

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA



Sínteses e Estudos Estrutura/Função de um Peptídeo  
Extraído da Rã *Hypsiboas albopunctatus* e Análogos

GRAZIELY FERREIRA CESPEDES

Mestrado

Araraquara-SP  
2009

GRAZIELY FERREIRA CESPEDES

Sínteses e Estudos Estrutura/Função de um Peptídeo  
Extraído da Rã *Hypsiboas albopunctatus* e Análogos

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

**Orientador: Eduardo Maffud Cilli**  
**Co-orientador: Reinaldo Marcheto**

INSTITUTO DE QUÍMICA  
Araraquara  
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

C422s Cespedes, Graziely Ferreira  
Sínteses e estudos estrutura/função de um peptídeo extraído da rã *Hypsiboas albopunctatus* e análogos / Graziely Ferreira Cespedes. –  
Araraquara : [s.n], 2009  
94 f. : il.

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

1. Biotecnologia. 2. Síntese de peptídeos em fase sólida. 3. Fluorescência.  
4. Estruturas de peptídeos. I. Título.

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

## GRAZIELY FERREIRA CESPEDES

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

Araraquara, 18 de fevereiro de 2009.

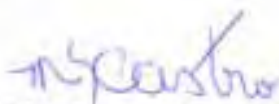
### BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Mariana de Souza Castro  
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB, Brasília

## *Dedicatória*

*A rainha da minha vida, a que Deus escolheu pra ser a minha luz, meu guia, à  
você Mamãe Ana, que me ensinou a ser tão pura e verdadeira com as pessoas, obrigada,  
por ser minha fiel companheira, amiga e mãe. Você é a melhor criatura do mundo, a mais  
bondosa, mais amorosa e mais incrível.*

*Dedico este trabalho inteiramente a você, pois se eu cheguei onde estou, foi porque você  
lutou para isso.*

*Obrigada pela herança maravilhosa de vida que me deixou.*

*Nunca encontrei alguém que tivesse um coração tão cheio de afeto e carinho  
quanto o seu. . . Em você encontro o próprio coração de Deus no  
mundo!!!*

*Eu te amo*

*Eduardo*

*Obrigada pelas inúmeras vezes que deixou de ser o orientador magnífico para ser o amigo, entendendo todas as dificuldades de quem se iniciava nessa jornada, pela paciência ao me ensinar "pausadamente", pela preocupação e compreensão dos meus dias difíceis, por todo carinho e dedicação.*

## *Agradecimentos*

*A Deus pelas oportunidades a mim dadas de evolução e de convívio com pessoas maravilhosas que me ensinam a amar e ser amada.*

*As minhas lindas irmãs, Juliana e Nelma que cuidaram, brigaram e corrigiram minhas atitudes. E pelas longas conversas que me reergueram e me animaram. Eu amo vocês.*

*A você meu querido pai que sempre teve que ligar a TV da sala baixinho para que eu pudesse estudar.*

*A você Lê, que teve muita paciência e amor comigo em todas as vezes que me desequilibrei. Obrigada por toda atenção, cuidado e carinho.*

*Aos amores da minha vida: Édipo, pela grande sintonia que nos liga, por todo amor, pelo carinho, pelas sábias conversas e, Gabriela, que me encanta com sua meiguice a cada dia, e por ser a minha amada ave. Vocês dois são minha fonte de amor. O que seria da minha vida sem vocês? No nosso imenso amor que é eterno.*

*A Elaine minha irmã postíca, que pela nossa linda amizade me proporcionou a honra de ser madrinha da Rosinha Julia.*

*Agradeço aos meus amigos tão prestativos e verdadeiros: Wanessa e Fio Lent 's, por me ajudarem a levantar todas as muitas vezes que caí. Sentirei muita falta e saudades de vocês meus amigos, dos lanches da tarde, das musiquinhas, das freqüentes conversas, do companheirismo, do carinho que cativamos e que somos plenamente responsáveis. Onde quer que cada um esteja terá um endereço certo, meu coração.*

*Agradeço ao meu companheiro de trabalho Enisea que nem imagina o quanto me fez crescer e aprender como pessoa e como cientista. Obrigada por me ensinar com tanta severidade, me induzindo a ser uma pessoa melhor.*

*Agradeço a todas as minhas Tias Ferreiras Amorasas: Tia Zeca, Tia Teta, Tia Amélia, Tia Bina, a Dalzinha nossa querida e amada estrela que foi abrilhantar o céu com sua evolução feita na terra. A todos os meus primos: Jujú, Li, Netinho, Nunc. Obrigada família maravilhosa!!!*

