UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro
Centro de Estudos de Insetos Sociais - C.E.I.S.

Marcia Perez dos Santos Cabrera

"Síntese de Peptídeos Envolvidos em Atividades Inflamatória e Nociceptiva e Investigação de seus Mecanismos de Interação"

"Relatório de Pós-doutorado realizado na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Rio Claro"

Supervisor: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Projeto Pós-doutorado Sênior – PDS Processo CNPq 104258/2018-7
Vigencia 01/07/2018 a 30/06/2019

Rio Claro
junho/2019

Instituto de Biociências
Avenida 24-A nº 1515 - CEP 13506-900 – Rio Claro - S.P. - Brasil
tel 19 3526-4100 - fax 19 3534-0009 - http://www.rc.unesp.br
CEIS 19 3526.4160 ceis@rc.unesp.br

Dos Santos Cabrera, M (2019)

Atividades Desenvolvidas

1. **Desenvolvimento do Projeto**

Relatório Técnico do Projeto – vide pagina 4

2. **Artigos publicados no período**

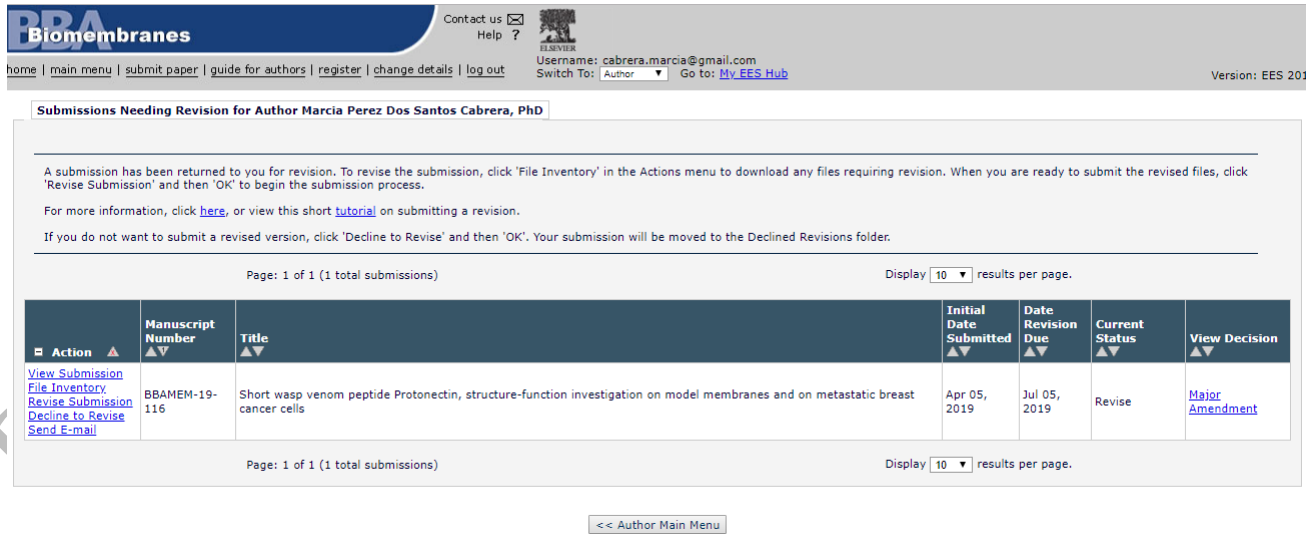
1) Leite, N. B.; Martins, D. B.; Fazani, V. E.; Vieira, M. R.; **Dos Santos Cabrera, M. P.** Cholesterol modulates curcumin partitioning and membrane effects. Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes, v.1860, p.2320 - 2328, 2018.

2) Dias, A. M.; **Dos Santos Cabrera, M. P.**; Lima, A. M. F.; Taboga, S. R.; Vilamaior, P. S. L.; Tiera., M. J.; De Oliveira Tiera, V. A. Insights on the antifungal activity of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against *Aspergillus Flavus*. Carbohydr. Polym., v.196, p.433 - 444, 2018.

3) Costa Petrin, T. H.; Fadel, V.; Martins, D. B.; Dias, S. A.; Cruz, A.; Sergio, L. M.; Arcisio-Miranda, M.; Castanho, M. A. R. B.; **Dos Santos Cabrera, M. P.** Synthesis and Characterization of Peptide-Chitosan Conjugates (PepChis) with Lipid Bilayer Affinity and Antibacterial Activity." Biomacromolecules, v.20, p.2743-2753, 2019.

3. **Artigos submetidos**

1) BBA – Biomembranes, submetido em 05/04/2019; revisão em preparação. Experimentos adicionais foram solicitados.



BBA Biomembranes

Contact us Help ?

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: cabrera.marcia@gmail.com
Switch To: Author Go to: My EES Hub

Version: EES 201

Submissions Needing Revision for Author Marcia Perez Dos Santos Cabrera, PhD

A submission has been returned to you for revision. To revise the submission, click 'File Inventory' in the Actions menu to download any files requiring revision. When you are ready to submit the revised files, click 'Revise Submission' and then 'OK' to begin the submission process.

For more information, click here, or view this short tutorial on submitting a revision.

If you do not want to submit a revised version, click 'Decline to Revise' and then 'OK'. Your submission will be moved to the Declined Revisions folder.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Date Revision Due	Current Status	View Decision
View Submission File Inventory Revise Submission Decline to Revise Send E-mail	BBAMEM-19-116	Short wasp venom peptide Protonectin, structure-function investigation on model membranes and on metastatic breast cancer cells	Apr 05, 2019	Jul 05, 2019	Revise	Major Amendment

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Cabrera, M. (2019)

2) BBA – Biomembranes, submetido em 23/05/2019

BBA Biomembranes

Contact us
Help ?

ELSEVIER

Username: cabrera.marcia@gmail.com
Switch To: Author Go to: My EES Hub

Version: EES 201

me | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Submissions Being Processed for Author Marcia Perez Dos Santos Cabrera, PhD

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
View Submission Send E-mail	BBAMEM-19-168	Membrane interactions of Jelleine-I and analogs: lowering aggregation and increasing activity.	May 23, 2019	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

4. Orientação concluída (doutorado)

Danubia Batista Martins, bolsista CAPES, "Interações de Peptídeos de Cadeias Curtas e Bicamadas Lipídicas: Estudo Biofísico e Reflexos sobre a Atividade Biológica.", 2018.

5. Orientação em andamento (mestrado)

Vinicius Eleotério Fazani, bolsista CAPES, "Interações de Peptídeos e Sistemas Miméticos de Membranas: Aplicação de "Ghosts" na Busca pela Seletividade."

6. Participações em bancas de defesa

1) Doutorado: Ana Maria Chaux Gutierrez, "Avaliação da liofilização para produção de criogéis como material de parede e sua aplicação na encapsulação de betalaínas." 2019.

2) Doutorado: Taísa Giordano Viegas, "Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptideos antimicrobiano MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo." 2019.

3) Doutorado: Danubia Batista Martins, "Interações de Peptideos de Cadeias Curtas e Bicamadas Lipídicas: Estudo Biofísico e Reflexos sobre a Atividade Biológica", 2018.

7. Revisão de periódicos

1) Theranostics, 1 trabalho, 2018

2) J. Medicinal Chemistry, 1 trabalho, 2019.

8. Colaborações

1) Profa. Dra. Natalia Bueno Leite, UFTM, Uberaba, MG. Interações do antioxidante quercetina e bicamadas lipídicas; Estudo por medidas de potencial zeta da interação entre compostos bioinorganicos e membranas modelo.

