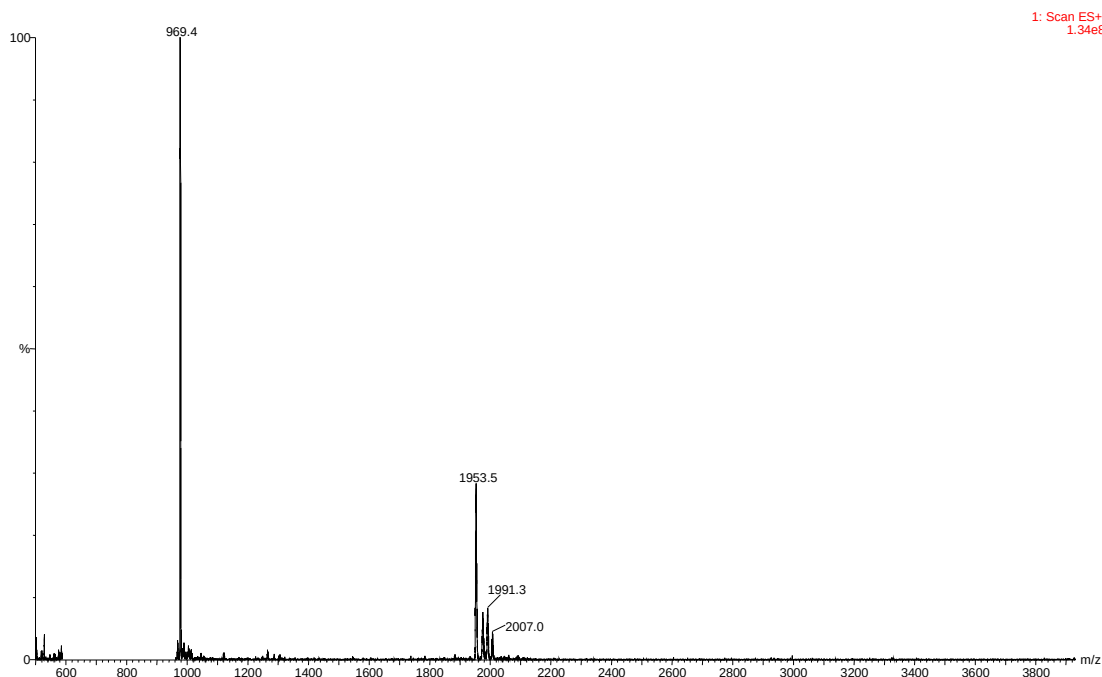


Figura 33. Espectro de massas do peptídeo purificado [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1.

A análise biológica dos peptídeos foi realizada de forma análoga aos já realizados neste trabalho, e os resultados estão sumarizados na tabela 7. De um modo geral, os dois novos análogos tiveram a sua atividade biológica reduzida. Nos ensaios com eritrócitos, ambos peptídeos perderam totalmente a sua capacidade hemolítica, mesmo em concentrações elevadas de peptídeos (acima de 256 $\mu\text{mol/L}$). Embora o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 teve sua atividade reduzida, porém foi capaz de inibir o crescimento na maioria das cepas bacterianas e fúngicas utilizadas nos experimentos. Curiosamente, o peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 tornou-se específico para fungos, sendo completamente inativo em bactérias.

Adicionalmente, também foram realizados estudos de dicroísmo circular sob as mesmas condições de análise apresentadas anteriormente. Os resultados obtidos estão colocados na figura 34 e 35 juntamente com os do peptídeo [Trp⁶]hy-a1 para uma melhor comparação. Os espectros de CD, em solução aquosa com pH ~ 5 , apresentaram uma banda negativa em aproximadamente 198 nm, que corresponde uma estrutura em “*random coil*” (figura 34a). Os espectros realizados na presença de TFE/H₂O 60% (v/v) demonstraram que ambos análogos adotam uma estrutura em hélice alfa (figura 34b), entretanto, com menor teor em relação ao peptídeo nativo (CASTRO et al., 2009) e ao [Trp⁶]hy-a1 (figura 34b).

Tabela 7. Concentração inibitória mínima (CIMs) contra microrganismos e concentração necessária para produzir 50% de hemólise em eritrócitos humanos (HC₅₀).

Peptídeos	Bactérias				Eritrócitos Humanos
	Gram-negativa		Gram-positiva		
	E. coli	P. aeruginosa	S. aureus	B. subtilis	
	CIM (µmol/L)				
Endo-Pro ^{7a} [Trp ¹⁴]hy-a1	128	64	inativo	N/D	inativo
[Trp ⁶ ,Lys ¹³]hy-a1	inativo	inativo	inativo	inativo	inativo

Peptídeos	Fungos			
	Candida albicans	Candida krusei	Candida parapsilosis	Cryptococcus neoformans
	CIM (µmol/L)			
Endo-Pro ^{7a} [Trp ¹⁴]hy-a1	122	61	inativo	31
[Trp ⁶ ,Lys ¹³]hy-a1	64	16	64	32

Para analisar a estrutura dos peptídeos em miméticos de membrana foi utilizado o d_{38} -DPC, este detergente, por ser deuterado, permitiu também estudos por meio da RMN. Os resultados dos espectros de CD obtidos neste detergente demonstraram que o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 possui menor teor de hélice, seguido pelo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 e [Trp⁶]hy-a1 (figura 35), demonstrando que as modificações realizadas no hy-a1 afetaram de forma direta a capacidade destes peptídeos em adotarem estrutura em hélice alfa.

Como ocorreu também a diminuição de sua atividade biológica, os dados mostraram que, a presença desta conformação tridimensional de caráter anfipático desempenha um importante papel no processo de formação do poro destas moléculas.

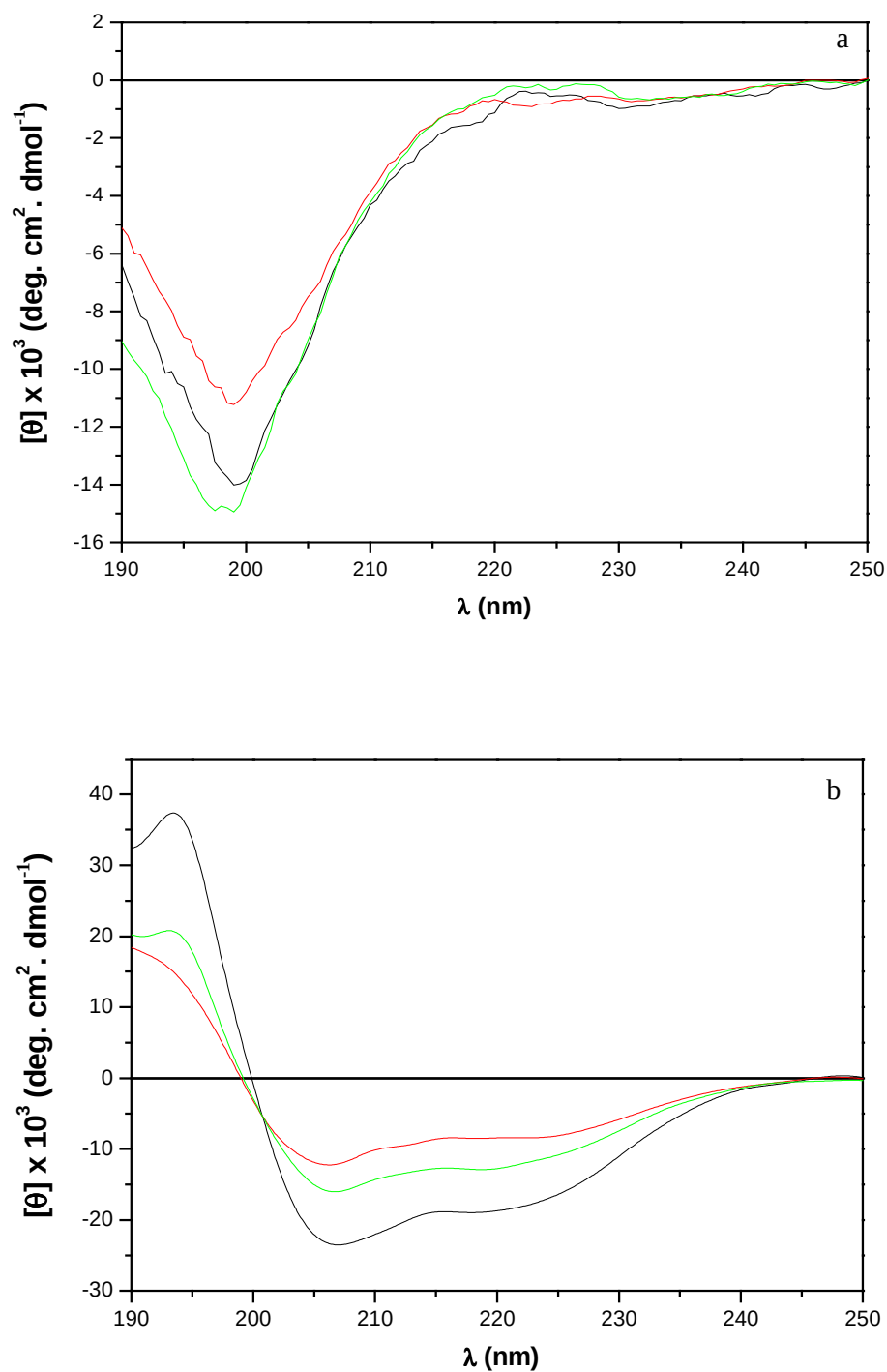


Figura 34. Espectros de CD para os peptídeos [Trp⁶]hy-a1 (—), endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 (—) e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos em solução aquosa (a), na presença de TFE 60% (v/v) (b). A concentração peptídica foi de 80 $\mu\text{mol/L}$ para todos os experimentos.

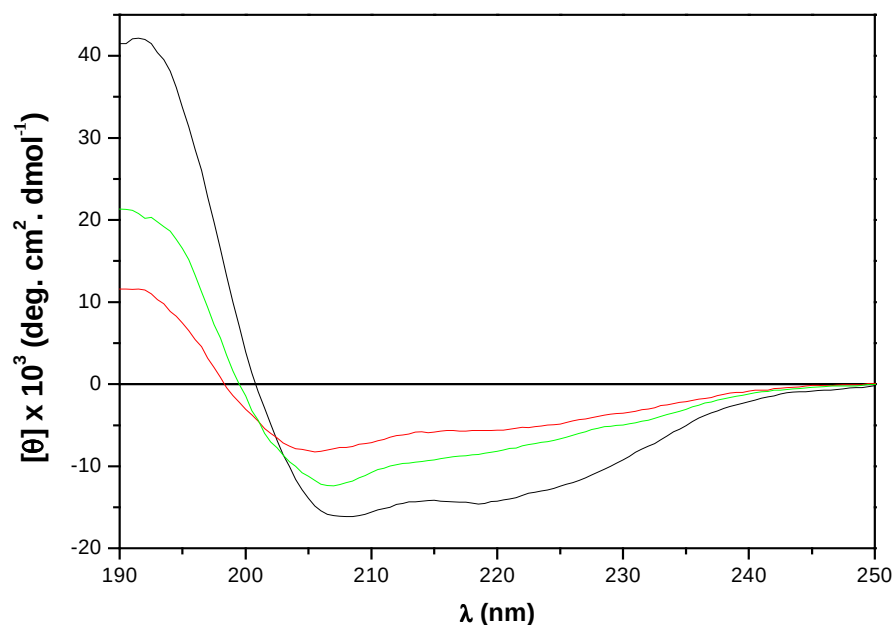


Figura 35. Espectros de CD para os peptídeos [Trp⁶]hy-a1 (—), endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 (—) e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos na presença de 10 mmol/L _{d38}-DPC. A concentração peptídica foi de 80 μmol/L para todos os experimentos.

Estudos complementares de CD foram realizados em pH 7,4 (tampão Tris.HCl) utilizando vesículas como modelos de membrana, um sistema mais completo e parecido com a membrana celular. Como o observado em solução aquosa (figura 34a), na presença de tampão Tris.HCl 0,01 mol/L pH 7,4 os peptídeos não adotaram estrutura secundária (figura 36a). No entanto, ao introduzirmos no meio 0,8 mmol/L de vesículas, o peptídeo [Trp⁶]hy-a1 adotou uma estrutura em hélice alfa, como foi possível observar no espectro da figura 36b. Para o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 também observou-se a formação de uma hélice alfa, no entanto, com um menor teor desta estrutura. Diferentemente, o peptídeo [Trp⁶, Lys¹³]hy-a1 não demonstrou mudança na forma do espectro quando comparado com o obtido na ausência de vesículas, permanecendo com uma estrutura desorganizada mesmo na presença deste mimético de membrana (figura 36b). Este último resultado, foi interessante, pois mostra um resultado completamente diferente do encontrado para a interação com micelas, onde este peptídeo mostrou a formação nítida de hélice alfa. Isto mostra, uma dependência da estrutura com o modelo de membrana utilizado.