*Ao meu Co-orientador, Reinaldo, pelo apoio, preocupação e co-orientação. E sua esposa Patrícia por ser uma excelente professora despertando em seus alunos conceitos éticos.*

*Aos meus amigos: Bruninha, Buiú, Zezé, Sybele, Fernando (Fefe), Luis Vítor por fazerem meus dias melhores, pela simples presença.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia- CNPq e a FAPESP pelo suporte financeiro.*

*Às "pessoas" da Pós-graduação que muito prestativas deixaram muitas vezes de serem funcionárias para serem amigas, obrigada Sandra, Wenia e Célia.*

*Para as professoras que colaboraram com esse trabalho: Dr<sup>a</sup> Maria José Gianinni e Dr<sup>a</sup> Mariana S. Castro.*

*A todos que direta ou indiretamente puderam contribuir para que esse trabalho fosse concluído.*

*Obrigada a todos aqueles que torceram por mim, só tenho que agradecer a Deus pelos anjos que passam pela minha vida e deixam um pouquinho de si.*

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei,  
 não fosse por elas, eu não teria saído do lugar...*

*Às facilidades nos impedem de caminhar.*

*Mesmo as críticas nos auxiliam muito.*

*Chico Xavier*

E foi então que apareceu a raposa:

- Bom dia, disse a raposa.
- Bom dia, respondeu polidamente o principezinho que se vultou mas não viu nada.
- Eu estou aqui, disse a voz, debaixo da macieira...
- Quem és tu? perguntou o principezinho. Tu és bem bonita.
- Sou uma raposa, disse a raposa.
- Vem brincar comigo, propôs o príncipe, estou tão triste...
- Eu não posso brincar contigo, disse a raposa. Não me cativaram ainda.
- Ah! Desculpa, disse o principezinho.

Após uma reflexão, acrescentou:

- O que quer dizer cativar ?
- Tu não és daqui, disse a raposa. Que procuras?
- Procuo amigos, disse. Que quer dizer cativar?
- É uma coisa muito esquecida, disse a raposa.

Significa criar laços...

- Criar laços?
- Exatamente, disse a raposa. Tu não és para mim senão um garoto inteiramente igual a cem mil outros garotos.

E eu não tenho necessidade de ti.

E tu não tens necessidade de mim.

Mas, se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro. Serás pra mim o único no mundo. E eu serei para ti a única no mundo...

Mas a raposa vultou a sua ideia:

- Minha vida é monótona. E por isso eu me aborreço um pouco. Mas se tu me cativas, minha vida será como que cheia de sol. Conhecerei o barulho de passos que será diferente dos outros. Os outros me fazem entrar debaixo da terra. O teu me chamará para fora como música.

E depois, olha! Vês, lá longe, o campo de trigo? Eu não como pão. O trigo para mim é inútil. Os campos de trigo não me lembram coisa alguma. E isso é triste! Mas tu tens cabelo cor de ouro. E então serás maravilhoso quando me tiverdes cativado. O trigo que é dourado fará lembrar-me de ti. E eu amarei o barulho do vento do trigo...

A raposa então calou-se e considerou muito tempo o príncipe:

- Por favor, cativa-me! disse ela.
- Bem quisera, disse o príncipe, mas eu não tenho tempo. Tenho amigos a descobrir e mundos a conhecer.
- A gente só conhece bem as coisas que cativou, disse a raposa. Os homens não tem tempo de conhecer coisa alguma. Compram tudo prontinho nas lojas. Mas como não existem lojas de amigos, os homens não têm mais amigos. Se tu queres uma amiga, cativa-me!

Os homens esqueceram a verdade, disse a raposa. Mas tu não a deves esquecer.