2) Profa. Ana Carolina Gomes Jardim. UFU, Uberlandia, MG. Potencial antiviral de peptídeos antimicrobianos nos vírus ZIKA e Chikungunya.

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

Relatório técnico

"Síntese de Peptídeos Envolvidos em Atividades Inflamatória e Nociceptiva e Investigação de seus Mecanismos de Interação"

Resumo do Projeto

Venenos de vespa constituem uma rica fonte de peptídeos providos de diferentes atividades de interesse na busca por novos fármacos mais eficientes, menos sujeitos ao desenvolvimento de resistência, como no caso daquelas com ação antimicrobiana ou tumoricida, ou ainda que interfiram de maneira original nas rotas de processos inflamatórios ou nociceptivos. Um exemplo dessa riqueza está no veneno da vespa *Polybia paulista*, onde além dos tradicionais mastoparanos, novos peptídeos ciclizados pela presença de uma ligação dissulfeto foram encontrados. Um deles, Paulistine I, apresenta bom potencial como modelo para o desenvolvimento racional de novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias. Entretanto, outro peptídeo, Paulistine II, com alto grau de homologia ainda não foi estudado. Neste plano de pesquisa propomos sintetizar esses peptídeos, assim como seus análogos na forma reduzida, além de 4 outras sequencias sendo, as porções lineares dos respectivos N- e C-terminais e um análogo modificado na porção intermediária ciclizada. Esses peptídeos serão avaliados em imuno-ensaios para caracterizá-los como possíveis inibidores da enzima COX-2, seletivamente em relação à COX-1, e ainda, observando mudanças estruturais e nas interações eletrostáticas da superfície da enzima induzidas pela ligação desses peptídeos com a enzima COX-2. O objetivo final é avançar no conhecimento das relações estrutura-função importantes para o desenvolvimento de peptídeos com ação anti-inflamatória e anti-nociceptiva.

RESUMO DO DESENVOLVIMENTO

1. Síntese dos peptídeos Pulistina-I (Pauli-I), Paulistina-II, Sedulina, Pallipina, Pallipina-III e Silverina).

• Purificação e repurificarão dos peptídeos sintéticos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

• Confirmação das massas moleculares dos peptídeos e pureza das amostras provenientes da

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

cromatografia por Espectrometria de Massas ESI-MS/MS.

2. Experimentos de dicroísmo circular para caracterização estrutural de peptídeos em tampão (pH 7,4) e em ambientes anisotrópicos, solução de trifluoroetanol 40% e solução de dodecil sulfato de sódio 8mM (suspensão de micelas aniônicas)

3. Experimentos de medida de potencial zeta na presença de vesículas zwitterionicas (fosfatidilcolina) e aniônica (fosfatidilcolina 70%, fosfatidilserina 30%) e determinação de efeitos de variação de tamanho dessas vesículas por espalhamento de luz (DLS) nas mesmas vesículas.

1. Introdução

Venenos de vespa são compostos por uma mistura complexa de aminoácidos livres, aminas e uma série de peptídeos policatiônicos e proteínas. Os peptídeos representam cerca de 70% da massa seca dos venenos de vespas sociais. A maioria apresenta cadeias lineares, tem caráter catiônico e assumem estruturas anfipáticas e predominantemente helicoidais. Em geral, esses peptídeos causam lise das células, hemólise, antibiose, contração de músculos lisos e quimiotaxia. Podem ainda promover a liberação de conteúdos de mastócitos, leucócitos e plaquetas através de interações com receptores da proteína G nas membranas plasmáticas dessas células (Gomes et al., 2014; Arcuri et al., 2016).

No veneno da vespa *Polybia paulista* foi recentemente encontrado um peptídeo, denominado Paulistina-I, com uma estrutura incomum, com 21 resíduos na sequência e uma única ligação dissulfeto intramolecular. Esse peptídeo foi caracterizado físico-quimicamente, biológica e estruturalmente (Gomes et. al., 2014). Não apresenta atividade antimicrobiana, nem causa hemólise ou degranulação de mastócitos, mas exibe alta quimiotaxia em relação a leucócitos polimorfonucleados, indicando que provavelmente esses peptídeos seja capaz de interagir com receptores de membrana do tipo proteínas-G responsáveis pela ativação da quimitotaxia e sugerindo seu envolvimento em processos inflamatórios. Bioensaios mostraram que Paulistina-I causa hiperalgesia por interagir com receptores dos mediadores lipídicos envolvidos nos processos da ciclooxigenase tipo II (Gomes et al., 2014).

No mesmo veneno outro peptídeo de alta homologia com este foi encontrado e denominado Paulistina-II e ainda bem pouco estudado. Adicionalmente, Baptista-Saidemberg et al. (2011) pesquisaram via analise peptidomica o veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, uma das mais agressivas, e encontraram 8 frações que correspondem a peptídeos com propriedades inflamatórias, entre eles a Pallipina-III. Assim como a Pallipina-I e –II apresentam uma única ligação dissulfeto,

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

uma característica raramente encontrada dentre os peptídeos de venenos de vespas sociais. Esse tipo de estrutura é considerado biologicamente relevante em outras fontes. Pallipina-III não é hemolítica e nem degranuladora de mastócitos, mas não apresenta quimiotaxia. Além disso a Pallipina–III apresentou resultado negativo tanto para hipernocicepção quanto edema nas doses testadas (10, 30 e 50 µg/50 µL), mas na avaliação de efeito analgésico utilizando o estímulo algogênico (carragenina), a Pallipina-III apresenta efeito analgésico, revertendo o efeito nociceptivo da carragenina e bloqueando o edema induzido pela carragenina. Adicionalmente, a Pallipina-III inibe significativamente a secreção de insulina das ilhotas pancreáticas. Anteriormente às Pallipinas (Baptista-Saidemberg et al., 2011) e às Paulistinas (Gomes et al., 2014), há outras duas, a Pallipina (Costa, 1996) e a Silverina (Dohtsu et al., 1993). A Pallipina também não é hemolítica, mas apresenta atividade secretora de serotonina semelhantemente à Silverina. Sua característica mais interessante é a intensa liberação de histamina de mastócitos sem causar hemólise, o que a distingue dos peptídeos mastoparanos, característicos dos venenos de vespas (Dohtsu et al., 1993). Assim como a Pallipina-III, a Silverina também causa inibição da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Corsi 2001). Além desses peptídeos, mais um a Sedulina (Palma, M. S., dados não publicados) foi encontrada na vespa *Protopolybia sedula.*

Nesse conjunto de peptídeos há limitada existência de estudos sobre eles e as diferenças até agora encontradas entre as respectivas atividades biológicas, mas principalmente o possível envolvimento em mecanismos de dor e inflamação, fez com que o grupo envolvido considerasse significante o estudo comparativo dessas sequencias (Gomes et al., 2014) e o futuro envolvimento de outros estudantes.