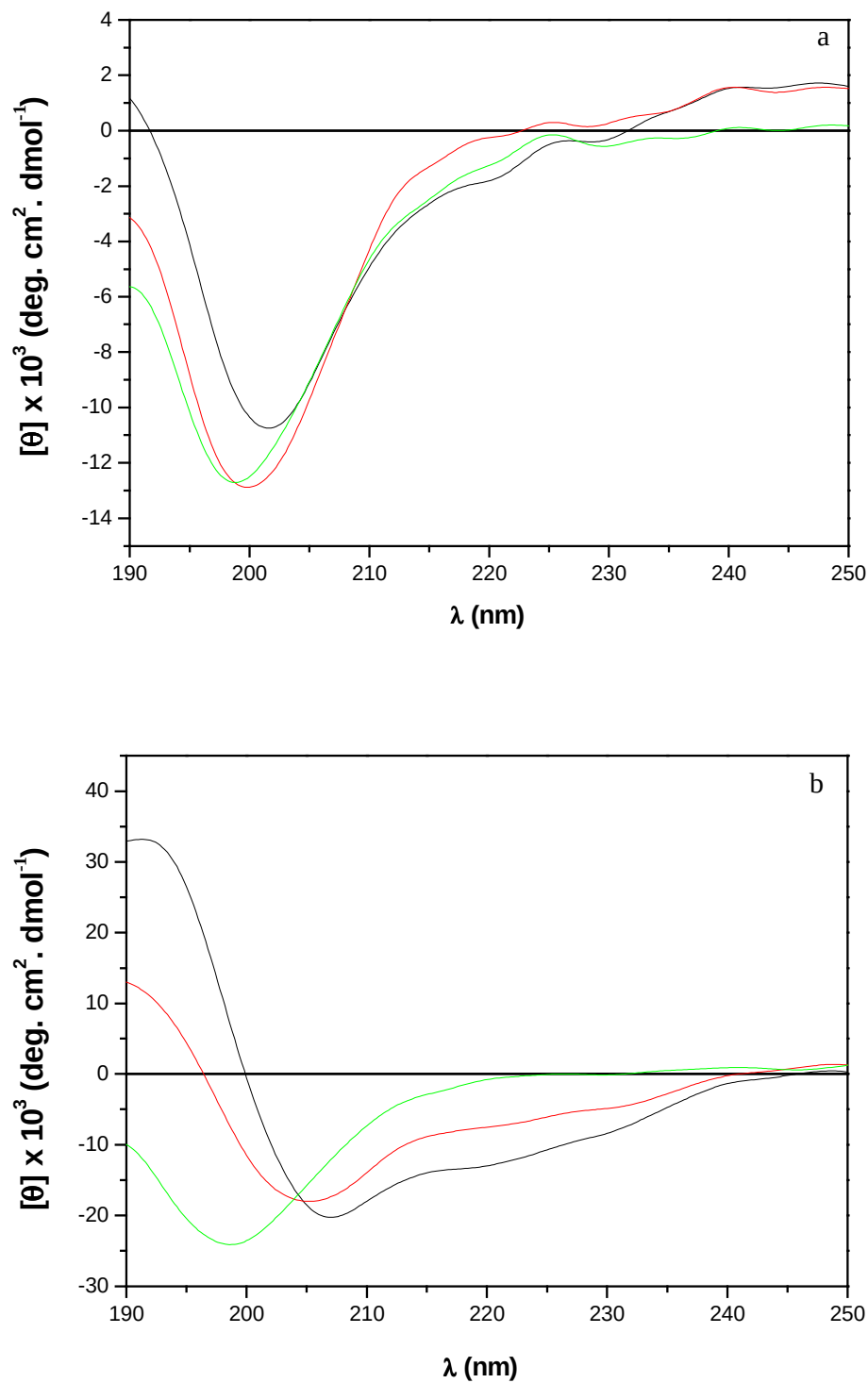


Figura 36. Espectros de CD para os peptídeos [Trp⁶]hy-a1 (—), endo-Pro⁷[Trp¹⁴]hy-a1 (—) e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 (—). Os espectros foram obtidos em solução tampão Tris.HCl 0,01 mmol/L pH 7,4 (a) e na presença de 0,8 mmol/L de vesículas SM/PA/PC (b). A concentração peptídica foi de 80 $\mu\text{mol/L}$ para todos os experimentos.

Para encontrar mais informações que nos possibilitasse compreender o efeito da presença da hélice alfa na atividade biológica destes peptídeos, realizamos estudos de permeabilização utilizando vesículas carregadas com carboxifluoresceína. Os resultados das cinéticas de permeabilização estão demonstrados na figura 37. Neste ensaio, foi possível observar que a capacidade do peptídeo de permeabilizar as vesículas foram diretamente relacionadas à capacidade que cada um dos análogos possui em adotar estrutura de hélice alfa neste modelo de membrana. Os resultados obtidos podem ser extrapolados para a capacidade hemolítica destas moléculas, pois neste experimento utilizamos vesículas contendo os principais lipídios existentes na membrana externa de um eritrócito (NELSON; LEHNINGER, 2008).

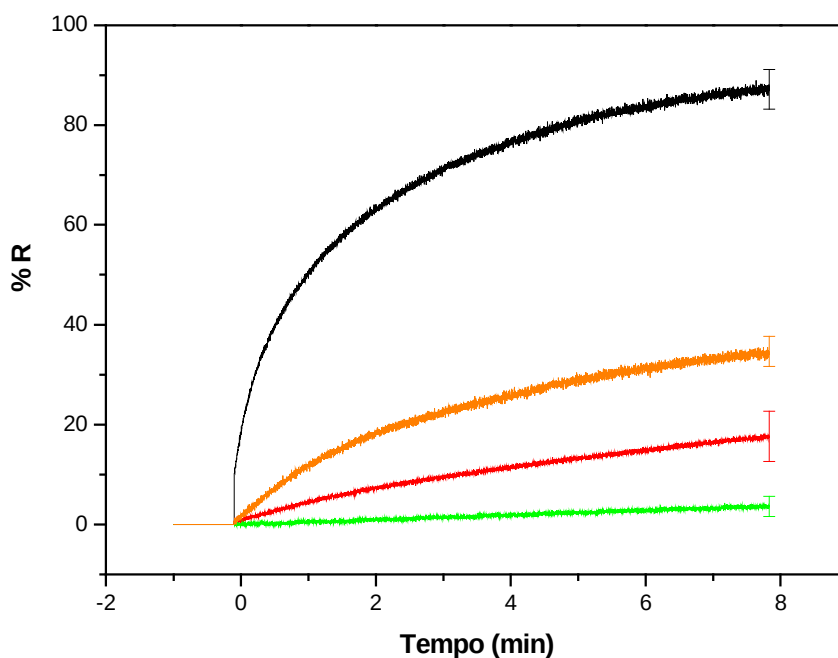


Figura 37. Gráfico da cinética da liberação CF (%) de vesículas de SM/PA/PC após a adição de 4 $\mu\text{mol/L}$ de peptídeo hy-a1 (—) [Trp⁶]hy-a1 (—), endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 (—) e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 (—). A porcentagem de liberação de CF foi calculada de acordo com a equação descrita no item 3.7.2. Os experimentos foram realizados em triplicatas a 25 °C utilizando um sistema de controlador de temperatura Peltier.

Para obter maiores informações acerca da topologia e da região da sequência que está mais inserida na membrana, estudos de fluorescência foram realizados usando d_{38} -DPC e LUVs de mesma composição do bloco anterior (tabela 8). Como esperado, nos experimentos em solução aquosa, os valores obtidos mostraram os peptídeos livres neste meio, possuindo valores de comprimento de onda de máxima emissão e de K_{SV} semelhantes ao da triptofanamida em solução aquosa. No entanto, a adição de modelos de membrana no sistema afetou diferentemente cada um dos peptídeos. Na presença de vesículas o [Trp⁶]hy-a1

apresentou um $\Delta\lambda$ negativo no comprimento de onda de máxima emissão de 27 nm, indicando que o peptídeo interagiu com a membrana. Entretanto, isso não é observado para o $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$, que não demonstrou sinais de interação com a vesícula (tabela 8), não apresentando uma variação significativa no comprimento de onda de máxima emissão. Além disso, os estudos de supressão de fluorescência utilizando acrilamida na presença de vesículas, apresentaram valores de K_{SV} de 4,7 e 17,3 M^{-1} para os peptídeos $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ e $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$, respectivamente, indicando que no peptídeo contendo lisina não há inserção em LUVs. Os resultados obtidos para o peptídeo endo-Pro^{7a} $[\text{Trp}^{14}]\text{hy-a1}$ demonstraram um $\Delta\lambda$ negativo de 24 nm no comprimento de onda de máxima emissão após a adição de vesículas, indicando que ocorreu interação do peptídeo com o modelo de membrana. Somando a isso, o resultado de supressão utilizando acrilamida indicou que esta região foi menos exposta ao solvente, sugerindo que o triptofano foi inserido na bicamada lipídica.

Os resultados obtidos por meio da fluorescência utilizando $\text{d}_{38}\text{-DPC}$ como mimético de membrana (tabela 8), mostraram que os peptídeos se comportaram de maneiras distintas. O peptídeo endo-Pro^{7a} $[\text{Trp}^{14}]\text{hy-a1}$ apresentou a região do triptofano mais inserida na fase apolar da micela, fato observado pela variação negativa do comprimento de onda de máxima emissão (23 nm) e pelo baixo valor de K_{SV} (2,6 M^{-1}). Os peptídeos $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ e $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$ apresentaram maior exposição ao solvente, entretanto, estas duas sequências, assim como observado em estudos utilizando vesículas, mostraram diferentes graus de inserção. O peptídeo contendo a lisina apresentou menor inserção na face apolar da micela. Isto é evidenciado por meio da variação dos valores do comprimento de onda de máxima emissão e de K_{SV} , os quais foram de 20 nm e 4,6 M^{-1} , respectivamente, para o peptídeo $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$; e de 13 nm e 9,5 M^{-1} para o $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$.

Tabela 8. Emissão máxima de fluorescência do Trp e valores de K_{SV} para os peptídeos análogos na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ em pH 7,4 a 25 °C.

Peptídeos	Emissão Max Trp (nm)			K_{SV} (M^{-1})			
				ACR		KI	
	H ₂ O	vesículas	DPC	H ₂ O	vesículas	H ₂ O	DPC
$[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$	357	330	337	17,7	4,7	13,9	4,9
Endo-Pro ^{7a} $[\text{Trp}^{14}]\text{hy-a1}$	356	332	333	13,5	4,0	10,0	2,6
$[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$	357	356	344	15,5	17,3	11,9	9,5

No entanto, os resíduos de triptofano estão em posições diferentes da sequência, e as metodologias de fluorescência e CD utilizadas neste trabalho não permitem a obtenção de maiores detalhes sobre a estrutura do peptídeo, as estruturas tridimensionais destes três peptídeos foram determinadas por meio da RMN (WÜTHRICH, 1986). Esta técnica permite a obtenção de informações detalhadas da estrutura tridimensional do peptídeo. Neste caso, contamos com a colaboração do Professor Alberto Spisni e Dra. Thelma Pertinhez, da Università degli Studi di Parma, e do programa de bolsa CAPES-PDEE – Programa de Doutorado com Estágio no Exterior.

Nesta etapa, todos os experimentos foram realizados no *Centro Interdipartimentale Misure - CIM “Giuseppe Casnati”* localizado no Campus da *Università degli Studi di Parma*. As análises foram feitas na presença de d_{38} -DPC, que apesar de possuir somente uma calda hidrocarbonada, apresenta na cabeça polar características semelhantes às dos fosfolípidios presentes na membrana citoplasmática celular (FRIEDRICH et al., 2001). A relação de peptídeo/detergente e a temperatura foram variadas até a obtenção da melhor resolução dos sinais dos espectros monodimensionais ^1H . As melhores condições encontradas foram com 1 mmol/L de peptídeo e 100 mmol/L de detergente a 37 °C.

A estratégia adotada para a determinação da estrutura tridimensional foi à atribuição sequencial das ressonâncias por meio da análise do sinal do acoplamento escalar entre os átomos ^1H da cadeia principal e lateral dos aminoácidos dos peptídeos (WÜTHRICH, 1986). Inicialmente para se obter informações a respeito da correlação entre os átomos de ^1H da cadeia principal e lateral dos peptídeos (figura 38), foram analisados os espectros de 2D ^1H COSY e TOCSY. O experimento COSY permite observar o acoplamento entre prótons envolvidos a três ligações químicas ao passo que no TOCSY é possível visualizar este efeito por toda a extensão de um resíduo de aminoácido específico, desde que exista a transferência de magnetização entre as ligações químicas. Os espectros 2D homonucleares obtidos apresentaram resolução com qualidade suficiente para uma completa atribuição dos sistemas de *spins* (Anexo 8). Desta forma, foi possível a atribuição de cada sistema de spin ao aminoácido correspondente, no entanto, sem a obtenção da posição deste aminoácido na sequência.

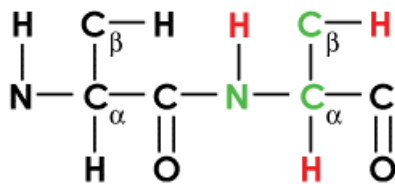


Figura 38. Ilustração da transferência de magnetização que ocorre nos experimentos ^1H COSY e TOCSY. Os átomos em vermelho são os núcleos que serão observados e os átomos em verdes, estão envolvidos na transferência de magnetização, mas não são observados no espectro final (<http://www.nanuc.ca/research/pulse.php>).

A atribuição sequencial dos sistemas de *spin*, foi obtida pelas análises do espectro de ^1H TOCSY e NOESY, que fornecem informações de conectividade através das ligações químicas e através do espaço (figura 39), respectivamente. Para este intento, foram utilizados os procedimentos clássicos de análise descritos por Wüthrich (1986). A atribuição sequencial foi determinada por meio da identificação dos sistemas de *spins* de curta distância $d_{\alpha\text{N}}$ (i , $i+1$), d_{NN} (i , $i+1$) and $d_{\beta\text{N}}$ (i , $i+1$) no espectro 2D ^1H NOESY. Para distinguir quais picos deveriam ser atribuídos aos NOEs do resíduo i com o resíduo $i-1$, comparou-se esse espectro com os espectros 2D ^1H COSY e TOCSY. Os sinais adicionais aos espectros de NOESY correspondem às correlações entre as ressonâncias dos núcleos intraresiduais, de acordo com a figura 20. Os valores do deslocamento químico identificados para o peptídeo $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ estão descritos no Anexo 2.

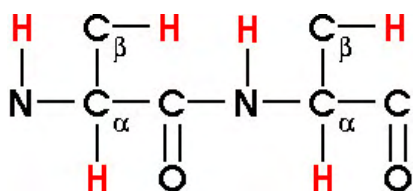


Figura 39. Ilustração da transferência de magnetização que ocorre nos experimentos ^1H NOESY. Os átomos em vermelho são os núcleos que serão observados (<http://www.nanuc.ca/research/pulse.php>).