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas"

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

Cepas bacterianas resistentes aos antibióticos convencionais representam um problema de saúde global com forte impacto social e econômico. Desta maneira, há uma urgente necessidade de desenvolver antibióticos com novos mecanismos de ação. O grupo da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana S. Castro isolou e determinou a seqüência do peptídeo GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI-NH<sub>2</sub>, secretado na pele da rã *Hypsiboas albopunctatus* e qual mostrou atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi avaliar 3 análogos para obter informações a respeito da relação estrutura-atividade biológica. Os peptídeos foram sintetizados por SPFS utilizando a estratégia química Fmoc. As propriedades conformacionais dos peptídeos foram investigadas por CD em água, em TFE (agente indutor de estrutura secundária) e em micelas zwitteriônicas (LPC). As atividades antimicrobianas foram analisadas pela medida da concentração inibitória mínima em bactérias (uma Gram-positiva e duas Gram- negativa) e em fungos. O aminoácido triptofano foi usado como sonda para analisar a profundidade da inserção em miméticos de membrana. Os resultados mostraram que a SPFS foi útil, obtendo um material com alto índice de pureza. Os estudos de CD demonstraram que os peptídeos em água apresentam uma estrutura ao acaso, adquirindo um alto teor de  $\alpha$ -hélice na presença de TFE e LPC. As interações peptídeo/miméticos de membranas indicaram que todos interagiram fortemente com as micelas, mas não com vesículas, com exceção do peptídeo “*wild type*”, que mostrou forte interação com ambos os modelos. Os resultados biológicos demonstraram que todos os peptídeos tem atividade (antibacteriana e antifúngica), porém, o “*wild type*” mostrou valores mais baixos de CIM. Além disso, nossos resultados sugerem que os peptídeos Hy-D-V<sup>16</sup>, Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> podem vir a ser potenciais modelos para o desenvolvimento de novas drogas, pois apresentam uma alta razão atividade antimicrobiana/hemólise. Nossos dados destacaram a importância da modificação de um  $\alpha$ -aminoácido como ferramenta para modelar a atividade dos PAMs, mas não mostrou uma correlação direta com os dados de interação ou de estrutura, mostrando que o mecanismo de ação destes peptídeos não é um tópico fechado.

**Palavras chave:** *Hypsiboas albopunctatus*; síntese de peptídeos em fase sólida; fluorescência, estruturas de peptídeos.

## ABSTRACT

Antibiotic resistant bacterial strains represent a global health problem with a strong social and economic impact. Thus, there is an urgent need for the development of antibiotics with novel mechanisms of action. Castro's group isolated and determined the sequence of the peptide GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI-NH<sub>2</sub> of skin secretion from the frog *Hypsiboas albopunctatus* which showed antimicrobial activity. The aim of the present work was evaluated 3 analogues to supply information about the relationship structure-biological activity. The peptides were synthesized by SPPS using the Fmoc chemical approach. The conformational properties of the peptides were investigated by CD techniques in water, TFE (secondary structure-inducing agent) and in zwitterionic micelles (LPC). The antimicrobial activity was assayed by measuring growth inhibition of bacteria (one Gram-positive and two Gram-negative) and fungus. The tryptophan amino acid was used as probe to analyze the deeply of insertion in membrane mimetic. The result showed that the SPFS proved to be useful, and material with high purity was obtained. The CD studies demonstrated that peptides in water have random coil structure, acquiring high amount of  $\alpha$ -helix in the presence of TFE and LPC. The interactions peptide/mimetic of membranes indicated that all strongly interacted with micelles, but not with vesicles, with the exception of "wild type" peptide, that showed strong interaction with the both models. The biological results demonstrated that all peptides have activity (antibacterial and antifungal), nevertheless, the "wild type" showed lower MIC values. In addition, our findings suggest that peptides Hy-D-V<sup>16</sup>, Hy-D-V<sup>5,16</sup> and Hy-K<sup>9</sup> as potential templates for the development of new drugs, therefore these analogues have the higher relationship antimicrobial/hemolytic activity. These findings highlight the importance of single  $\alpha$ -amino acid modification as a tool to modulate the activity of AMPs, but do not show one direct correlations with interactions data or structural studies, showing that the mechanism of action of these peptides is not a closed topic.