2. Materiais e Métodos

2.1 Síntese automática de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos foram sintetizados em um sintetizador automático, modelo Prelude (PROTEIN TECHNOLOGIES INC., USA), através do método de síntese em fase sólida (Merrifield, 1986), utilizando-se N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecido como estratégia Fmoc. Para isso utilizamos 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmol e/g. Em cada ciclo da síntese adicionou-se Fmoc-aminoácido-OH (Novabiochem), contendo N-Hidroxibenzotriazol hidratado (HOBt.H_2O) (Novabiochem) e N-Metilmorfolina (NMM, Aldrich) como agentes ativadores dos aminoácidos e Hexafluorofosfato benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfato (PyBOP, Novabiochem) como agente acoplante, mantendo-se por 30 min. Após cada ciclo

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

de acoplamento foram realizadas cinco lavagens da resina com N-N-Dimetilformamida (DMF, SIGMA) e em seguida realizada a desproteção utilizando Piperidina (SIGMA) 30% (v/v) em DMF. Todas as reações foram realizadas sob agitação mecânica em capela de segurança. Após a acoplagem do último resido de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador. Após a secagem, foi feita a clivagem entre o peptídeo e a resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapura 5% (v/v), sob agitação mecânica durante 2 horas. Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-Peptídeo foi filtrada para retirada da resina e centrifugada sob refrigeração por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico para promover a sedimentação do peptídeo e uma primeira etapa de retirada de solventes e subprodutos da síntese. O material sedimentado foi re-suspenso em água bidestilada e ultrapura e então purificado via cromatografia líquida. Foi utilizado o grupo Tritil na síntese dos peptídeos cíclicos em sua forma oxidada (com a ponte de dissulfeto) conforme Gomes et al., 2014. Os peptídeos com as pontes dissulfeto foram obtidos por oxidação ao ar dos resíduos de cisteína (Alberício et al., 2004). O controle de qualidade foi feito através de espectrometria de massas ESI-MS.

2.2 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A purificação dos peptídeos provenientes da síntese foi feita através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, *Reversed-phase High Performance Liquid Chromatrography*) utilizando um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com "*loop*" de 0,5 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo CBM-10A) e coluna semi-preparativa Shimpack C-18 PREP-0DS(K) 50x250 mm (SHIMADZU). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes: *A,* água, contendo 0,05 % TFA v/v e *B,* acetonitrila 100% (MALLINCKRODT) contendo 0,05 % TFA v/v. O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 1 mL/min. Para cada peptídeo foi utilizada uma eluição isocrática específica, em diferentes concentrações de acetonitrila (solvente B). Todas as frações obtidas nos cromatogramas foram coletadas e analisadas por espectrometria de massas. A fração correspondente ao peptídeo sintético foi coletada e parcialmente evaporada em equipamento Rotavapor, sendo então distribuídas em tubos Falcon de 50 mL, congeladas e liofolizadas até quase

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

completa secagem. O material restante foi transferido para frascos Eppendorf, e secos em Speed-vac.

2.3. Espectrometria de massas ESI

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas com fonte ESI, do tipo "*Ion Trap-Time of fly*" (IT-ToF, SHIMADZU) O software *LCMS solution* (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição e análise de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 250ºC, a voltagem na agulha a 4.5 kV e a voltagem no cone a 3.5V. O fluxo de gás secante (nitrogênio) foi de 5 L/min. e o fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 1.5 L/min. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 2000, com uma resolução de aproximadamente 15000. O sistema de aquisição de dados foi operado em modo positivo contínuo, por cerca de 2 minutos.

2.4. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

Espectros de CD foram coletados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, usando um espectropolarímetro Jasco-815 (Tokyo, Japan), a 25ºC, utilizando cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico e tomando-se 10 acumulações. A elipticidade observada, θ (mdeg), após corrigida em função da diluição, quando necessário, foi descontada da respectiva linha de base. Esses dados foram convertidos para elipticidade molar média por resíduo, [Θ], usando a relação

$[\Theta]\ (\mathrm{deg\ cm2/dmol}) = \frac{100 \cdot \theta}{l \cdot c \cdot n}$ onde *l* é o caminho óptico em cm, c é a concentração de peptídeo em mM e n é o número de ligações peptídicas possíveis. Os espectros foram obtidos para os peptídeos, na presença de tampão, de solução aquosa de 2,2,2 trifluoretanol 40% e de solução micelar de dodecil sulfato de sódio 8 mM.

2.5 Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Filmes finos de fosfolipídeos na composição desejada foram obtidos a partir de alíquotas da das respectivas soluções estoque em clorofórmio por evaporação do solvente sob fluxo de N_2 em tubos de vidro de fundo arredondado seguida de secagem sob vácuo por no mínimo 3 h. Os filmes foram hidratados pela adição do tampão HEPES 10 mM, pH 7,4, contendo 150 mM NaF em

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

temperatura ambiente. Após a hidratação a suspensão é homogeneizada em vortex durante cerca de 3 minutos. Para a obtenção de LUVs, a suspensão é submetida à extrusão através de membranas de policarbonato (6 vezes em membranas de 400 nm e 11 vezes em membranas de 100 nm) em mini-extrusor AVANTI. A concentração de fosfolipídeos é determinada pela pesagem cuidadosa dos fosfolipídeos e das soluções; o tamanho das vesículas é controlado por medidas no equipamento ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK).

Foram usados os fosfolipídios: palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (PC) e palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (PS) fornecidos pela AvantiLipids (Alabaster, AL), nas seguintes relações molares: 100% PC, e PC/PS 70:30.

2.6 Preparação das soluções de peptídeos

Massas conhecidas de cada peptídeo foram diluídas em água ultra-pura na razão de 1 mg/mL, homogeneizadas em vortex, fracionadas e mantidas congeladas até o momento de realizar cada experimento.

2.7 Potencial zeta e determinação de tamanho de vesículas (DLS)

Potencial zeta de vesículas foi determinado na ausência (ζ_0) e na presença de concentrações crescentes dos peptídeos em estudo, utilizando o equipamento ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), em uma cela de polipropileno específica. A adsorção dos peptídeos às vesículas altera sua densidade de carga e conseqüentemente o potencial zeta, sinalizando se a ligação ocorre. O potencial zeta foi calculado através da mobilidade eletroforética, υ_E, de acordo com a equação de Helmholtz-Smoluchowski: $\zeta = \eta\upsilon_E / \varepsilon\varepsilon_0$, onde η é a viscosidade da fase aquosa, ε é a permissividade do vácuo e ε_0=78 é a constante dielétrica da água. Os valores de viscosidade e índice de refração da água são 0,8872 cP e 1,33, respectivamente (Dos Santos Cabrera et al., 2009).

O tamanho médio das vesículas na ausência e na presença dos peptídeos será determinado por espalhamento de luz usando uma fonte de luz laser He-Ne (633 nm), operando a um ângulo de espalhamento de 173º, no mesmo equipamento.