Em posse das atribuições das ressonâncias foi realizada a análise da estrutura secundária da proteína pelo método do CSI (*chemical shift index*) (WISHART; SKYKES, 1994). Este método é baseado na diferença dos valores de deslocamento químico do ^1H ($\text{H}\alpha$) de cada aminoácido do peptídeo com respeito aos valores tabelados para os mesmos em estrutura randômica ($\Delta\delta = \delta_{\text{proteína}} - \delta_{\text{randômica}}$). Um grupo de quatro ou mais valores de CSI com diferenças maiores que 0,1 ppm para o $\text{H}\alpha$ indica a presença de estrutura em hélice alfa, e menores que 0,1 ppm para o $\text{H}\alpha$ indica estruturas em folha beta. O deslocamento químico da cadeia polipeptídica em conformação randômica usado como referência foi a publicada por

Wishart e Skykes (1994). Esses cálculos foram realizados automaticamente com o *software* NMRview (JOHNSON; BLEVINS, 1994) e estão representados na figura 40. De acordo com os resultados, estima-se que o análogo [Trp⁶]hy-a1 está, por toda sua extensão, em forma de hélice alfa. Para os demais peptídeos o mesmo não ocorre, havendo uma indicação da presença de hélice alfa entre os resíduos Pro⁷ à Lys¹⁸ e Pro⁸ à Lys¹⁹ para os peptídeos [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 e [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1, respectivamente.

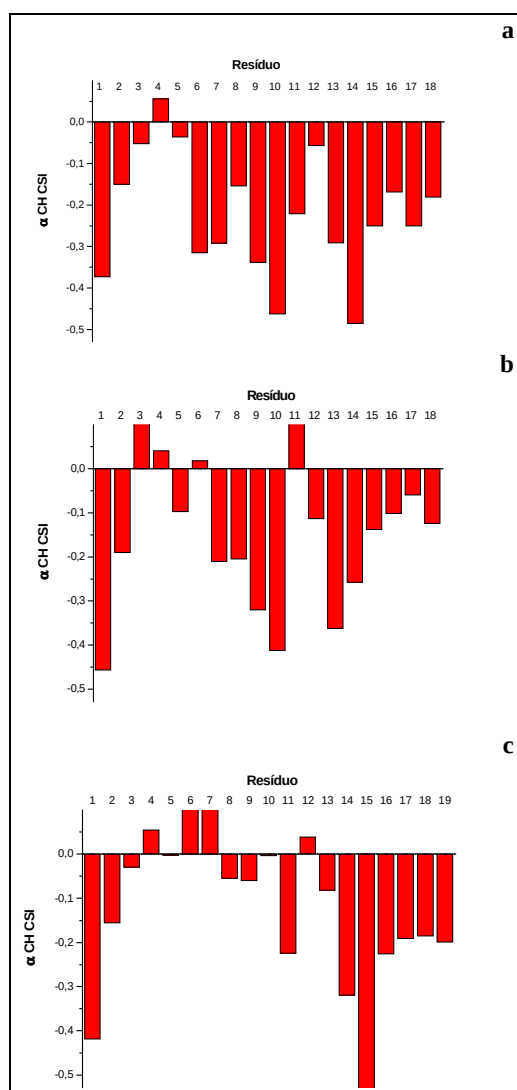


Figura 40. Chemical Shift Index para os átomos de H α dos peptídeos análogos [Trp⁶]hy-a1 (a), [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 (b) e endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 (c).

Na determinação de estruturas 3D de macromoléculas biológicas em solução por RMN, a principal informação é retirada do experimento ^1H -NOESY, onde é possível a determinação da distância entre os prótons do peptídeo. As distâncias interprotônicas foram obtidas das intensidades dos sinais dos NOEs, efetuadas de acordo com o item 3.9. Estes valores foram utilizados para os cálculos de modelagem por meio do algoritmo Dyana (*Dynamic Algorithm for NMR Application*) (GUNTERT et al., 1997). As simulações no Dyana exploram o espaço conformacional baseado na variação randômica dos ângulos de torção. A variação desses ângulos é obtida pelo aumento da temperatura em um protocolo “*simulated annealing*” que inclui as restrições de distância obtidas a partir dos NOEs. O protocolo de modelagem foi baseado nos métodos implementados por Pristovšek *et al.* (PRISTOVSEK et al., 2002). Posteriormente, este conjunto de modelos estruturais foi sujeito à validação para se obter uma indicação da qualidade das estruturas. Esta etapa é de suma importância para o resultado final do processo, pois é capaz de indicar possíveis problemas na estrutura, sendo uma forma de re-examinar cuidadosamente os dados ou procedimentos de cálculos realizados.

Em cada etapa de refinamento foram geradas 40 estruturas. Em seguida foram analisadas as 10 estruturas com menor “*target function*” quanto às violações dos dados experimentais. Para os cálculos subsequentes, foram então avaliadas e ajustadas as restrições que estavam violadas e incluídas outras restrições de distância até que todas as violações fossem eliminadas. Na etapa final de refinamento, um total de 120 estruturas foram calculadas e as 40 conformações com “*target function*” inferior a $(0,99 \pm 0,02) \text{ \AA}^2$, sem violações de distância maiores que $0,2 \text{ \AA}$ e sem violações de ângulo diedro maiores que 5° foram consideradas para análise.

A estrutura tridimensional do peptídeo $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ revelou que esta molécula adota uma conformação em hélice alfa bem definida e de natureza anfipática que se estende por toda cadeia peptídica (figura 41), concordantes com a topologia obtida da variação dos valores de CSI (figura 40a).

Os valores do deslocamento químico identificados para o peptídeo $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ estão descritos no Anexo 2. O número de restrições e a distribuição dos NOEs (intra-resíduo, sequencial e média-distância) obtidos na análise do espectro ^1H 2D NOESY e usados para realizar o processo de minimização de energia da estrutura 3D do peptídeo $[\text{Trp}^6]\text{hy-a1}$ por meio do aplicativo Insight II/Discover estão detalhados no Anexo 3 e na tabela 9.

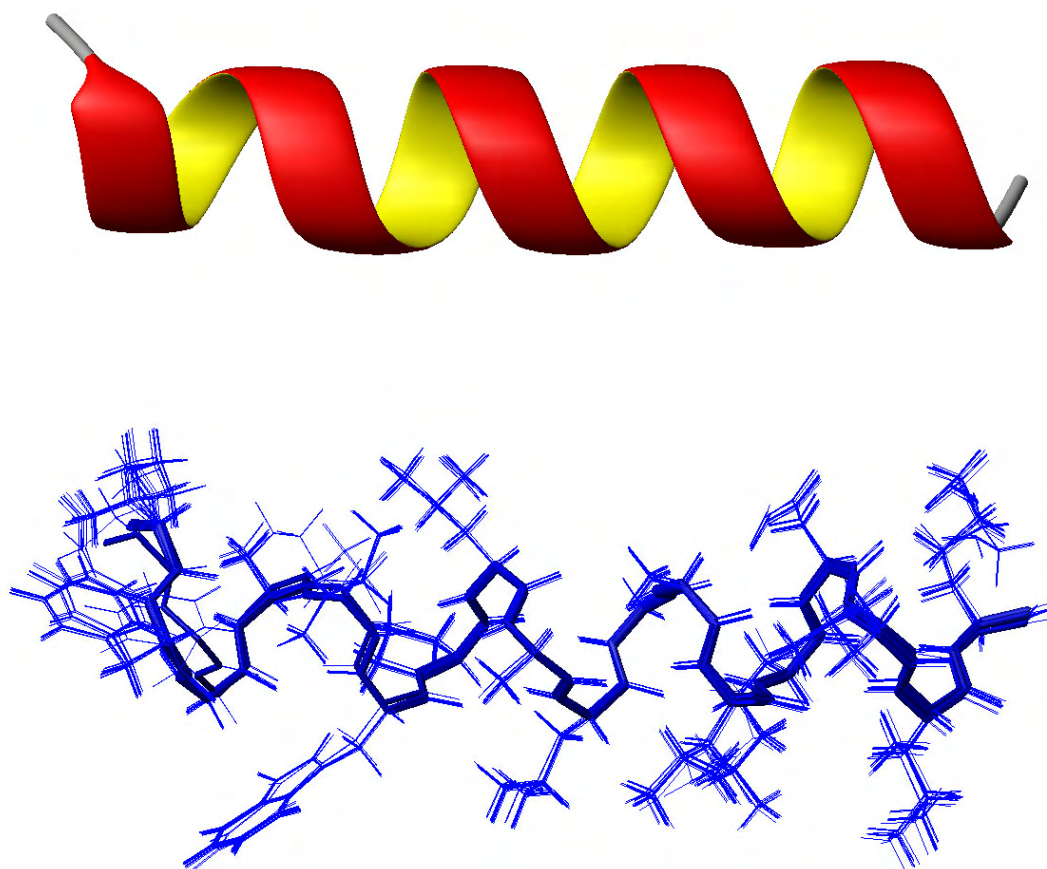


Figura 41. Estrutura tridimensional do [Trp⁶]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do *backbone* e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).

O conjunto final dos modelos estruturais do peptídeo [Trp⁶]hy-a1 obtido após a minimização de energia, foi submetido à análise utilizando o aplicativo PROCHECK e os ângulos ϕ e ψ obtidos estão representados na figura 42. Ramachandran e colaboradores (1963) descreveram os ângulos ϕ (ângulo resultante da rotação ao redor da ligação N-C α) e ψ (ângulo resultante da rotação ao redor da ligação C α -C) permissíveis para a maioria das conformações permitidas para os aminoácidos em uma cadeia peptídica. Estes ângulos diedros são importantes, pois os seus valores podem descrever toda a conformação de uma cadeia peptídica, além de restringir certas combinações devido ao impedimento estérico. As faixas permitidas de ϕ e ψ podem ser previstas prontamente e visualizadas em diagramas de contorno estérico (gráfico de Ramachandran), e é particularmente útil porque ele define os resíduos que se encontram nas regiões energeticamente mais favoráveis e desfavoráveis, orientando a avaliação da qualidade de modelos experimentais ou mesmo teóricos de

peptídeos e proteínas (RAMACHANDRAN et al., 1963). O PROCHECK gera gráficos de Ramachandran, possibilitando a avaliação da qualidade estereoquímica da estrutura. Para se obter uma estrutura estereoquimicamente correta, devem apresentar valores >90% nas regiões favorecidas e adicionalmente permitidas (de coloração vermelha e amarelo escuro no gráfico).

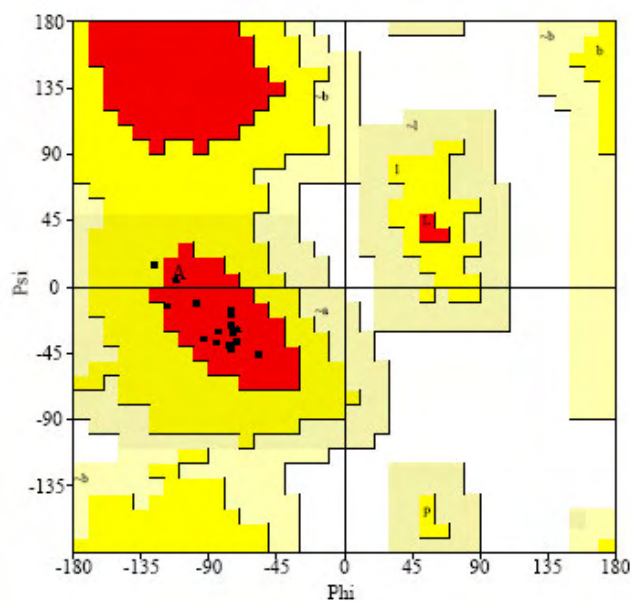


Figura 42. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo [Trp⁶]hy-a1. Os triângulos representam os resíduos de glicina.

O resumo dos demais dados obtidos para as estruturas do peptídeo [Trp⁶]hy-a1 por meio do aplicativo PROCHECK está mostrado na tabela 9.

Tabela 9. Restrições e estatísticas da estrutura de 20 estruturas em solução dos peptídeos em 100 mmol/L d_{38} -DPC a 37 °C em pH 5,02.

	Peptídeo		
	[Trp ⁶]hy-a1	endo-Pro ^{7a} [Trp ¹⁴]hy-a1	[Trp ⁶ ,Lys ¹³]hy-a1
NOEs			
Total de restrições	268	241	248
Intra-resíduo	121	117	109
Sequencial	76	69	77
Média distância ($1 < i-j < 5$)	71	55	62
Target function (Å)	0,68 ±0,01	0,51 ±0,02	0,48 ±0,01
r.m.s.d. (Å)			
Cadeia principal	0,13 ±0,08	-	0,19 ±0,12
Cadeia lateral	0,41 ±0,1	-	0,88 ±0,31
Resíduo 9-18			
Cadeia principal	-	0,07 ±0,03	-
Cadeia lateral	-	0,64 ±0,25	-
Resíduo 2-8			
Cadeia principal	-	0,92 ±0,5	-
Cadeia lateral	-	1,78 ±0,8	-
Análise do gráfico de Ramachandran (%)			
Regiões mais favorecidas	92,3	82,9	87,5
Regiões permitidas	7,7	17,1	12,5
Regiões não permitidas	0	0,0	0

O segundo peptídeo que teve sua estrutura tridimensional avaliada foi o [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1, que adotou sob as condições testadas uma forma helicoidal no intervalo dos resíduos Pro⁷ – Ile¹⁷ (figura 43), sendo coerente com as informações obtidas com os dados de CSI (figura 40b). A estrutura obtida mostra que a presença da lisina promove a destabilização da hélice alfa, comprometendo sua interação com os sistemas hidrofóbicos, o que reflete no efeito da atividade biológica deste análogo. Os valores do deslocamento químico identificados para o peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 estão descritos no Anexo 4. O número de restrições e a distribuição dos NOEs (intraresíduo, sequencial e média-distância) obtidos na análise do espectro ¹H 2D NOESY e usados para realizar o processo de minimização de energia da estrutura 3D do peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 por meio do aplicativo Insight II/Discover estão detalhados no Anexo 5 e na tabela 9.