**Key words:** *Hypsiboas albopunctatus*; peptide synthesis on solid phase; fluorescence, peptide structure.

## Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando as estratégias Boc/Bzl e Fmoc/tBu. ....	24
Figura 2: Diferentes modelos propostos na literatura para descrever a permeabilização da membrana: (A) Barrel-stave (barril sem fundo). (B) Modelo Carpete. (C) Modelo Toroidal. ....	27
Figura 3: <i>Hypsiboas albopunctatus</i> .....	29
Figura 4: Similaridade entre o peptídeo da rã <i>Hypsiboas albopunctatus</i> e outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura, como o Ceratotoxin.....	33
Figura 6: Fórmula da interpretação de ESI.....	35
Figura 7: Diagrama de Jablonski.....	38
Figura 8: Dodecil sulfato de sódio (SDS).....	40
Figura 9: Zwitteriônico, 1-palmitoil-2- hidroxil-3-fosfolina (LPC).....	40
Figura 10: Bicamada plana de uma membrana celular à esquerda, e uma vesícula à direita. (NELSON, 2006).....	41
Figura 11: Representação esquemática dos vários tipos de vesículas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV- vesículas multilamelares, SUV- vesículas unilamelares pequenas, LUV- vesículas unilamelares grandes (SANTOS, 2002). ....	42
Figura 12: Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs). ....	45
Figura 13: Ilustração esquemática do fenômeno de Dicroísmo circular (REYES, 2005). ...	47
Figura 14: Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A) $\alpha$ -hélice, (B) folha $\beta$ -pregueada e (C) estrutura randômica (GREENFIELD; FASMAN, 1969). ....	48
Figura 15: Diagrama circular helicoidal (“ <i>helical wheel</i> ”) prevista para o peptídeo “ <i>wild type</i> ” proposto pelo programa <i>Predict Protein Server</i> . ....	50
Figura 16: Perfil cromatográfico do Hy-Wt bruto e puro.....	52
Figura 17: Perfil cromatográfico do Hy-D-V <sup>5,16</sup> bruto e puro. ....	52
Figura 18: Perfil cromatográfico do Hy-D-V <sup>16</sup> bruto e puro .....	53
Figura 19: Perfil cromatográfico do Hy- K <sup>9</sup> bruto e puro .....	53
Figura 20: Espectro de massas do peptídeo puro: Hy-Wt .....	56
Figura 21: Espectro de massas do peptídeo puro: Hy-K <sup>9</sup> .....	56
Figura 22: Valores de CIM e CFM para a levedura de <i>Candida albicans</i> .....	60
Figura 23: Valores de CIM e CFM para levedura de <i>Candida krusei</i> .....	60
Figura 24: Valores de CIM e CFM para a levedura de <i>Candida parapsilosis</i> .....	61
Figura 25: Valores de CIM e CFM para levedura de <i>Cryptococcus neoformans</i> .....	61
Figura 26: Espectros de fluorescência do Hy-Wt em diferentes concentrações de LPC.....	64
Figura 27: Espectros de fluorescência do Hy- D-V <sup>5,16</sup> em diferentes concentrações de LPC .....	64
Figura 28: Espectros de fluorescência do Hy-D-V <sup>16</sup> em diferentes concentrações de LPC .....	65
Figura 29: Espectros de fluorescência do Hy-K <sup>9</sup> em diferentes concentrações de LPC .....	65
Figura 30: Gráfico da variação da intensidade de fluorescência em função da [LPC] para todos os peptídeos.....	65

Figura 31: Gráfico da variação de $\lambda_{\max}$ de emissão em função da [LPC] para todos os peptídeos.....	66
Figura 32: Espectros de fluorescência do Hy-Wt em diferentes concentrações de SDS.....	66
Figura 33: Espectros de fluorescência do Hy-D-V <sup>5,16</sup> em diferentes concentrações de SDS.....	66
Figura 34: Espectros de fluorescência do Hy-D-V <sup>16</sup> em diferentes concentrações de SDS.....	67
Figura 35: Espectros de fluorescência do Hy-K <sup>9</sup> em diferentes concentrações de SDS.....	67
Figura 36: Gráfico da variação da Intensidade de fluorescência em função da [SDS] para todos os peptídeos.....	67
Figura 37: Gráfico da variação de $\lambda_{\max}$ de emissão em função da [SDS] para todos os peptídeos.....	68
Figura 38: Espectros de fluorescência do Hy-Wt em solução com diferentes concentrações de acrilamida em pH 7,4.....	69
Figura 39: Espectros de fluorescência do Hy-D-V <sup>5,16</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida em pH 7,4.....	69
Figura 40: Espectros de fluorescência do Hy-D-V <sup>16</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida em pH 7,4.....	70
Figura 41: Espectros de fluorescência do Hy-K <sup>9</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida em pH 7,4.....	70
Figura 42: Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V <sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V <sup>16</sup> (▲) e Hy-K <sup>9</sup> (▼) em solução aquosa pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.....	71
Figura 43: Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V <sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V <sup>16</sup> (▲) e Hy-K <sup>9</sup> (▼) em LPC - pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.....	71
Figura 44: Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V <sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V <sup>16</sup> (▲) e Hy-K <sup>9</sup> (▼) em SDS - pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.....	72
Figura 45: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-Wt obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC em pH 7,4.....	74
Figura 46: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V <sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC em pH 7,4.....	74
Figura 47: Espectros de Fluorescência em Hy-D-V <sup>16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC em pH 7,4.....	74
Figura 48: Espectros de Fluorescência em Hy-K <sup>9</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC em pH 7,4.....	74
Figura 49: Gráfico da variação da intensidade de Fluorescência em função da [PE:PA:PC] de todos os peptídeos.....	75
Figura 50: Gráfico da variação de $\lambda_{\max}$ em função da [PE:PA:PC] para todos os peptídeos.....	75
Figura 51: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-Wt obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC em pH 7,4.....	76
Figura 52: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V <sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC em pH 7,4.....	76
Figura 53: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V <sup>16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC em pH 7,4.....	77