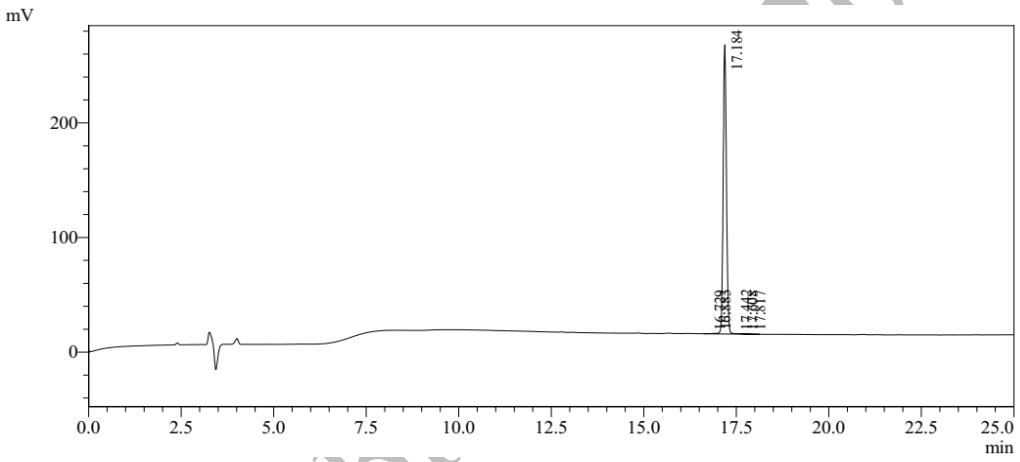
Dos Santos Cabrera, M. (2019)

3. Resultados e Discussão

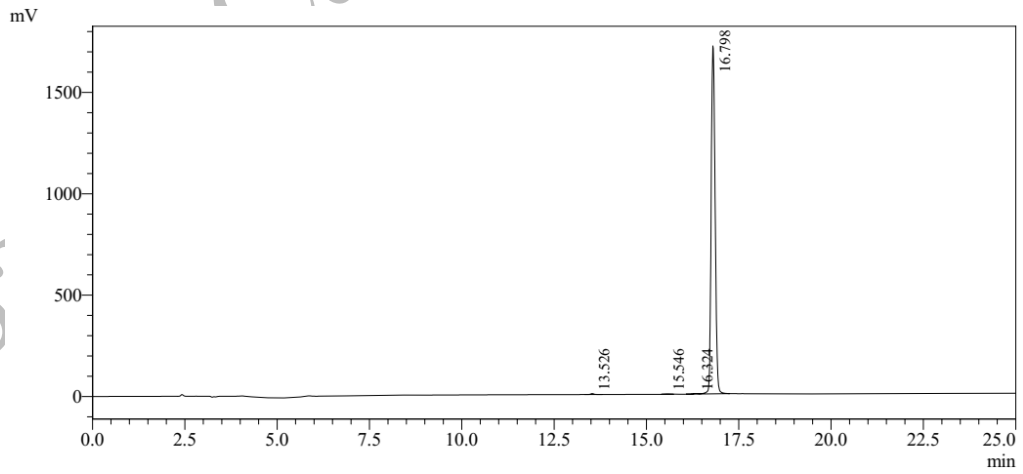
3.1. Síntese, purificação e controle de qualidade dos peptídeos

Os peptídeos obtidos a partir da síntese foram purificados conforme mostram os cromatogramas (Figura 2). A Tabela 2 resume as características principais de cada peptídeo, dentre elas os tempos de retenção indicados pelos picos principais desses cromatogramas. Essas condições de purificação foram repetidas para a amostra sintética até obtenção de uma quantidade de amostra suficiente para a realização das análises propostas neste projeto e para sua continuidade.