Na análise dos espectros também foi observada a presença de outra estrutura contendo a prolina na forma *cis*, no entanto, em menor quantidade (figura 44). Ligações amida *cis* ocorrem frequentemente em proteínas contendo pares aromático-prolina, por meio da interação entre a cadeia lateral do resíduo aromático e o anel prolil (THOMAS; NADUTHAMBI; ZONDLO, 2006). Destacamos que, não foi possível determinar esta estrutura devido à ausência de interações interprotônicas suficientes para o processamento estrutural.

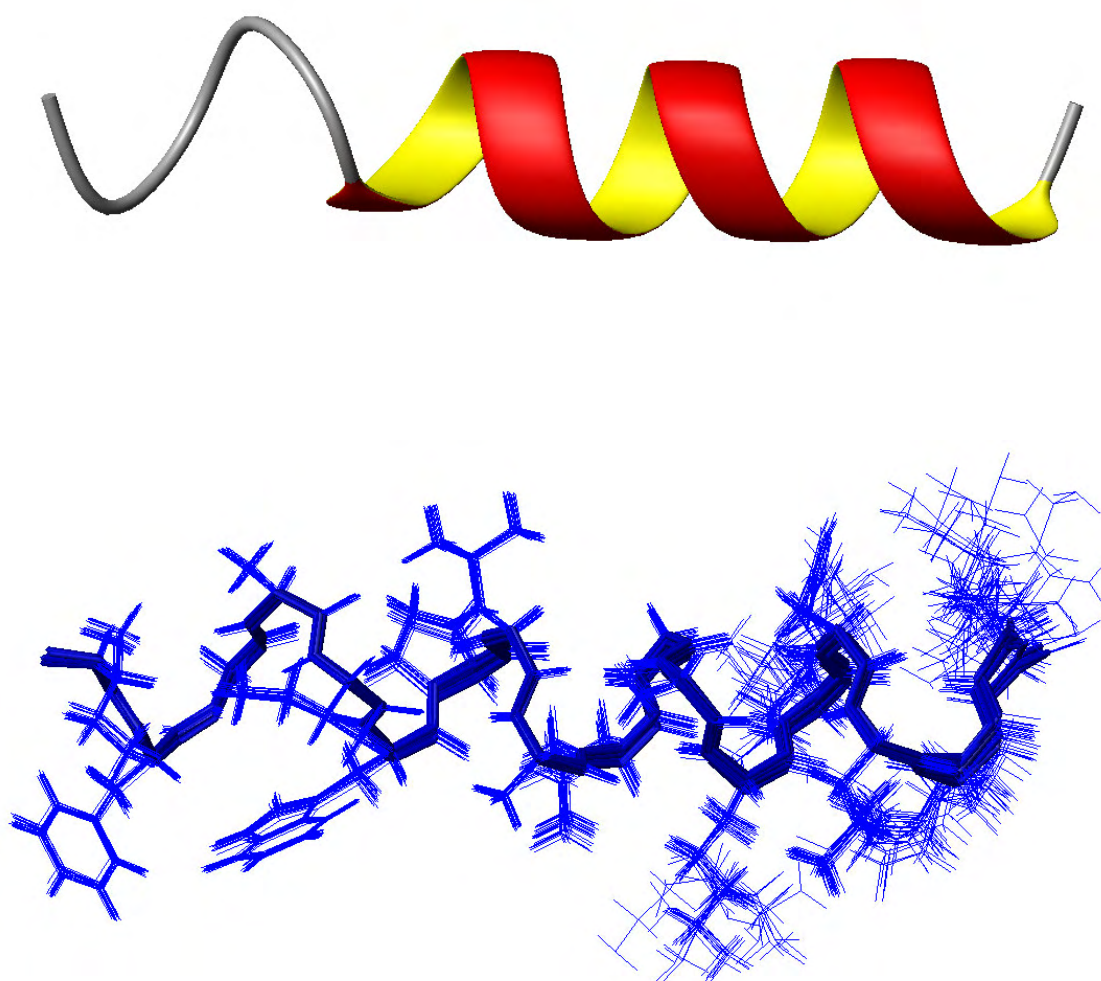


Figura 43. Estrutura tridimensional do [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do *backbone* e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).

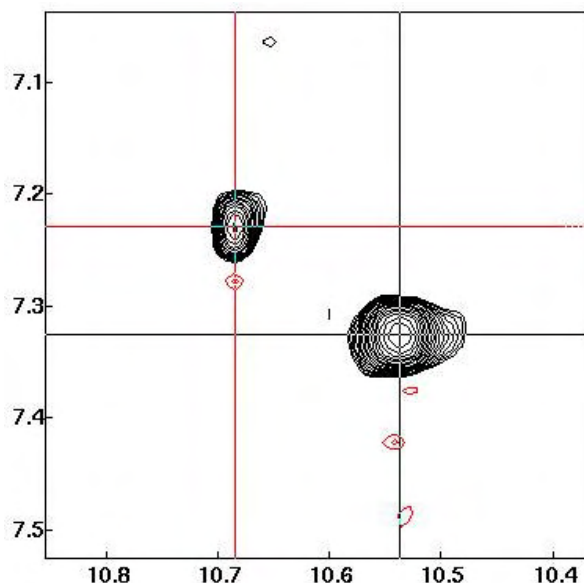


Figura 44. Seção do plano ^1H - ^1H do espectro 2D NOESY 250 ms de 1 mmol/L do peptídeo $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$ em solução aquosa, 5% D_2O , 100 mmol/L de $\text{d}_{38}\text{-DPC}$ pH 5,02 e 37 °C. Os sinais do espectro correspondem ao acoplamento $\text{H}^{\text{C}}\text{-H}^{\text{N}}$ da cadeia lateral do triptofano na forma *trans* (mais intenso) e na forma *cis* (menos intenso).

O conjunto final dos modelos estruturais do peptídeo $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$ obtido após a minimização de energia, foi submetido à análise utilizando o aplicativo PROCHECK e o resultado está representado na figura 45, sendo que 100% das estruturas estão em regiões permitidas do gráfico (tabela 9).

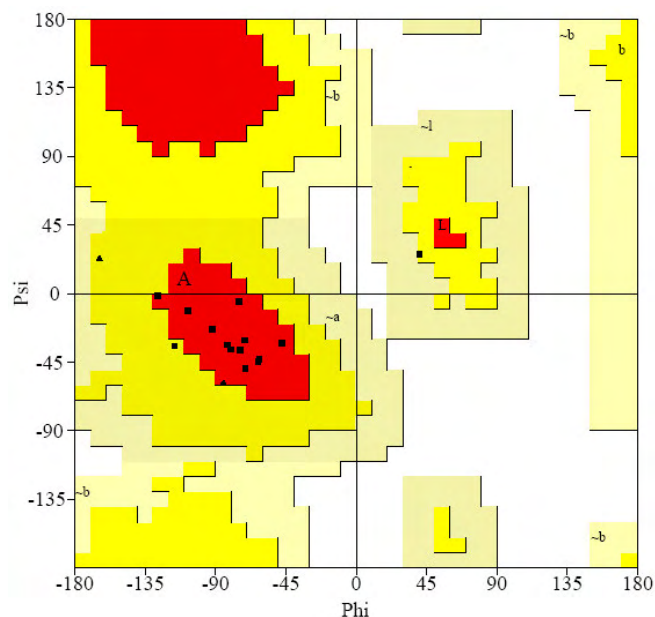


Figura 45. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$. Os triângulos representam os resíduos de glicina.

Por fim, a análise e interpretação dos espectros obtidos para o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 revelou que este análogo adota uma hélice alfa de caráter anfipática entre os resíduos Pro⁸ – Ile¹⁸, e uma dobra na região N-terminal (figura 46), condizente com os dados de CSI obtidos para este análogo (figura 40c). Neste caso, associamos o fato deste peptídeo não apresentar capacidade de lisar eritrócitos humanos a redução da estrutura secundária presente na região N-terminal.

Os valores do deslocamento químico identificados para o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 estão descritos no Anexo 6. O número de restrições e o padrão dos NOEs (intra-resíduo, sequencial e média-distância) obtidos na análise do espectro ¹H 2D NOESY e usados para realizar o processo de minimização de energia da estrutura 3D do peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1 por meio do aplicativo Insight II/Discover estão detalhados no Anexo 7 e na tabela 9.

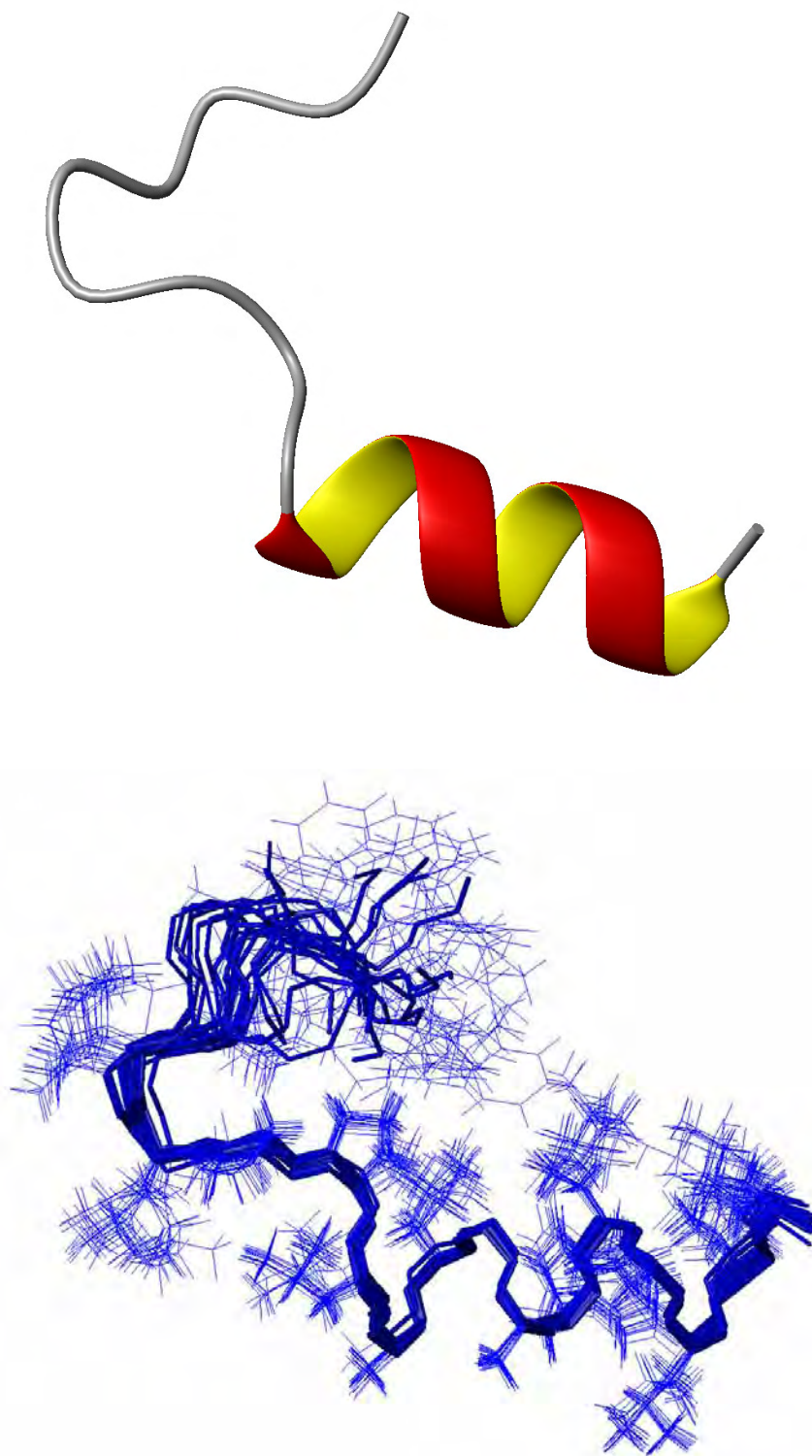


Figura 46. Estrutura tridimensional do endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1. Acima, desenho da estrutura de menor estado de energia; e a abaixo a sobreposição do *backbone* e das cadeias laterais de 20 estruturas com menor valor de RMSD (estruturas minimizadas utilizando o aplicativo Insight II/Discover).

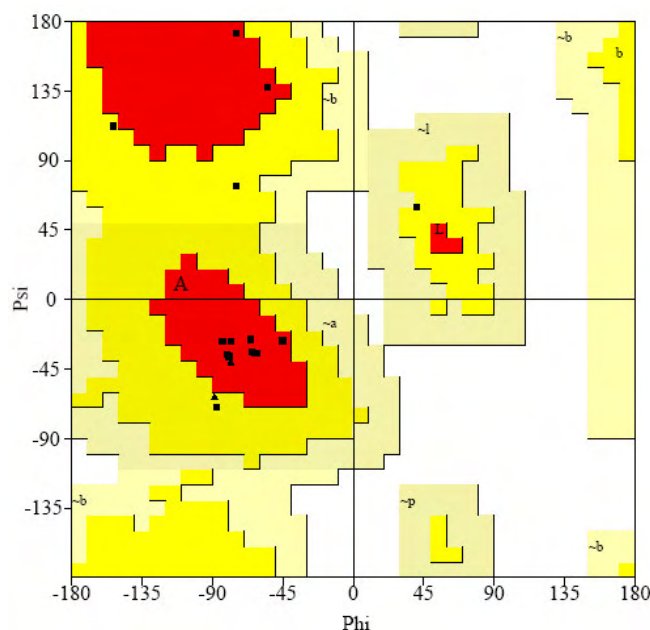


Figura 47. Diagrama de Ramachandran obtido após a análise da 20 estruturas de menor energia do peptídeo endo-Pro7^a[Trp¹⁴]hy-a1. Os triângulos representam os resíduos de glicina.

Os resultados obtidos mostraram que as substituições realizadas afetam em muito a atividade e estrutura dos peptídeos estudados. Interessante notar que as principais modificações ocorreram na região N-terminal, mesmo quando a substituição ocorreu no meio da cadeia, como para o peptídeo [Trp⁶,Lys¹³]hy-a1. Os resultados obtidos mostram, desta forma, que esta região é estratégica para o modo de ação dos PAMs lineares que adotam alfa hélice anfipática, sendo um alvo molecular muito interessante de ser avaliado, visto o baixo número de artigos direcionados ao estudo desta região.