Figura 54: Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-K <sup>9</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC em pH 7,4.....	77
Figura 55: Gráfico da variação da Intensidade de Fluorescência em função da [SM:PA:PC] de todos os peptídeos.....	77
Figura 56: Gráfico da variação do $\lambda_{max}$ em função da [SM:PA:PC] de todos os peptídeos.....	78
Figura 57: Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V <sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V <sup>16</sup> (▲) e Hy-K <sup>9</sup> (▼) em função dos vesículas [PE:PA:PC] em pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. ....	79
Figura 58: Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V <sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V <sup>16</sup> (▲) e Hy-K <sup>9</sup> (▼) em função dos vesículas [SM:PA:PC] em pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida. ....	80
Figura 59: Liberação da carboxifluoresceína em vesícula de PE:PA:PC para 2 $\mu$ M de peptídeo em função do tempo.....	81
Figura 60: Liberação da carboxifluoresceína em vesículas de SM:PA:PC para 2 $\mu$ M de peptídeos em função do tempo. ....	82
Figura 61: Espectro de CD dos peptídeos em solução aquosa pH 7,4. ....	83
Figura 62: Espectro de CD dos peptídeos em TFE pH 7,4 ....	84
Figura 63: Espectro de CD dos peptídeos em LPC pH 7,4. ....	85

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores das massa e dos graus de pureza do peptídeo bruto e das frações do “ <i>wild type</i> ”, Hy-D-V <sup>5,16</sup> , Hy-D-V <sup>16</sup> e Hy-K <sup>9</sup> . .....	51
Tabela 2: Tempo de retenção (T <sub>R</sub> ) e variação em comparação com “ <i>wild type</i> ”. .....	54
Tabela 3: Análise de aminoácidos dos peptídeos sintetizados. ....	55
Tabela 4: Valores da atividade antimicrobiana para os peptídeos sintetizados.....	58
Tabela 5: Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de <i>Stern-Volmer</i> (K <sub>sv</sub> ) nos detergentes LPC e SDS e em solução. ....	70
Tabela 6: Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de <i>Stern-Volmer</i> (K <sub>sv</sub> ) das vesículas (PE:PA:PC), (SM: PA:PC) e em solução. ....	79

## Lista de Quadros

Quadro 1: Peptídeos “ <i>wild type</i> ” e análogos com suas substituições em destaque.....	30
Quadro 2: Lipídeos utilizados na preparação das vesículas, com sua estrutura e carga .....	44
Quadro 3: Estrutura primária dos peptídeos e suas projeções.....	49
Quadro 4: Estrutura primária e as respectivas substituições em vermelho nos análogos.....	50