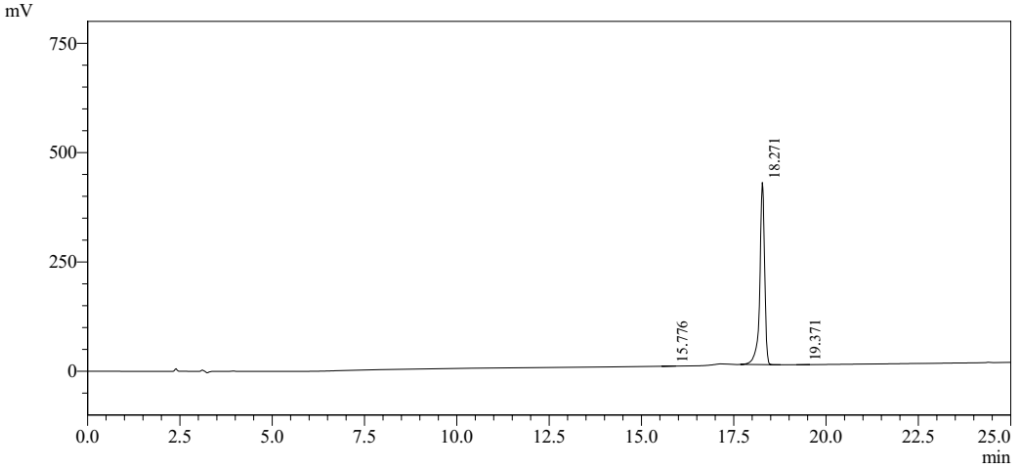
A) Paulistina-I



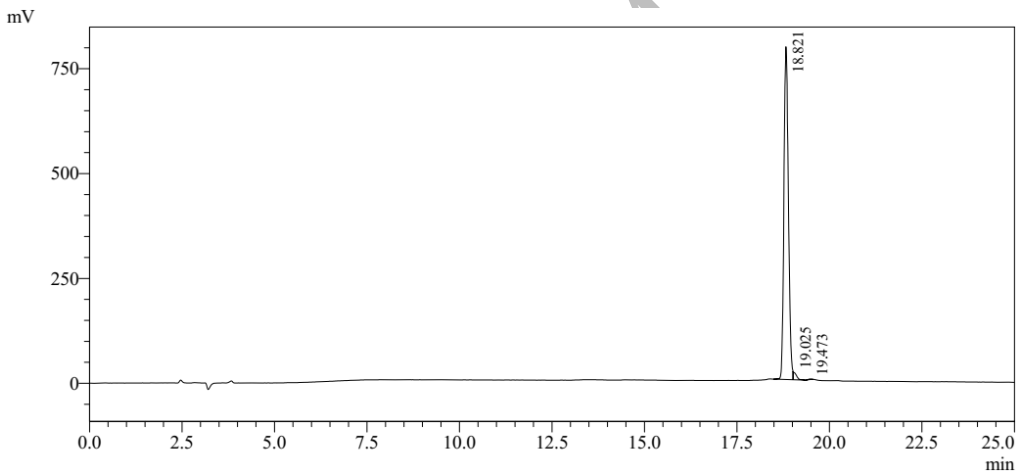
B) Paulistina-II



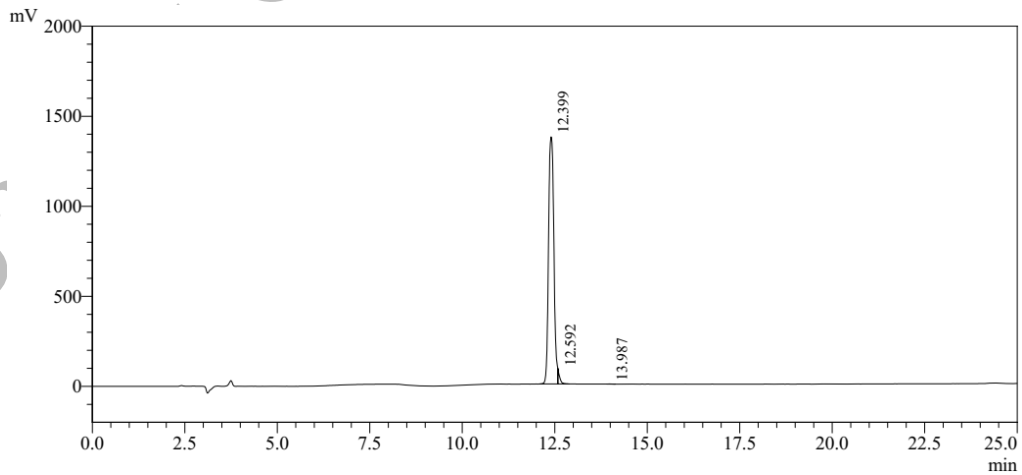
C) Sedulina



D) Pallipina



E) Pallipina-III



F) Silverina

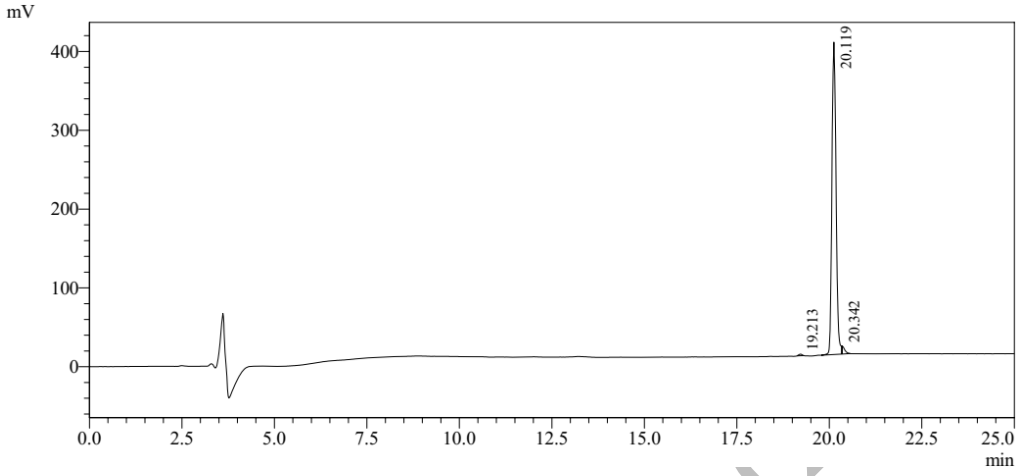
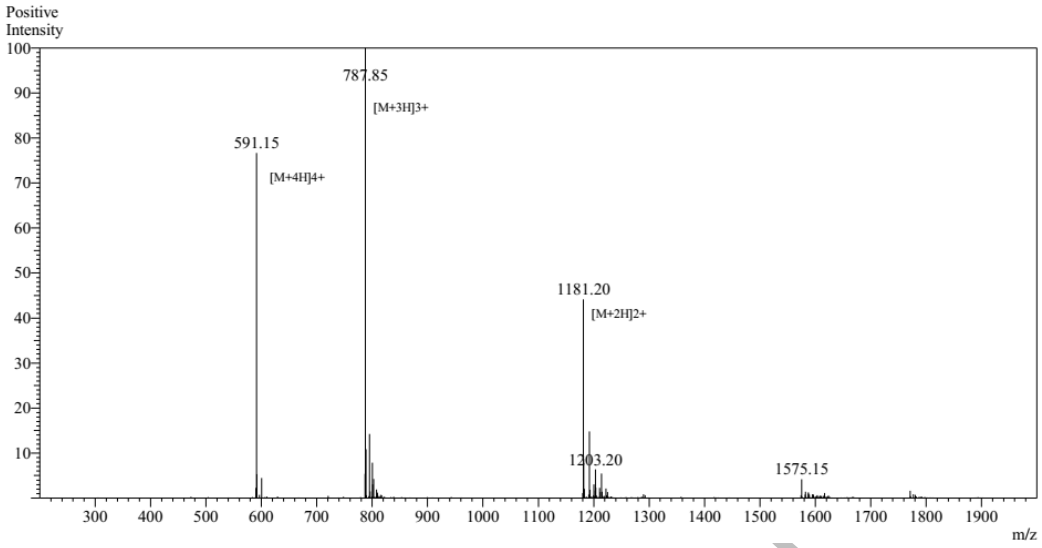


Figura 2. Perfil cromatográfico sob fase reversa dos peptídeos **A**) Paulistina-I; **B)** Paulistina-II; **C)** Sedulina; **D)** Pallipina; **E)** Pallipina-III; **F)** Silverina nas condições isocráticas de acetonitrila 5% v/v, contendo TFA 0,1% v/v, exceto para Pallipina-III onde a concentração de acetonitrila é de 15%. Fluxo de 1 mL/min.

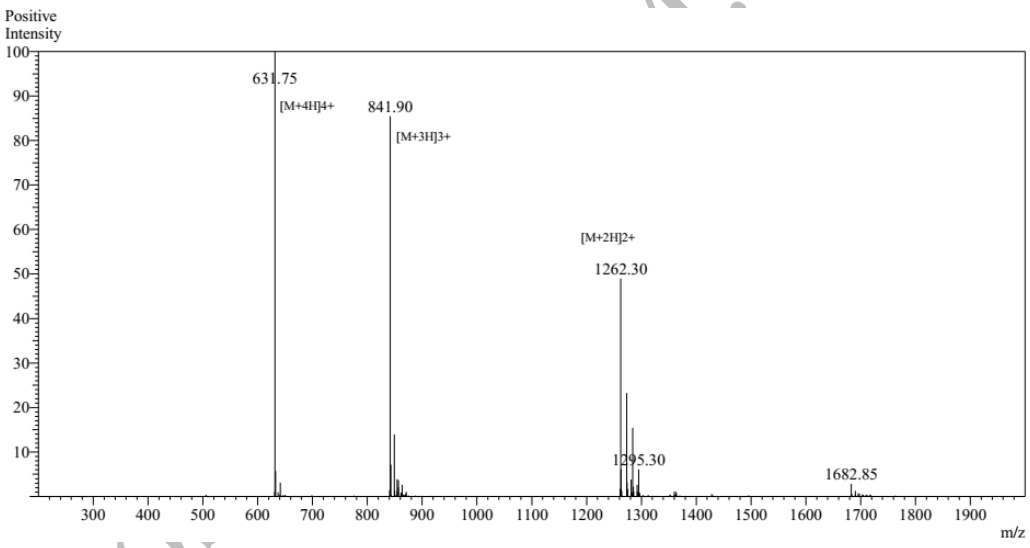
Após o término da purificação de todos os peptídeos, foram feitas as análises de espectrometria de massas. Esses experimentos foram realizados tanto para a confirmação das massas corretas, quanto para verificação da pureza de cada amostra após a cromatografia (Figura 3). Os íons observados estão assinalados em cada espectro, em geral aqueles com valores de m/z ($[M+2H]^{2+}$), ($[M+3H]^{3+}$) e ($[M+4H]^{4+}$). A Tabela 2 mostra as massas monoisotópicas calculadas observadas em comparação às massas experimentais e o grau de pureza dos peptídeos sintetizados. Os desvios nos valores de massas experimentais e calculadas são inferiores a 1 u.m.a, sendo que essas pequenas diferenças decimais são referentes ao erro experimental e resolução do equipamento, os quais se encontram dentro das condições analíticas permitidas. Esses resultados mostram que os peptídeos obtidos foram corretamente sintetizados e estão adequados à continuidade dos experimentos.

Dos Santos Cabrera, M.