Somado a isto, os resultados obtidos nos mostram que, a estrutura desta região parece afetar mais a ação sobre bactérias e eritrócitos do que sobre fungos, indicando mecanismos de ação diferentes. Assim este trabalho relacionou as propriedades gerais dos PAMs lineares que apresentam hélice alfa anfipática, com a atividade biológica usando como modelo o peptídeo hy-a1.

5. CONCLUSÕES

A análise global dos resultados sugere que a carga da região N-terminal desempenha um papel importante no processo de interação e formação de poros nas membranas, bem como em sua especificidade.

Os dados obtidos também revelaram que não é possível relacionar isoladamente um único parâmetro à capacidade de formação de poros pelos peptídeos. Nenhum dos fatores avaliados, tais como anfipaticidade, número de cargas do peptídeo, teor de hélice alfa e hidrofobicidade, conseguiu explicar sozinho as variações das atividades antimicrobianas. Isto indica que uma análise estatística seja necessária para definir a contribuição de cada um destes parâmetros na atividade biológica do peptídeo.

Os dados obtidos também mostraram que, por meio de modificações pontuais foi possível alterar de forma racional algumas propriedades dos PAMs. A adição do resíduo de prolina na sequência e a substituição de uma leucina por lisina na face apolar da hélice alfa alteraram a atividade biológica do peptídeo. Além disto, foi possível observar por meio de ensaios espectrofotométricos utilizando miméticos de membranas, que estes peptídeos se comportam diferentemente, podendo ou não adotar uma estrutura secundária. Isto demonstra que a presença de determinados resíduos em posições específicas da cadeia peptídica, altera o modo de interação destas moléculas quando expostos a diferentes tipos fosfolipídios.

Outro fator importante avaliado foi à presença do Trp na cadeia, que promoveu um aumento na capacidade de formação de poros. Este aumento pode estar relacionado à interação inicial do peptídeo com a membrana, que é potencializada por este aminoácido (CHAN; PRENNER; VOGEL, 2006).

Adicionalmente, estas modificações demonstram que a estrutura da região N-terminal foi a mais afetada, sugerindo, novamente, que esta região desempenha um papel fundamental no mecanismo de formação dos poros em membranas do peptídeo hy-a1. Acreditamos deste modo que estas informações podem ser úteis na busca e desenho racional de novos agentes antimicrobianos mais seletivos e com maior valor terapêutico.

Por fim, é de grande importância ressaltar que o desenvolvimento deste projeto permitiu também a formação e capacitação do aluno em diversas áreas de pesquisa, com destaque para a RMN. Devido à carência de pessoal qualificado, a determinação das estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas em solução por RMN, tem sido pouco explorada no Brasil (KIYOTA et al., 2003; SFORÇA et al., 2005; MACHADO et al., 2007; FAZIO et al., 2007). Assim sendo, o desenvolvimento de parte da pesquisa apresentada nesta tese, contribui para o crescimento brasileiro nesta área de pesquisa.

Referências

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, p. 415-433, 1998.

AUVYNET, C.; ROSENSTEIN, Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **Febs Journal**, v. 276, p. 6497-508, 2009.

BREUKINK, E.; VANKRAAIJ, C.; DEMEL, R. A.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. **Biochemistry**, v. 36, p. 6968-6976, 1997.

BUCK, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 31, p. 297-355, 1998.

CASALLANOVO, F.; OLIVEIRA, F. J.; SOUZA, F. C.; 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, p. 169-80, 2006.

CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hyalins: Bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 89, 2005.

CASTRO, M. S.; FERREIRA, T. C. G.; CILLI, E. M.; CRUSCA JUNIOR, E.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; SEBBEN, A.; RICART, C. A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* ("spotted treefrog"). **Peptides**, v. 30, p. 291-296, 2009.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1758, p. 1184-1202, 2006.

CHEN, Y. H.; YANG, J. T.; CHAU, K. H. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. **Biochemistry**, v. 13, p. 3350-3359, 1974.

CHEN, Y. X.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 12316-12329, 2005.

COOPER, G. M. **The cell : a molecular approach**. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000.

CRUSCA JUNIOR, E. **Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com TRP², TRP⁷ ou TRP²⁴ do fragmento com 30 resíduos da região amino-terminal da Esticolisina II**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

CUDIC, M.; OTVOS, L. Intracellular targets of antibacterial peptides. **Current Drug Targets**, v. 3, p. 101-106, 2002.

DELAGLIO, F.; GRZESIEK, S.; VUISTER, G. W.; ZHU, G.; PFEIFER, J.; BAX, A. NMRPIPE - A multidimensional spectral processing system based on unix pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, p. 277-293, 1995.

DONADIO, S.; CARRANO, L.; BRANDI, L. S. S.; SOFFIENTINI, A.; RAIMONDI, E.; MONTANINI, N.; SOSIO, M.; GUALERZI, C. O. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 175-185, 2002a.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 187-198, 2002b.

DUVAL, E.; ZATYLYN, C.; LAURENCIN, M.; BAUDY-FLOCH, M. KKKKPLFGLFFGLF: a cationic peptide designed to exert antibacterial activity, **Peptides**, v. 30, p. 108-1612, 2009.

EVANS, J. N. S. **Biomolecular NMR spectroscopy**. New York: Oxford University Press, 1995.

FAIVOVICH, J.; HADDAD, C. F. B.; GARCIA, P. C. A.; FROST, D. R.; CAMPBELL, J. A.; WHEELER, W. C. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 294, p. 6-228, 2005.

FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Springer, 1996.

FAZIO, M. A.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; MIRANDA, M. T. M.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. **Biopolymers**, v. 88, p. 386-400, 2007.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide & Protein Research**, v. 35, p. 161-214, 1990.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 826, p. 109-134, 1998.

FRIEDRICH, C. L.; MOYLES, D.; BEVERIDGE, T. J.; HANCOCK, R. E. W. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2086-2092, 2000.

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. W. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 24015-24022, 2001.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, p. 4108-4116, 1969.

GÜNTERT, P.; MUMENTHALER, C.; WÜTHRICH, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program Dyana. **Journal Molecular Biology**, v. 273, p. 283-298, 1997.

HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 402-410, 2000.

HONG, S. Y.; OH, J. E.; LEE, K. H. Effect of D-amino acid substitution on the stability, the secondary structure, and the activity of membrane-active peptide. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 1775-1780, 1999.

HORE, P. J. **Nuclear magnetic resonance**. New York: Oxford University Press, 1995. (Oxford Chemistry Primers, 32).

HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1758, p. 1292-1302, 2006.

JACOBSON, B.; ANDERSON, W. A.; ARNOLD, J. T. A proton magnetic resonance study of the hydration of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 173, p. 772-773, 1954.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, 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, p. 595-8, 1970.

KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 36, p. 255-266, 1990.

KIYOTA, S.; FRANZONI, L.; NICASTRO, G.; BENEDETTI, A.; OYAMA, S.; VIVIANI, W.; GAMBARINI, A. G.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. M. Introduction of a chemical constraint in a short peptide derived from human acidic fibroblast growth factor elicits mitogenic structural determinants. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 2325-2333, 2003.

KUMAR, A.; ERNST, R. R.; WÜTHRICH, K. A two-dimensional nuclear overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-

relaxation networks in biological macromolecules. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 95, p. 1-6, 1980.

LEE, D. L.; HODGES, R. S. Structure-activity relationships of de novo designed cyclic antimicrobial peptides based on gramicidin S. **Biopolymers**, v. 71, p. 28-48, 2003.

LOPES, J. L. S.; NOBRE, T. M.; SIANO, A.; HUMPOLA, V.; BOSSOLAN, N. R. S.; ZANIQUELLI, M. E. D.; TONARELLI, G.; BELTRAMINI, L. M. Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* by Plantaricin149 and its mechanism of action using biomembrane model systems. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1788, p. 2252-2258, 2009.

MacDONALD, R. C.; MacDONALD, R. I.; MENCIO, B. P. M.; TAKESHITA, K.; SUBBARAO, N. K.; HU, L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1061, p. 297-303, 1991.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 781-789, 2004.

MACHADO, A.; SFORÇA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M. T. M. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. **Biopolymers**, v. 88, p. 413-426, 2007.

MANGONI, M. L. Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. **Cell Molecular Life Science**, v. 242, p. 1060-1069, 2006.

MANGONI, M. L.; GROVALE, N.; GIORGI, A.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; BARRA, D. Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from Bombina skin secretions. **Peptides**, v. 21, p. 1673-1679, 2000.

MASTROMEI, G.; BARBERIO, C.; PISTOLESI, S.; DELFINO, G. A bactericidal protein in bombina *Variegata pachypus* skin venom. **Toxicon**, v. 29, p. 321-328, 1991.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 858, p. 161-168, 1986.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 31635-31641, 1994.

MULKERRIN, N. G. **Spectroscopic methods for determining protein structure in solution**. New York: Havel, 1996. p. 5-27.

NAGAYAMA, K.; KUMAR, A.; WUTHRICH, K.; ERNST, R. R. Experimental-techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 40, p. 321-334, 1980.

NASCIMENTO, A. C. C. C. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases**. 2007. 59 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**: approved standard M27-A2. New York, 2002. v. 2.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, C. M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 2008.

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**, v. 37, p. 55-65, 1999.

PAL, T.; SONNEVEND, A.; GALADARI, S.; CONLON, J. M. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, pseudin-2. **Regulatory Peptides**, v. 129, p. 85-91, 2005.

PARISIEN, A.; ALLAIN, B.; ZHANG, J.; MANDEVILLE, R.; LAN, C. Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1-13, 2008.

PAZOS, I. F.; MARTINEZ, D.; TEJUCA, M.; VALLE, A.; DEL POZO, A.; ALVAREZ, C.; LANIO, M. E.; LISSI, E. A. Comparison of pore-forming ability in membranes of a native and a recombinant variant of Sticholysin II from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 42, p. 571-578, 2003.

PEDONE, C.; MORELLI, G.; TESAURO, D.; SAVIANO, M. Peptide structure and analysis. In: CHINOL, M.; PAGANELLI, G. **Radionuclide peptide cancer therapy**. New York: Taylor & Francis, 2006. Cap. 1, p. 1-30.

PENNINGTON, M. W.; DUNN, B. M. **Methods in biology molecular**. New Jersey: Humana Press, 1994.

PRATES, M. V.; SFORÇA, M. L.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; PERTINHEZ, T. A.; ARAUJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH JUNIOR, C. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 13018-13026, 2004.

PRISTOVSEK, P.; RUTERJANS, H.; JERALA, R. Semiautomatic sequence-specific assignment of proteins based on the tertiary structure-the program st2nmr. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, p. 335-340, 2002.

- RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95-99, 1963.
- RIDDER, A.; SKUPJEN, P.; UNTERREITMEIER, S.; LANGOSCH, D. Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, p. 894-902, 2005.
- SAUNDERS, M.; WISHNIA, A.; KIRKWOOD, J. G. The nuclear magnetic resonance spectrum of ribonuclease. **Journal of The American Chemical Society**, v. 79, p. 3289-3290, 1957.
- SAXENA, V. P.; WETLAUFE, D. B. New basis for interpreting circular dichroic spectra of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, p. 969-972, 1971.
- SENGUPTA, D.; LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1778, p. 2308-2317, 2008.
- SFORÇA, M. L.; OYAMA, S.; CANDURI, F.; LORENZI, C. C. B.; PERTINHEZ, T. A.; KONNO, K.; SOUZA, B. M.; PALMA, N. S.; RUGGIERO, J.; AZEVEDO, W. F.; SPISNI, A. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. **Biochemistry**, v. 43, p. 5608-5617, 2004.
- SFORÇA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C. R.; OYAMA, S.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M. T. M.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. **Biochemistry**, v. 44, p. 6440-6451, 2005.
- SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, p. 460-464, 1995.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1462, p. 55-70, 1999.
- SHALEV, D. E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3. **Biochemistry**, v. 41, p. 7312-7317, 2002.
- THOMAS, K. M.; NADUTHAMBI, D.; ZONDLO, N. J. Electronic control of amide cis-trans isomerism via the aromatic-prolyl interaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 2216-2217, 2006.
- TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, p. 717-735, 2005.
- URBAN, E.; NAGY, E.; PAL, T.; SONNEVEND, A.; CONLON, J. M. Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-

related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 317-321, 2007.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D933-D937, 2009.

WANG, Z.; WANG, G. APD: the antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. D590-D592, 2004.

WISHART, D. S.; NIP A. M. Protein chemical shift analysis: a practical guide. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 76, p. 153-163, 1998.

WISHART, D. S.; SYKES, B. D. Chemical-Shifts as a for structure determination. **Nuclear Magnetic Resonance**, v. 239, p. 363-392, 1994.

WOODFORD, N.; SUNDSFJORD, A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 259-261, 2005.

WOODY, R. W. The exciton model and the circular dichroism of polypeptides. **Monatshefte fuer Chemie**, v. 136, p. 347-366, 2005.

WRIGHT, A.; BAI, G.; BARRERA, L.; BOULAHBAL, F.; MARTIN-CASABONA, N.; GILPIN, C.; DROBNIEWSKI, F.; HAVELKOVA, M.; LEPE, R.; LUMB, R.; METCHOCK, B.; PORTAELS, F.; RODRIGUES, M.; RUSCH-GERDES, S.; VAN DEUN, A.; VINCENT, V.; LEIMANE, V.; RIEKSTINA, V.; SKENDERS, G.; HOLTZ, T.; PRATT, R.; LASERSON, K.; WELLS, C.; CEGIELSKI, P.; SHAH, N. S. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs - Worldwide, 2000-2004. **Jama-Journal of The American Medical Association**, v. 295, p. 2349-2351, 2006.

WÜTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**. New York: John Wiley & Sons, 1986.
ZAI, A.; SERRES, C.; TANGY, F.; JOUANNET, P.; HANI, K. *In vitro* spermicidal activity of peptides from amphibian skin: dermaseptin S4 and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 266-275, 2008

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

ANEXO 1

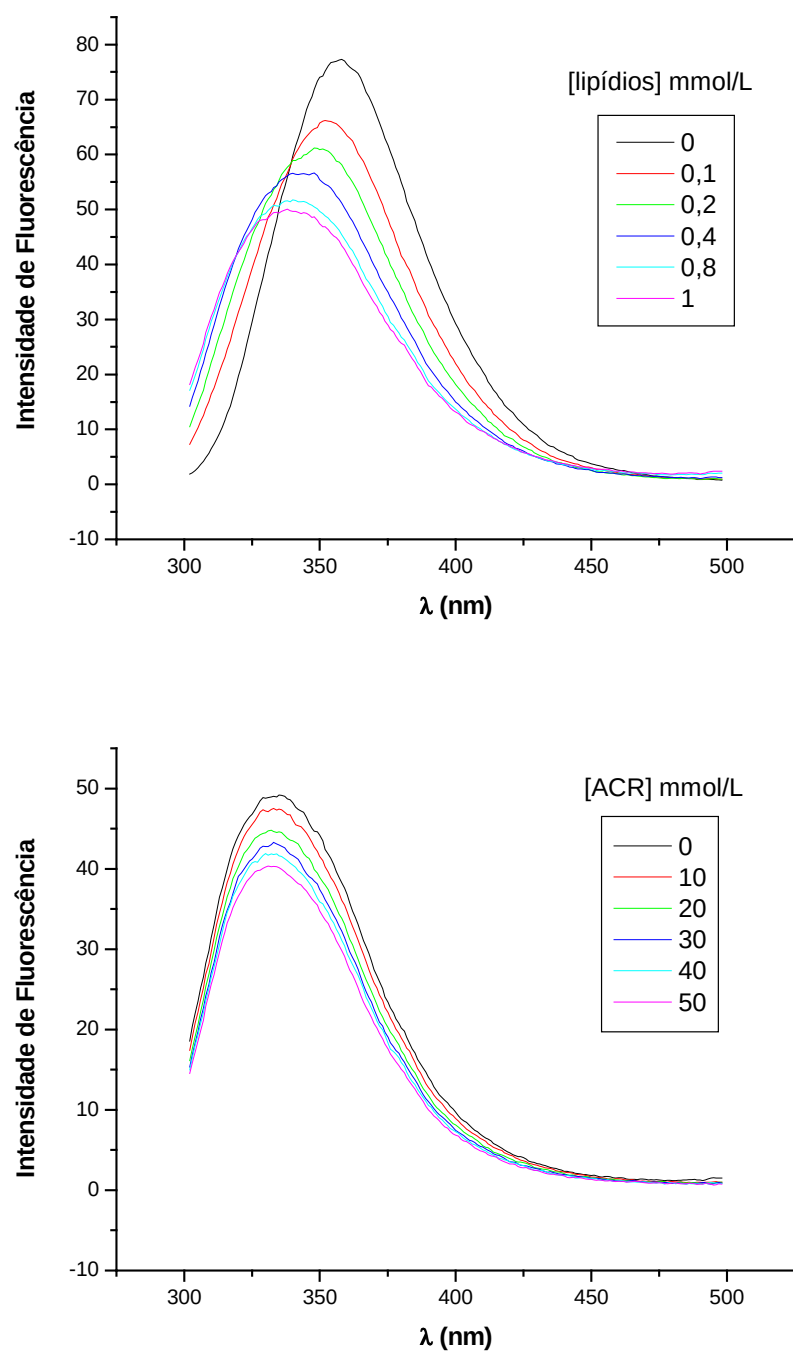


Figura. Espectro de fluorescência dos peptídeos (acima) em função da concentração teórica média de lipídios SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) e (abaixo) em função da concentração de acrilamida. Análise realizada em solução tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo [Trp⁶]hy-a1 utilizada foi de 10 μmol/L.

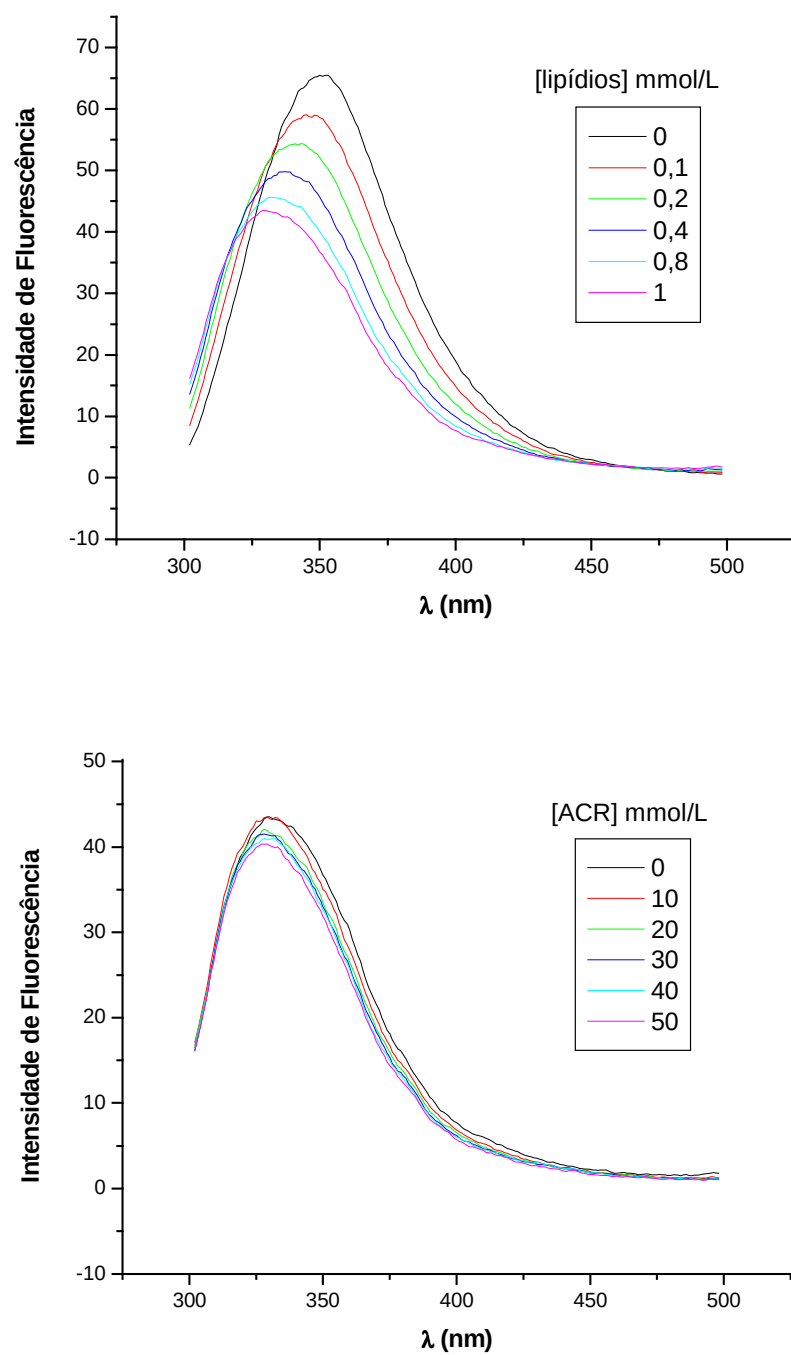


Figura. Espectro de fluorescência dos peptídeos (acima) em função da concentração teórica média de lipídios SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) e (abaixo) em função da concentração de acrilamida. Análise realizada em solução tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo Acetil-[Trp⁶]hy-a1 utilizada foi de 10 μ mol/L.

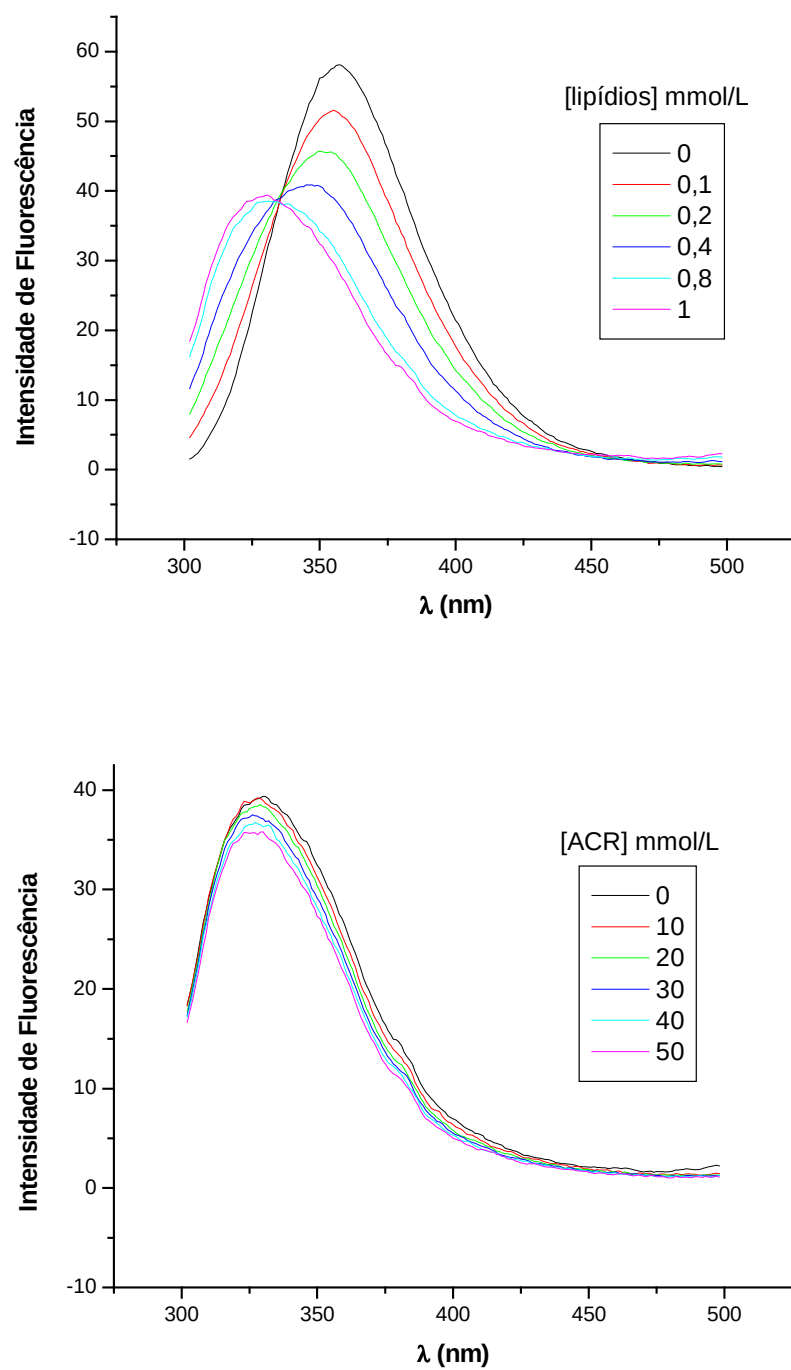


Figura. Espectro de fluorescência dos peptídeos (acima) em função da concentração teórica média de lipídios SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) e (abaixo) em função da concentração de acrilamida. Análise realizada em solução tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo Lys-[Trp⁶]hy-a1 utilizada foi de 10 μ mol/L.

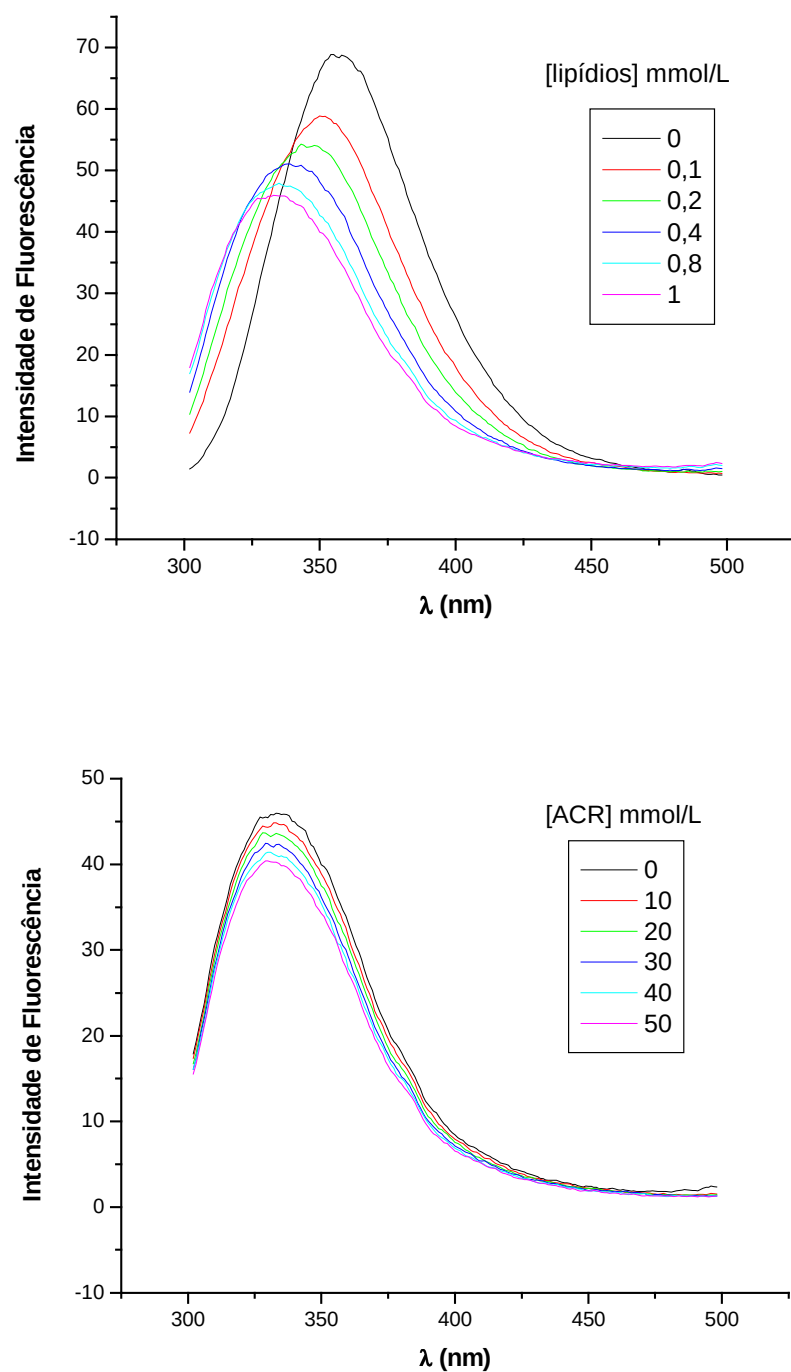


Figura. Espectro de fluorescência dos peptídeos (acima) em função da concentração teórica média de lipídios SM:PA:PC (47,5: 5: 47,5) e (abaixo) em função da concentração de acrilamida. Análise realizada em solução tampão Tris em pH 7,4 a 25 °C. A concentração de peptídeo Asp-[Trp⁶]hy-a1 utilizada foi de 10 μmol/L.