## Abreviaturas e Siglas

### 1. Aminoácidos

**Ala (A)** Alanina

**Arg (R)** Arginina

**Asn (N)** Asparagina

**Asp (D)** Ácido aspártico

**Cys (C)** Cisteína

**Gln (Q)** Glutamina

**Glu (E)** Ácido Glutâmico

**Gly (G)** Glicina

**His (H)** Histidina

**Ile (I)** Isoleucina

**Leu (L)** Leucina

**Lys (K)** Lisina

**Met (M)** Metionina

**Phe (F)** Fenilalanina

**Pro (P)** Prolina

**Ser (S)** Serina

**Thr (T)** Treonina

**Trp (W)** Triptofano

**Tyr (Y)** Tirosina

**Val (V)** Valina

## 2. Outras

**Boc**-terc-butoxicarbonila

**CD**-Dicroísmo Circular

**CF**- Carboxifluoresceína

**CFM**-Concentração fungicida mínima

**CIM**-Concentração inibitória mínima

**CMC**-Concentração Micelar Crítica.

**DCM**-Diclorometano

**DIC**- Diisopropilcarbodiimida

**DIEA**- N-diisopropiletilamina

**DMF**- dimetilformamida

**DMSO**- Dimetilsulfóxido

**DO**- Densidade óptica

**DPPA**-1,2- Dipalmitoil-*sn*-Glicerol-3- Fosfato

**DPPC**-1,2- Dipalmitoil-*sn*- Glicerol-3-  
Fosfocolina

**DPPE**-1,2- Dipalmitoil-*sn*- Glicerol-3-  
Fosfoetanolamina

**EDT**- Etanoditiol

**Fmoc**- Fluorenilmetiloxiacarboxila

**GBTU**-*O*-(Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-  
tetrametilurônico

**HC<sub>50</sub>**- Concentração do peptídeo que causou 50%  
de hemólise

**HF**- Fluoreto de hidrogênio

**HOBt**- N-Hidroxibenzotriazol

**HPLC**- Cromatografia líquida de alta  
performance (do inglês High Performance Liquid  
Chromatography)

**kDa**- Quilodalton

**K<sub>sv</sub>**- Constante de Stern- Volmer

**LB**- Meio Luria -Bertane

**LPC**-Lisofosfatidilcolina

**LUVs**- Vesículas unilamelares grandes

*m/z*- razão massa/carga

**MLVs**- Vesículas multilamelares grandes

**mM**- Milimolar

**nm**- Nanômetros

**NMP**- *N*- metilpirrolidona

**PAMs**- Peptídeos antimicrobianos

**SDS**- Dodecil- sulfato de sódio

**SM**- Esfingomielina

**SUVs**- Vesículas unilamelares pequenas

**TFA**- Ácido trifluoracético

**TFE**- Trifluoroetanol

**UFC**- Unidade Formadora de Colônia

**UV-Vis**- Ultravioleta visível

# Sumário

1. Introdução .....	20
1.1. Sínteses de peptídeos .....	22
1.2. Peptídeos antimicrobianos.....	25
1.3. Interação com membranas.....	26
1.4. Peptídeo selvagem " <i>wild type</i> ".....	28
2. Objetivos .....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Obtenção dos peptídeos.....	31
3.2. Purificação dos peptídeos.....	33
3.3. Análise de aminoácidos .....	34
3.4. Espectrometria de massas.....	35
3.5. Atividade biológica .....	35
3.5.1. Atividade antibacterinana.....	36
3.5.2. Atividade antifúngica .....	36
3.5.3. Atividade hemolítica .....	37
3.6. Fluorescência e UV .....	38
3.6.1. Estudos de interação peptídeos/micelas .....	39
3.6.1.2. Supressão por acrilamida.....	40
3.6.2. Estudos de interação peptídeos/vesículas.....	41
3.6.2.1. Preparação das vesículas .....	42
3.6.2.2. Supressão por acrilamida.....	46
3.6.2.3. Estudos de permeabilização .....	45
3.7. Análise estrutural dos peptídeos.....	46
3.7.1. Dicroísmo circular .....	46
4. Resultados e Discussão .....	48
4.1. Desenho racional dos análogos do peptídeo Hy-Wt.....	48
4.2. Síntese e caracterização dos peptídeos .....	50
4.2.1. Caracterização dos peptídeos .....	54
4.2.1.1. Análise de aminoácidos.....	54
4.2.1.2. Espectrometria de massas.....	55
4.3. Atividade biológica .....	56
4.3.1. Atividade antibacteriana.....	57
4.3.2. Atividade antifúngica .....	58
4.3.3. Atividade hemolítica .....	62
4.4. Fluorescência e UV .....	62
4.4.1. Estudos em micelas .....	63
4.4.1.1. Micelas de LPC .....	63
4.4.1.2. Micelas de SDS .....	64
4.4.2. Estudos de supressão de fluorescência.....	68
4.4.3. Estudos em vesículas.....	72
4.4.3.1. Interação peptídeo/ vesículas.....	73
4.4.3.1.1. Vesículas contendo PE .....	73

4.4.3.1.2. Vesículas contendo SM .....	76
4.4.4. Estudos de supressão de fluorescência.....	78
4.4.5. Permeabilização peptídeo/ vesícula.....	80
4.4.5.1. Vesículas contendo PE .....	81
4.4.5.2. Vesículas contendo SM .....	82
4.5. Dicroísmo circular .....	83
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>85</b>
<b>Referências .....</b>	<b>88</b>

## 1. Introdução

A variedade de substâncias antimicrobianas provenientes da fauna e flora brasileira é valiosíssima, uma vez que a própria evolução tratou de selecioná-las para atuar contra diversas infecções. Esses compostos, moldados pela natureza durante milhões de anos de evolução são verdadeiros tesouros prontos para serem explorados (MOTTA, 2008).