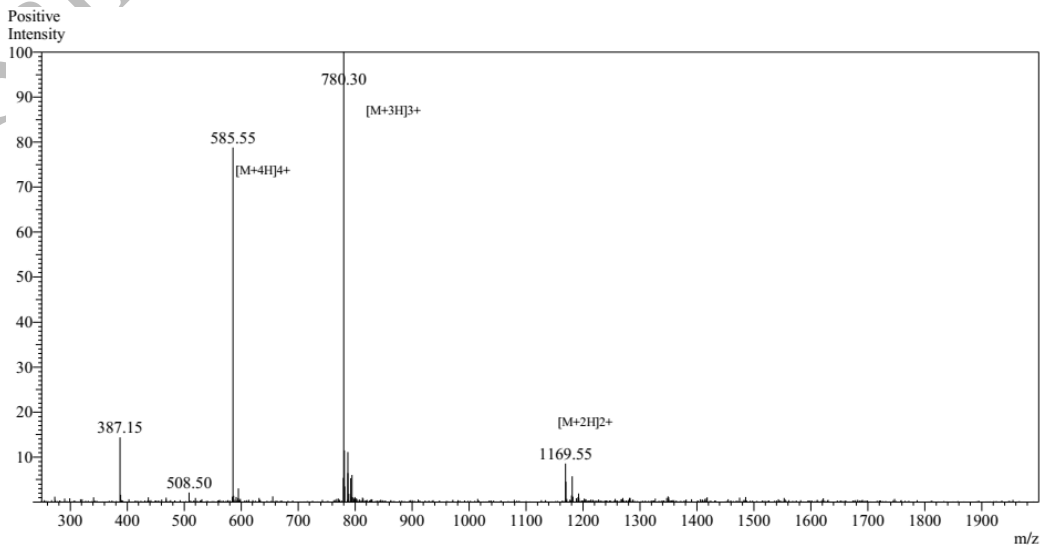
A) Paulistina-I



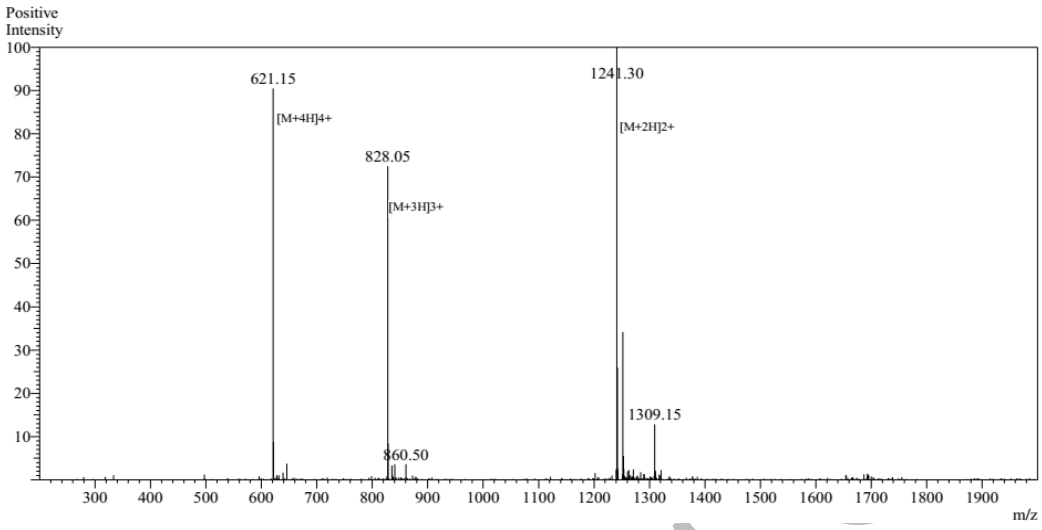
B) Paulistina-II



C) Pallipina



D) Pallipina-III



E) Silverina

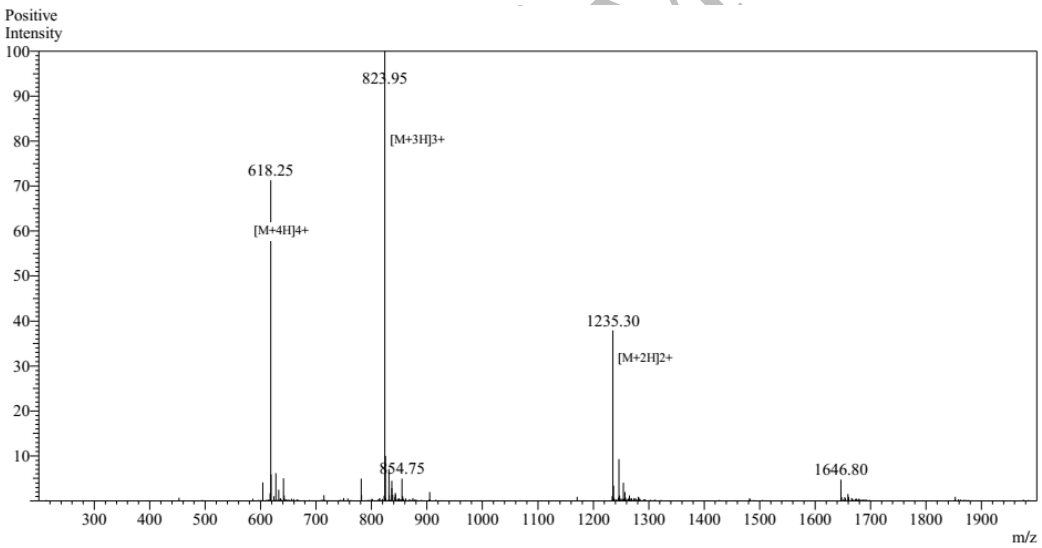


Figura 3. Espectros de massa ESI-MS, no modo positivo, dos peptídeos **A**) Paulistina-I; **B)** Paulistina-II; **C)** Sedulina; **D)** Pallipina; **E)** Pallipina-III; **F)** Silverina após a purificação por HPLC.

Tabela 2. Características físico-químicas dos peptídeos deste estudo. Número de resíduos nas sequencias (aa), % pureza, carga liquida (Q) em pH 7.5, hidrofobicidade média (<H>) calculado de acordo com Eisenberg et al. (1984).

Peptideos	aa	Pureza	Q	<H>
Pauli-I	21	99,334	+4	-0,170
Pauli-II	22	99,473	+5	-0,161
Palli	20	98,242	+4,5	-0,107
Palli-III	22	98,120	+8,5	-0,277
Silver	22	98,036	+4	-0,177

3.2 Investigação da estrutura secundária

Para determinar a formação de estruturas secundárias induzidas pela presença de ambientes miméticos de membranas e indiretamente conhecer a afinidade dos peptídeos às bicamadas fosfolipídicas, espectros de dicroísmo circular foram obtidos em solução aquosa, na presença de solução de TFE (40%) e de SDS (8 mM).

Apesar da existência da ponte dissulfeto, os espectros em água dos peptídeos Paulistina-I, Paulistina-II, Pallipina e Pallipina-III são compatíveis com a predominância de estruturas aleatórias, com mínimos ao redor de 200 nm (Figura 4A a D), enquanto os espectros de Sedulina e Silverina apresentam um mínimo principal ao redor de 205-208 nm e um mínimo secundário ao redor de 222 nm, sugerindo que mesmo em ambiente aquoso exista alguma contribuição de estruturas helicoidais. Na presença de TFE, um indutor de estruturas secundárias, todos os espectros apresentam as características contribuições das estruturas helicoidais em maior ou menor grau, exibindo mínimos ao redor de 208 e 222 nm, sendo que o grau de estruturação decresce na seguinte ordem: Silverina>Sedulina>Pallipina-III>Paulistina-I≈Paulistina-II>Pallipina (considerando a elipticidade molar em 222 nm). Este último espectro sugere a que contribuição de voltas deva ser importante. Na presença de micelas aniônicas de SDS, ocorre maior indução de estruturas helicoidais apenas para as Paulistinas, indicando que para esses peptídeos seja maior a importância das interações eletrostáticas. Entretanto, no caso da Paulistina-I esse resultado não concorda com

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

aqueles anteriormente obtidos (Gomes et al., 2014). Para os demais peptídeos, a presença de SDS induz estruturação menor ou igual que TFE.