ANEXO 2

Tabela. Deslocamento químico (δ , ppm) dos átomos ^1H para o peptídeo [Trp⁶]hy-a1 em 100 mmol/L de d_{38} -DPC a 37 °C e pH 5,13.

	Resíduo	N _H	α_{H}	β_{H}	outros
1	Ile	-	3,80	1,87	γCH_2 1,04; γCH_3 0,77; δCH_3 0,83
2	Phe	9,17	4,47	3,24	2,6H 7,26; 3,5H 7,20; 4H 7,08
3	Gly	8,78	4,01/3,90	-	
4	Ala	8,10	4,37	1,46	
5	Ile	7,92	4,13	1,92	γCH_2 1,27; γCH_3 0,83; δCH_3 0,83
6	Trp	8,13	4,67	3,36	2H 7,35; 4H 7,40; 5H 6,88; 6H 7,03; 7H 7,41; NH 10,61
7	Pro	-	4,12	2,26/1,78	γCH_2 1,27/1,65; δCH_2 3,53/3,60
8	Leu	7,08	4,18	1,94/1,60	γH 1,77; δCH_3 0,97/0,90
9	Ala	8,25	3,98	1,41	
10	Leu	8,37	3,87	1,30/1,49	γH 1,42; δCH_3 0,83/1,03
11	Gly	7,89	3,89/3,73	-	
12	Ala	7,84	4,26	1,51	
13	Leu	8,22	4,05	1,86	γH 1,67; δCH_3 0,89
14	Lys	8,32	3,83	1,92	γCH_2 1,58/1,50; δCH_2 1,70; ϵCH_2 2,89
15	Asn	7,72	4,49	2,90/2,84	γNH_2 6,87/7,73
16	Leu	7,94	4,17	1,90	γH 1,78; δCH_3 0,94/0,91
17	Ile	7,72	3,92	1,97	γCH_2 1,28; γCH_3 0,94; δCH_3 0,85
18	Lys	7,74	4,14	1,89	γCH_2 1,58/1,50; δCH_2 1,70; ϵCH_2 2,99; ϵNH_3 7,63
	NH ₂				7,25/7,18

ANEXO 3

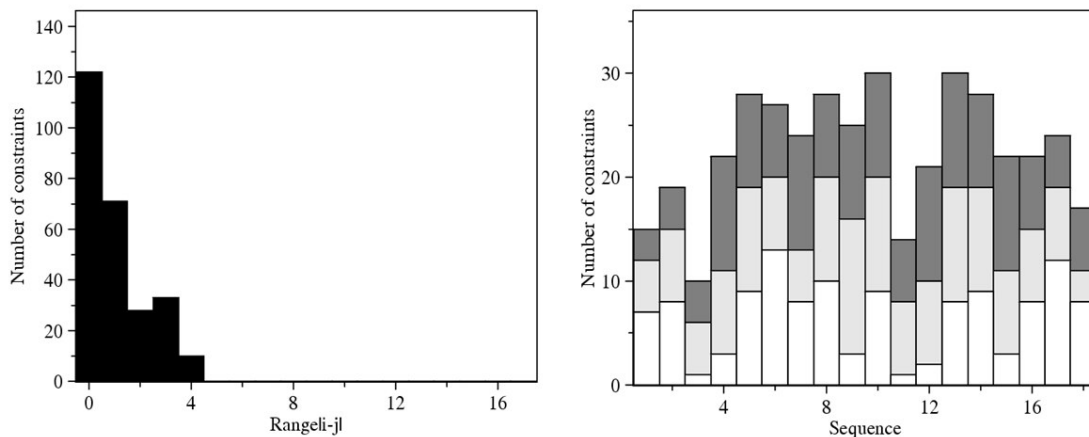


Figura. Gráfico que representa a distribuição dos NOEs de restrição utilizados na resolução do modelo da estrutura 3D do peptídeo [Trp⁶]hy-a1. À direita, gráfico do número de restrições em função da distância dos prótons e a esquerda a distribuição do número de ligações por resíduo em função da distância (barra branca: intra-resíduo; barra cinza: sequencial e barra cinza escura: media distância).



Figura. Gráfico que representa a conectividade dos NOEs encontrados entre os diferentes grupos de prótons entre os resíduos do peptídeo [Trp⁶]hy-a1.

ANEXO 4

Tabela. Deslocamento químico (δ , ppm) dos átomos ^1H para o peptídeo $[\text{Trp}^6, \text{Lys}^{13}]\text{hy-a1}$ em 100 mmol/L de $d_{38}\text{-DPC}$ a 37 °C e pH 5,03.

	Resíduo	N_H	α_H	β_H	outros
1	Ile	-	3.75	1.86	γCH_2 1.02/1.40; γCH_3 0.75; δCH_3 0.83
2	Phe	-	4.46	3.19/3.29	2.6H 7.27; 3.5H 7.21; 4H 7.09
3	Gly	8.73	3.97/3.89	-	
4	Ala	8.11	4.38	1.44	
5	Ile	7.81	4.11	1.90	γCH_2 1.24/1.49; γCH_3 0.84; δCH_3 0.81
6	Trp	8.11	4.70	3.37/3.41	2H 7.32; 4H 7.47; 5H 6.93; 6H 7.03; 7H 7.48; NH 10.53
7	Pro	-	4.25	2.30	γCH_2 2.02; δCH_2 3.71/3.58
8	Leu	7.32	4.17	1.56/1.91	γH 1.76; δCH_3 0.95/0.89
9	Ala	8.16	4.02	1.35	
10	Leu	8.04	3.96	1.56	γH 1.47; δCH_3 0.80/0.76
11	Gly	7.98	3.88/3.88	-	
12	Ala	8.12	4.22	1.46	
13	Lys	8.08	3.98	1.87/1.97	γCH_2 1.63/1.47; δCH_2 1.67/1.68; ϵCH_2 2.91
14	Lys	7.87	4.09	1.87	γCH_2 1.44/1.48; δCH_2 1.68; ϵCH_2 2.74
15	Asn	7.92	4.61	2.79	γNH_2 6.97/7.56
16	Leu	8.00	4.27	1.77	γH 1.60; δCH_3 0.92/0.89
17	Ile	7.67	4.15	2.00	γCH_2 1.26/1.50; γCH_3 0.92; δCH_3 0.85
18	Lys	8.02	4.22	1.86	γCH_2 1.48; δCH_2 1.69; ϵCH_2 3.00
	NH ₂				7.13/7.43

ANEXO 5

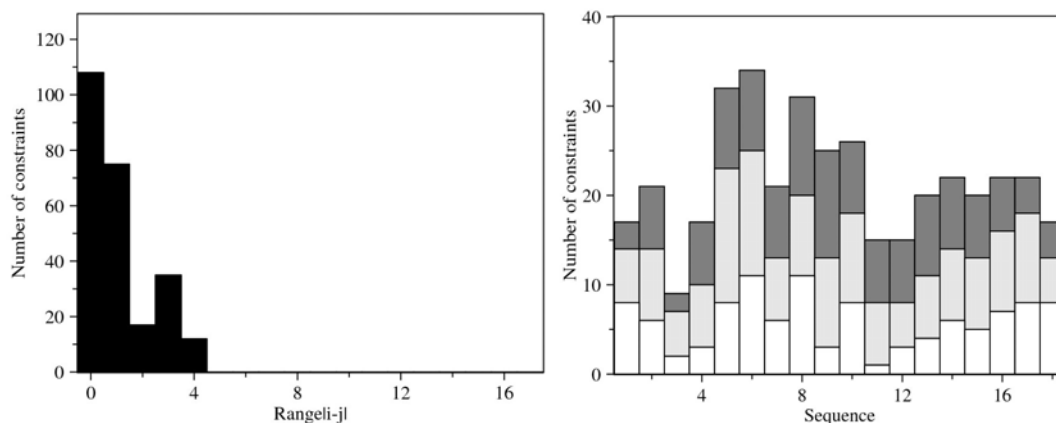


Figura. Gráfico que representa a distribuição dos NOEs de restrição utilizados na resolução do modelo da estrutura 3D do peptídeo [Trp⁶,Lis¹³]hy-a1. À direita, gráfico do número de restrições em função da distância dos prótons e a esquerda a distribuição do número de ligações por resíduo em função da distância (barra branca: intra-resíduo; barra cinza: sequencial e barra cinza escura: media distância).

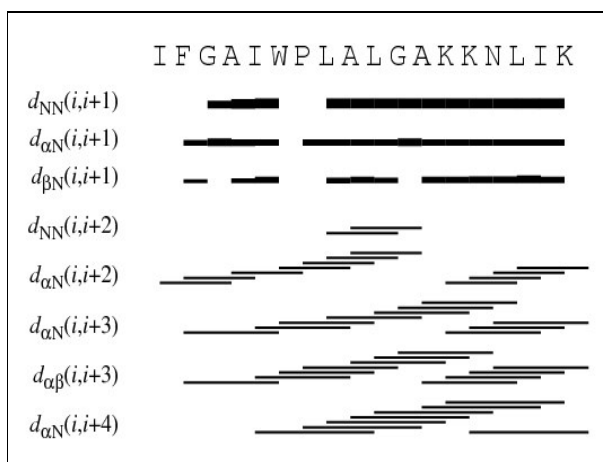


Figura. Gráfico que representa a conectividade dos NOEs encontrados entre os diferentes grupos de prótons entre os resíduos do peptídeo [Trp⁶,Lis¹³]hy-a1.

ANEXO 6

Tabela. Deslocamento químico (δ , ppm) dos átomos ^1H para o peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 em 100 mmol/L de $\text{d}_{38}\text{-DPC}$ a 37 °C e pH 5,12.

	Resíduo	N _H	α_{H}	β_{H}	outros
1	Ile	-	3,79	1,85	γCH_2 1,39; γCH_3 0,98; δCH_3 0,80
2	Phe	-	4,49	3,31/3,17	2,6H 7,28; 3,5H 7,24; 4H 7,14
3	Gly	8,61	3,97/3,75	-	
4	Ala	8,01	4,39	1,41	
5	Ile	7,92	4,20	1,92	γCH_2 1,24/1,50; γCH_3 0,90; δCH_3 0,82
6	Leu	8,04	4,54	1,72/1,76	γH 1,52; δCH_3 0,92/0,88
7	Pro	-	4,68	2,36/2,36	γCH_2 1,98; δCH_2 3,91/3,46
8	Pro	-	4,40	2,29/1,94	γCH_2 2,10/2,05; δCH_2 3,76/3,63
9	Leu	8,20	4,32	1,75/1,51	γH 1,41; δCH_3 0,88
10	Ala	8,04	4,33	1,41	
11	Leu	8,29	4,15	1,71	γH 1,68; δCH_3 0,96/0,89
12	Gly	8,42	3,929/3,82	-	
13	Ala	7,97	4,26	1,47	
14	Trp	8,08	4,37	3,37	2H 7,31; 4H 7,42; 5H 6,92; 6H 7,05; 7H 7,43; NH 10,41
15	Lys	7,90	3,77	1,76	γCH_2 1,29/1,23; δCH_2 1,65; ϵCH_2 2,92
16	Asn	7,81	4,52	2,83	γNH_2 6,927/7,62
17	Leu	7,83	4,19	1,87/1,66	γH 1,75; δCH_3 0,93/0,89
18	Ile	7,43	4,02	1,90	γCH_2 1,23/1,42; γCH_3 0,90; δCH_3 0,80
19	Lys	7,64	4,15	1,85/1,79	γCH_2 1,48/1,41; δCH_2 1,67; ϵCH_2 2,98; ϵNH_3 7,63
	NH ₂				7,17/7,20

ANEXO 7

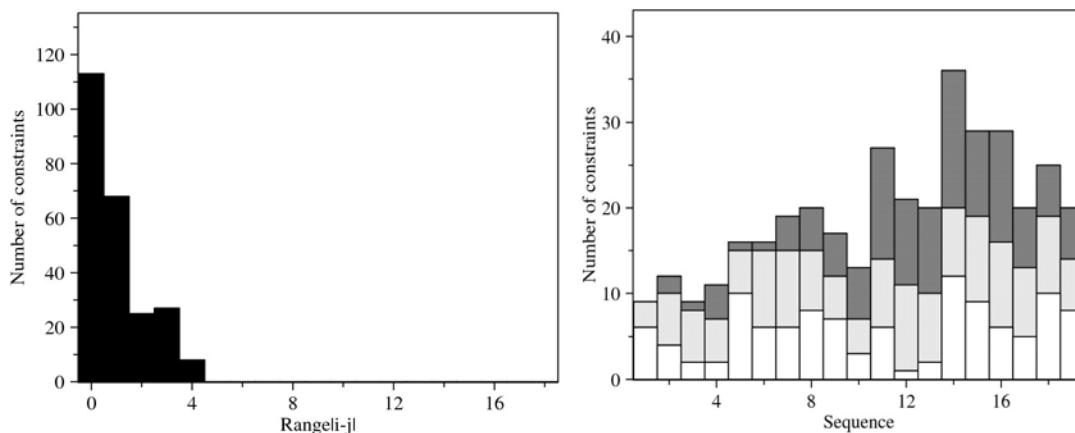


Figura. Gráfico que representa a distribuição dos NOEs de restrição utilizados na resolução do modelo da estrutura 3D do peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1. À direita, gráfico do número de restrições em função da distância dos prótons e a esquerda a distribuição do número de ligações por resíduo em função da distância (barra branca: intra-resíduo; barra cinza: sequencial e barra cinza escura: media distância).