A descoberta destas substâncias era realizada até pouco tempo atrás praticamente por meio de abordagens empíricas, extraindo-as diretamente das fontes naturais. Desta forma, a partir da década de 50, vários peptídeos ativos foram descobertos e tiveram suas estruturas químicas determinadas. Esta nova classe de compostos necessitou de novas metodologias para seu isolamento, purificação, análise, identificação e quantificação, as quais passaram a ser sistematicamente estudadas e aprimoradas (MACHADO et al., 2004). Concomitantemente, viu-se a necessidade de sintetizar essas moléculas, visando os estudos farmacológicos, bioquímicos, físicos e fisiológicos. Os peptídeos sintéticos também servem como provas inequívocas das identidades químicas e dos papéis biológicos dos peptídeos naturais (MACHADO et al., 2004).

Atualmente, os peptídeos sintéticos usados para fins terapêuticos movimentam 13 bilhões de dólares em um mercado que cresce 10% ao ano (MACHADO et al., 2004). As aplicações terapêuticas dos peptídeos bioativos (ANDREU et al., 1998) incluem o tratamento de infecções bacterianas (mangainina), fúngicas (dermaseptina), incluindo o tratamento do câncer (aureina) (PRATES et al., 2004). Os peptídeos possuem a vantagem de apresentar baixa, ou nenhuma, toxicidade para células animais, tornando-se assim, excelentes candidatos a serem empregados como drogas alternativas aos atuais antibióticos (HANCOCK et al., 1999; HANCOCK et al., 2000). A maioria dos peptídeos antimicrobianos atua na membrana celular das bactérias matando-as rapidamente, enquanto grande parte dos antibióticos convencionais atua no interior das células no processo de tradução protéica e nas etapas de replicação e transcrição.

A resistência de microrganismos patogênicos aos PAMs é bastante reduzida, pois os microrganismos necessitariam reestruturar completamente a membrana plasmática para impedir a ação destas moléculas. Por outro lado, os antibióticos tradicionais como, penicilina, tetraciclina e vancomicina, tornaram se menos eficazes, pois a maioria dos

microrganismos apresentam resistência a estes compostos após algumas décadas de uso. Atento a isto vem ocorrendo o estímulo a pesquisa de novos agentes antimicrobianos que possuam um amplo espectro de atividade e múltiplas aplicabilidades.

Os peptídeos antimicrobianos executam um papel importante na imunidade inata contra microrganismos e outros patógenos (DOURADO et al., 2007). Em vista disto, muitos peptídeos antimicrobianos podem ser encontrados em diferentes locais, como a hemolinfa de insetos (ceprocrinas e melitina), secreções da pele, mucosa gástrica ou epitélio intestinal de anfíbios (mangaininas e dermaseptinas), apresentando um amplo espectro de atividade contra uma variedade de microrganismos e favorecendo a sua sobrevivência.

Em trabalhos relativamente recentes uma nova fonte de peptídeos antimicrobianos foi descoberta, a secreção da pele de anfíbios (APPONYI, 2004; BARRA, 1995; BOWIE et al., 1999; CASTRO, 2005). Estes organismos, por habitarem ambientes úmidos, locais potencialmente convenientes ao crescimento fúngico e bacteriano, entram em contato com grande quantidade de microrganismos patogênicos. Atento a isto, parte de um sistema de defesa químico, constituído de um arsenal de toxinas secretadas pelas glândulas granulosas na superfície da pele, atua contra estes patógenos.

Embora os peptídeos da secreção cutânea dos anfíbios venham sendo alvo de pesquisas há 20 anos, a maioria das famílias de anuros ainda não teve seus peptídeos estudados. Atualmente existem nos bancos de dados da Uniprot, 923 registros de peptídeos de pele ou de secreção cutânea de anfíbios anuros, sendo que 94% desses registros são referentes a apenas três famílias: Bombinatoridae (8%), Hylidae (21%) e Ranidae (65%). Disponível no site: <http://www.uniprot.org/>

Em vista disto, o estudo de peptídeos antimicrobianos (PAMs) extraídos de rãs pode ser uma fonte importante para o desenvolvimento de uma nova família de drogas antimicrobianas.