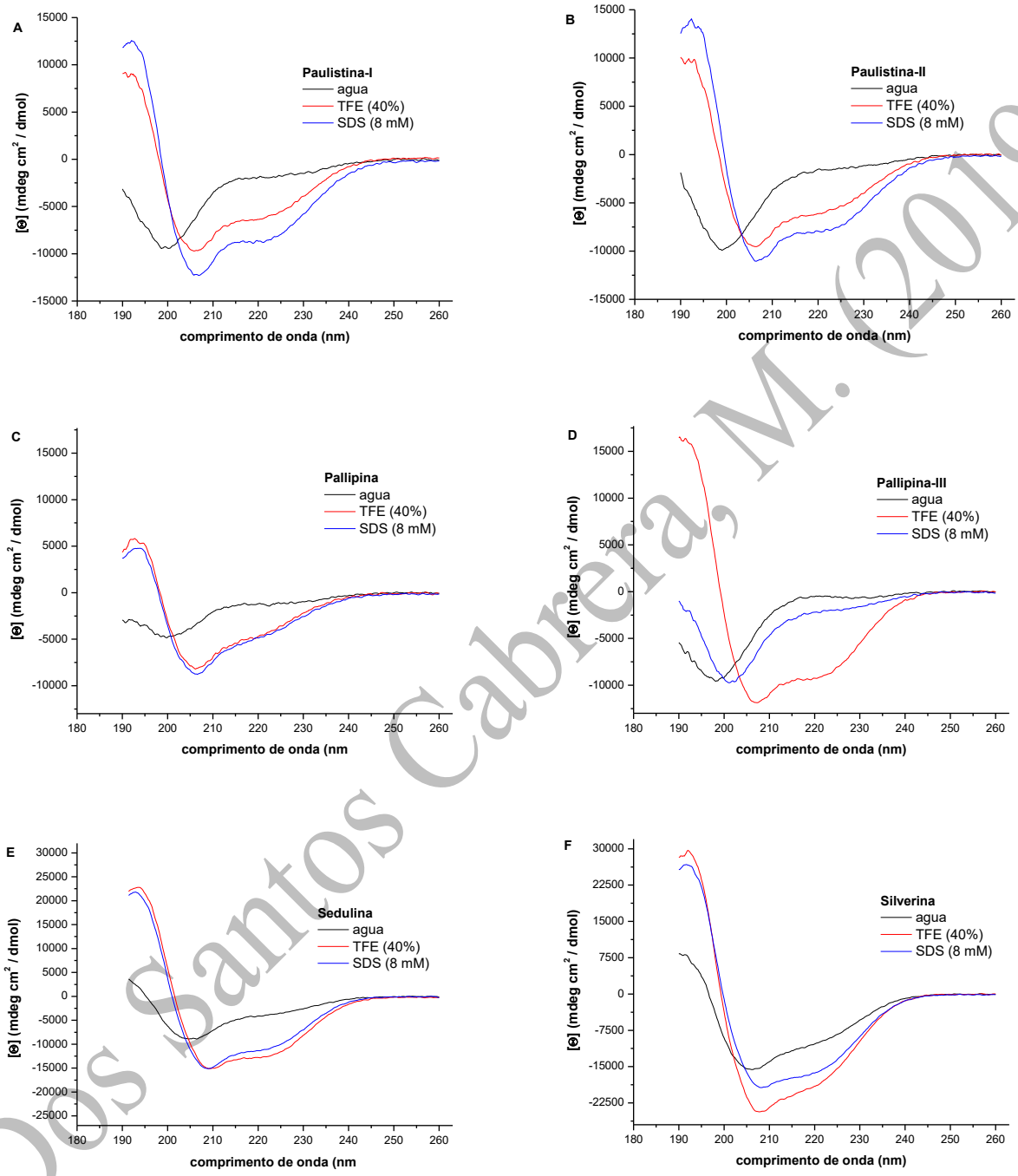
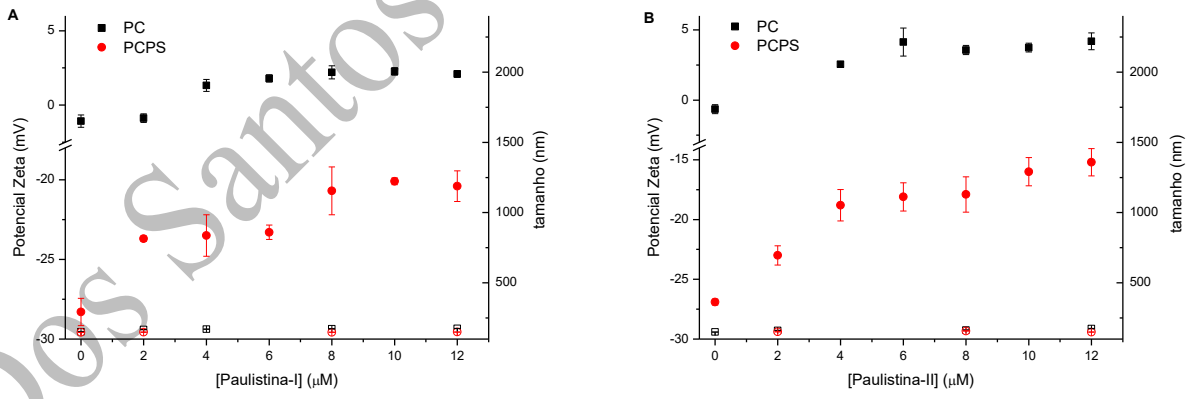


Figura 4. Espectros de CD dos peptideos na concentração de 20 µM, em água, em TFE (40% e em SDS (8 mM), à 25ºC. **A**) Paulistina-I; **B)** Paulistina-II; **C)** Pallipina; **D)** Pallipina-III; **E)** Sedulina; **F)** Silverina. Nenhuma suavização foi aplicada.

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

3.3 Investigação da interação com modelos de membrana

A Figura 5 apresenta a variação de tamanho das vesículas em função da concentração dos peptídeos (eixo y, à direita, símbolos abertos), nas mesmas amostras em que a seguir se determinou a variação de potencial zeta. Nenhum dos peptídeos causou variações significativas de tamanho nas LUVs de PC ou PCPS, nas condições destes experimentos, exceto a Pallipina-III. Esse peptídeo é o de maior cationicidade e esse efeito de aumento de tamanho pode ser atribuído à formação de um agregado de vesículas, recrutadas para promover a neutralização da alta densidade de carga da Pallipina-III. As mesmas figuras mostram também a variação do potencial zeta induzido pela ligação dos peptídeos à superfície das LUVs. Todos os peptideos causam diminuição do potencial eletrocinético inicial (ζ_0) com o aumento da concentração, tanto em vesículas PC como em PCPS. Nas vesículas zwitterionicas a variação de potencial zeta é significativamente menor que nas aniônicas, provavelmente indicando uma limitada interação com essas vesículas PC. Como potenciais zeta dependem apenas do número de moléculas de peptídeo carregadas que se ligam à superfície externa da bicamada, esses resultados indicam que os peptideos apresentam maior afinidade pela vesícula PCPS. Em geral, os seis peptídeos apresentam interações bastante similares entre si com os dois tipos de vesículas considerados. Há uma redução de potencial zeta de 8 a 12 mV entre aquele que menos se liga às vesículas PCPS, a Sedulina, e os que mais particionam, Paulistina-II e Silverina. Em todos os casos a variação é mais acentuada até 4 μM tendendo, a seguir, a um platô que indica saturação das vesículas.