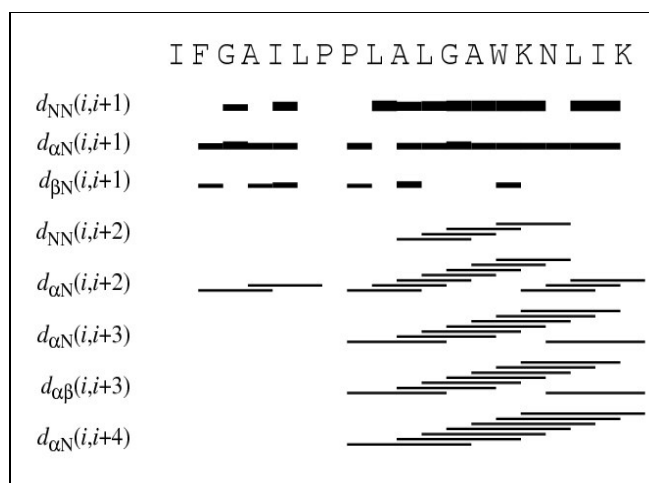


Figura. Gráfico que representa a conectividade dos NOEs encontrados entre os diferentes grupos de prótons entre os resíduos do peptídeo endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1.

ANEXO 8

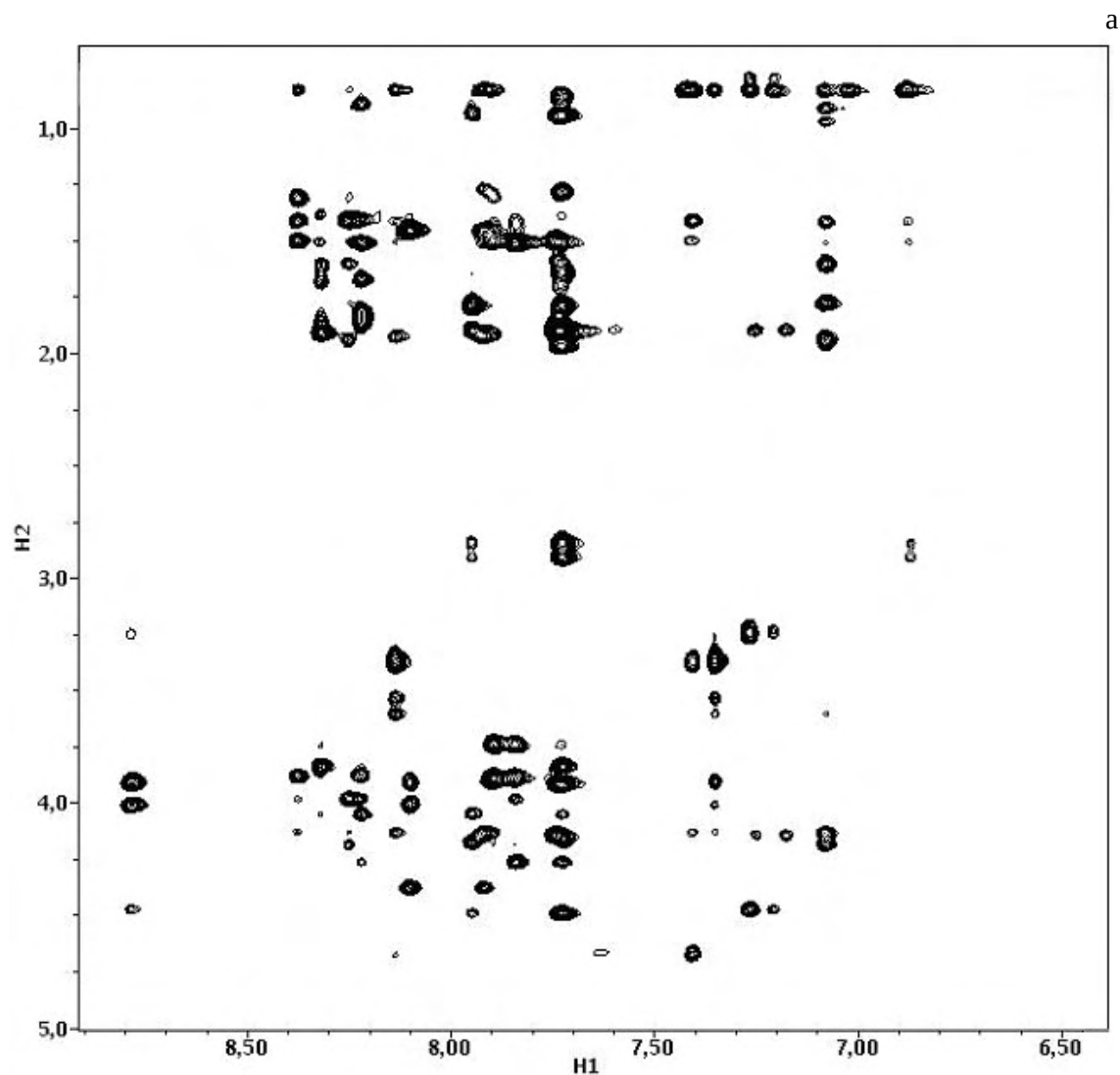


Figura. Seção do plano $H_N - H_\alpha$ dos espectros 1H 2D NOESY 250 ms de 1 mmol/L do peptídeo $[Trp^6]hy-a1$ na presença de 100 mmol/L DPC, $pH \cong 5$ a $37^\circ C$.

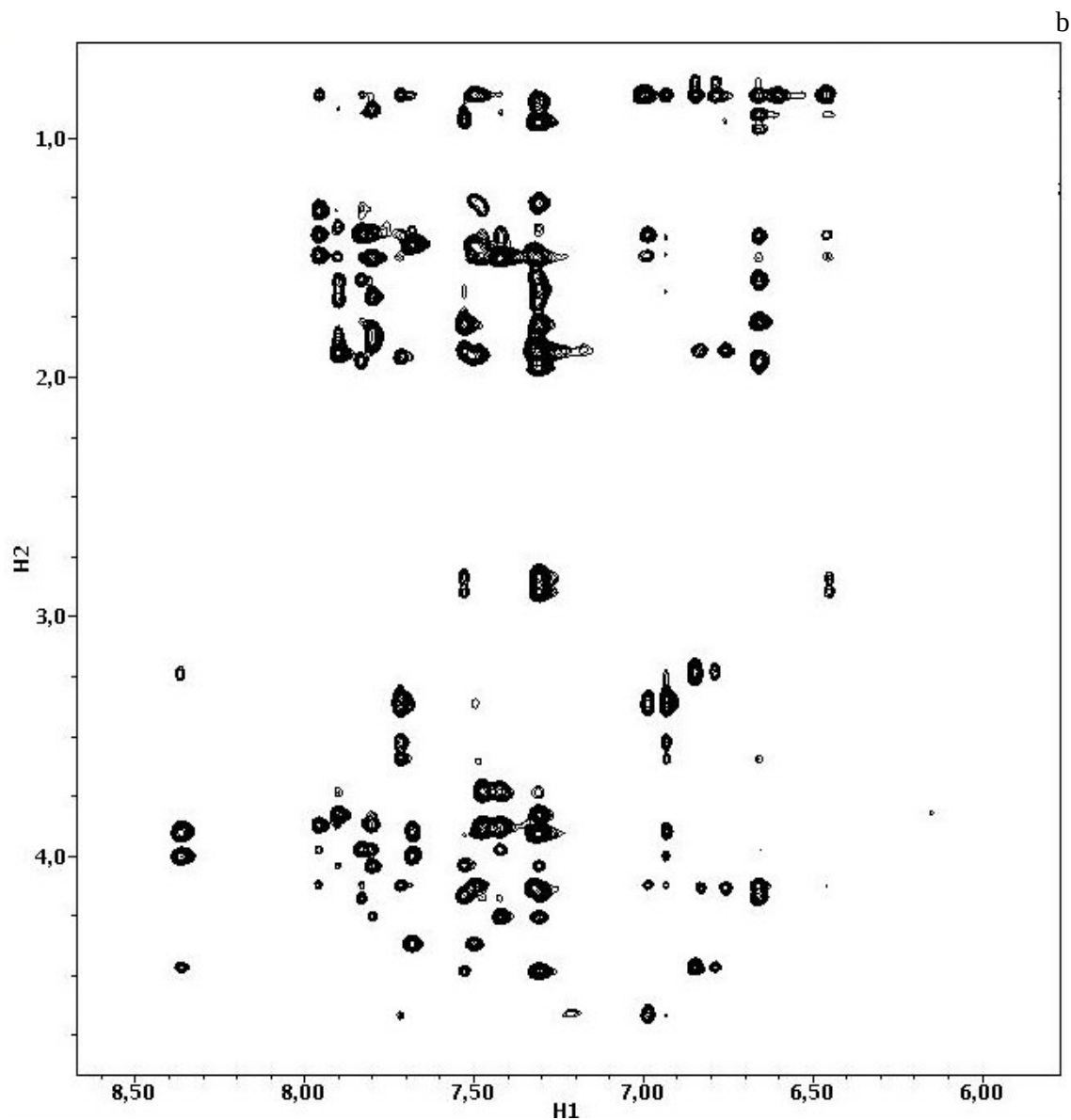


Figura. Seção do plano $H_N - H_\alpha$ dos espectros 1H 2D NOESY 250 ms de 1 mmol/L do peptídeo $[Trp^6, Lys^{13}]hy-a1$ na presença de 100 mmol/L DPC, $pH \approx 5$ a $37^\circ C$.

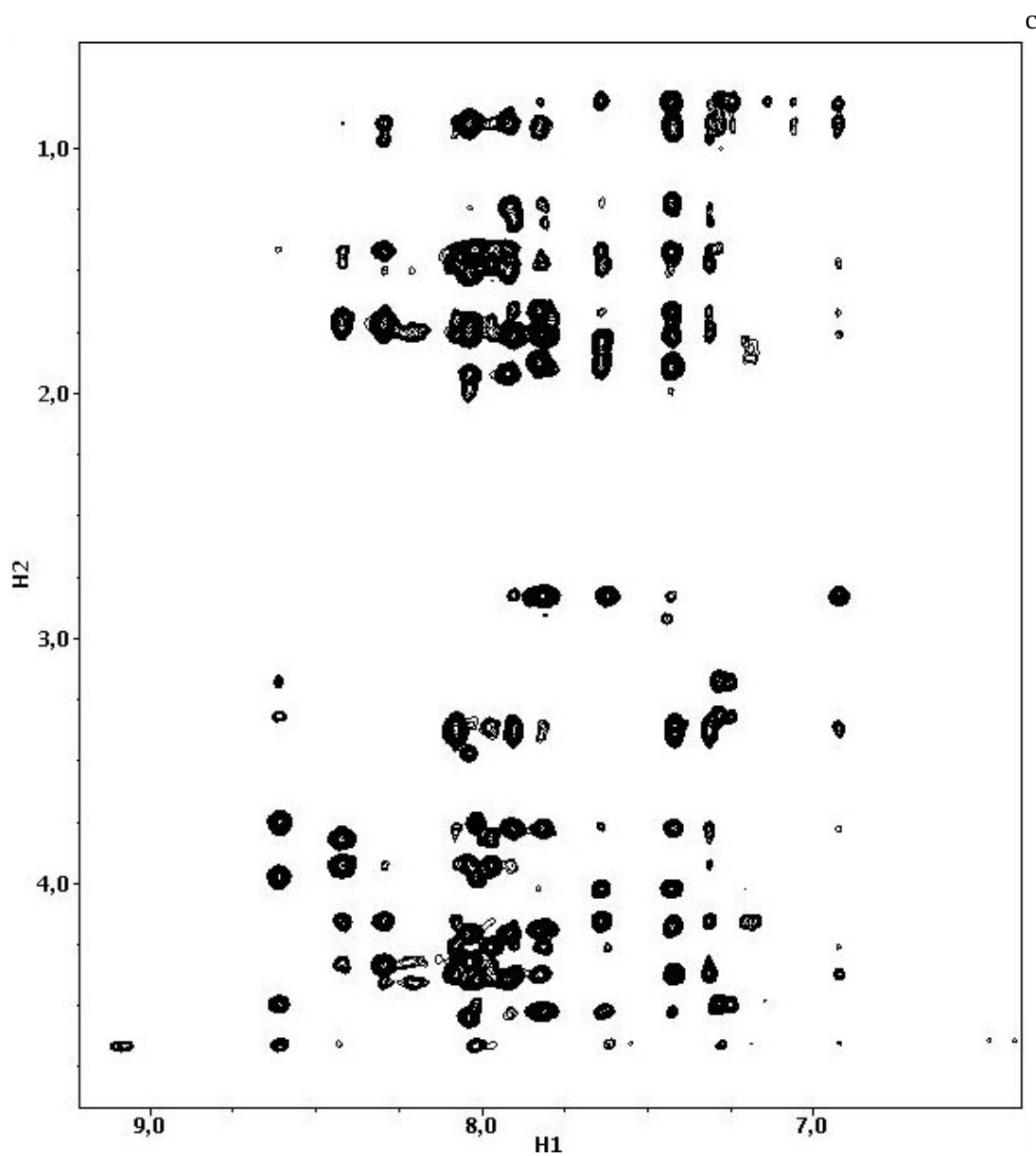


Figura. Seção do plano H_N – H_α dos espectros ^1H 2D NOESY 250 ms de 1 mmol/L do peptídeo [endo-Pro^{7a}[Trp¹⁴]hy-a1 na presença de 100 mmol/L DPC, $\text{pH} \approx 5$ a 37 °C.