Dos Santos Cabrera, M. (2019)

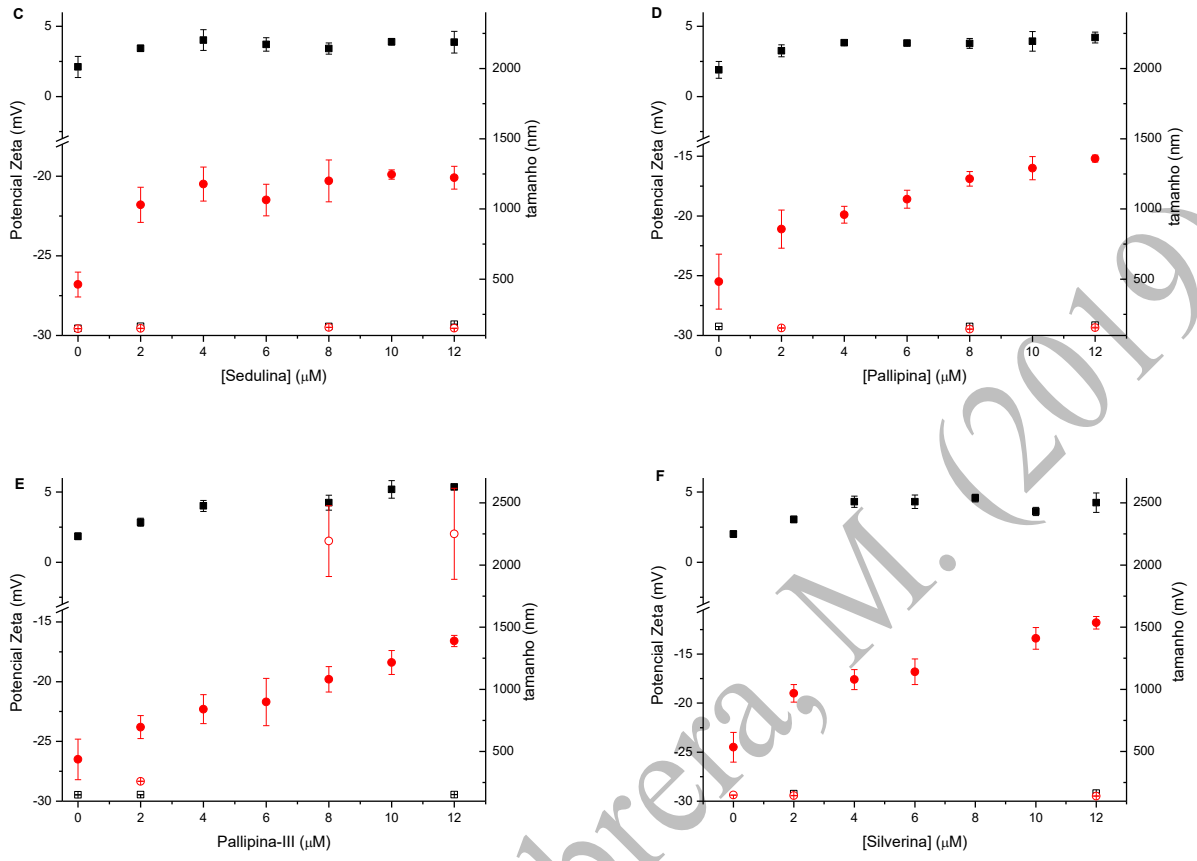


Figura 5. Determinações de potencial zeta em 100 μM LUVs PC e PCPS, obtidas com concentrações crescentes dos peptideos, após 15 minutos de repouso para estabilização (símbolos cheios), pH 7,4, a 25ºC. As mesmas amostras foram avaliadas quanto ao tamanho (símbolos abertos). O potencial zeta das LUVs na ausência de peptídeo (ζ_0) é de aproximadamente -1,6±0,4 mV em PC e -27,6±0,8 para PCPS e o tamanho é de aproximadamente 150 nm para ambas composições. **A**) Paulistina-I; **B)** Paulistina-II; **C)** Sedulina; **D)** Pallipina; **E)** Pallipina-III; **F)** Silverina.

4. Comentários finais

Este projeto propôs primeiramente contribuir para novas qualificações da bolsista em relação a síntese de peptídeos, como destaca este relatório. Além disso, propôs estudar peptídeos com atividade inflamatória e/ou nociceptiva, o que ocorreu parcialmente. As dificuldades iniciais com as sínteses e caracterizações, e a demora nas purificações atrasou a execução dos testes envolvendo a proteína COX. Esta etapa completada permitirá avaliar melhor os resultados a serem obtidos nos testes envolvendo a proteína COX, graças ao melhor entendimento da influencia das interações eletrostáticas. A grande vantagem trazida pela ciclização em relação a degradação

Dos Santos Cabrera, M. (2019)

proteolítica, reorientou o estudo priorizando a síntese e caracterização dos peptídeos cíclicos, enquanto a obtenção futura dos análogos lineares fica facilitada em termos de síntese (apenas mais uma etapa a partir dos estoques existentes).

5. Referências

P. C. Gomes, B. M. de Souza, N. B. Dias, P. Brigatte, D. Mourelle, H. A. Arcuri, M. P. Dos Santos Cabrera, R. G. Stabeli, J. Ruggiero Neto, M. S. Palma. Structure–function relationships of the peptide Paulistine: A novel toxin from the venom of the social wasp Polybia paulista. Biochim. et Biophys. Acta 1840 (2014) 170–183.

H. A. Arcuri, P. C. Gomes, B. M. de Souza, N. B. Dias, P. Brigatte, R. G. Stabeli, M. S. Palma. Paulistine — The Functional Duality of a Wasp Venom Peptide Toxin. Toxins 8 (2016) 61-75.

N. B. Baptista-Saidemberg, D. M. Saidemberg, M. S. Palma. Profiling the peptidome of the venom from the social wasp Agelaia pallipes pallipes. J. Proteomics 74 (2011) 2123–2137.

N. B. Baptista-Saidemberg. Análise peptidômica dos venenos de vespas sociais neotropicais. 135p. (Doutorado em Ciencias Biologicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

H. Costa, H. Caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Angelaia pallipes pallipes* (Hymenoptera-Vespidae). 122p. (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

K. Dohtsu, K. Okumura, M. S. Palma, T. Nakajima. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Himenoptera – Vespidae). Natural Toxins, 1 (1993) 271-276.

M. C. C. Corsi. Estudo dos peptídeos sintéticos em algumas etapas do mecanismo de secreção de insulina por células beta pancreáticas. 42p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

B. Merrifield. Solid phase synthesis. Science 232 (1986) 341 – 347.

F. Albericio, I. Annis, M. Royo, G. Barany, Preparation and handling of peptides containing methionine and cysteine, in: C. Cheng, P.D. White (Eds.), Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford Univ. Press, Oxford, U.K., 2004, pp. 77–114.

M. P. Dos Santos Cabrera, M. Arcisio-Miranda, l. C. da Costa, B. M. de Souza, S. T. Broggio Costa, M. S. Palma, J. Ruggiero Neto, J. Procopio. Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: a comparative biophysical study. Arch. Biochem. Biophys., 486 (2009) 1-11.

D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J Mol Biol 179 (1984) 125-142.

Dos Santos Cabrera, M. (2019)