Infelizmente, a procura de novos agentes com diferentes atividades, entre elas a atividade antimicrobiana, poderá ter seus dias contados, pois em alguns ecossistemas está ocorrendo o rápido desaparecimento de algumas espécies, principalmente devido a ações humanas.

## 1.1. Sínteses de peptídeos

A metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), de Bruce Merrifield, é baseada no crescimento da cadeia peptídica aminoácido por aminoácido, a partir de sua região carboxi-terminal que se encontra ligada covalentemente ao suporte polimérico (resina) (ALBERICIO, 2000; MERRIFIELD, 1963). Desta forma, a construção do peptídeo é baseada no crescimento da cadeia peptídica no sentido do aminoácido Carboxi-terminal para o aminoácido N-terminal, contrário ao que ocorre no processo de síntese de peptídeos pelos ribossomos.

Os polímeros utilizados na SPFS devem ser insolúveis nos solventes utilizados e inertes nas condições de síntese. Polímeros compostos de poliestireno (apolar) apresentam um alto grau de solvatação em solventes apolares, fator fundamental para permitir a entrada de reagentes através dos poros existentes nas partículas e tornar acessíveis os seus sítios ativos. Na SPFS, o grupo carboxila do último aminoácido da cadeia (primeiro da síntese) é ligado ao suporte polimérico insolúvel através de uma ligação éster para gerar peptídeos carboxila-livre ou uma ligação amida para produzir peptídeos carboxi-amida, seguindo-se os acoplamentos sucessivos dos demais aminoácidos das seqüências.

A formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos é um processo complexo, devido à natureza polifuncional dos aminoácidos. Durante a síntese, todos os grupos funcionais podem sofrer reações, necessitando realizar a proteção específica daqueles que não devem reagir. Dentre os vinte aminoácidos naturais, somente sete apresentam cadeias laterais que não necessitam de qualquer proteção (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro) e treze que necessitam de protetores (Arg, Tyr, Ser, Thr, His, Gln, Asn, Met, Trp, Asp, Glu, Lys e Cys) durante a síntese.

Em relação à proteção do grupamento  $\alpha$ -amino, a metodologia de SPFS pode ser dividida em duas diferentes estratégias: a química Boc e a química Fmoc. Na estratégia Boc (terc- butoxicarbonila), o grupo  $\alpha$ -amino do aminoácido é protegido temporariamente pelo grupo ácido lábil Boc, e as cadeias laterais são protegidas pelos grupamentos benzila e hexila, entre outros. A cada acoplamento, o grupo Boc é removido do grupo  $\alpha$ -amino do aminoácido ligado à resina, pela ação do ácido trifluoroacético (TFA), que após a neutralização (normalmente com DIEA 5% em DCM) fica livre para o acoplamento do

aminoácido seguinte. Para clivar o peptídeo da resina e os protetores dos aminoácidos trifuncionais é utilizado o fluoreto de hidrogênio (HF) e supressores de reação colateral (JUBILUT et al., 2001). Supressores de reação colateral são reagentes que reagem com os grupos protetores das cadeias laterais funcionais removidos dos aminoácidos durante a clivagem, impedindo qualquer outra reação.

Na segunda estratégia, a região N-terminal do aminoácido é protegida temporariamente pelo grupo base lábil Fmoc, e a cadeia lateral, se reativa, por grupos estáveis à base empregada, e lábeis ao TFA (ácido). Entre estes protetores mais utilizados podemos citar os grupos *tert*-butiloxicarbonila, tritila e *tert*-butila. Esta estratégia envolve condições químicas mais suaves, sendo que o grupo Fmoc é removido por aminas secundárias como a piperidina (20% em DMF), e a clivagem final entre o peptídeo e a resina se faz pela reação com TFA (figura 1).

Em ambas as estratégias, durante o acoplamento, os grupos carboxila livre dos aminoácidos que serão acoplados são ativados com agentes acilantes, tais como: diisopropilcarbodiimida (DIC) e hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônico (HBTU), para acelerar a reação. O princípio fundamental da maioria dos métodos de acoplamento é a ativação do grupo carboxila que participa da formação da ligação amida ou peptídica. Na ativação, o átomo de carbono tem sua eletrofilicidade aumentada por substituintes eletroceptores ligados diretamente a ele, facilitando o ataque do grupo amino (do aminoácido ligado à resina) que é nucleofílico.

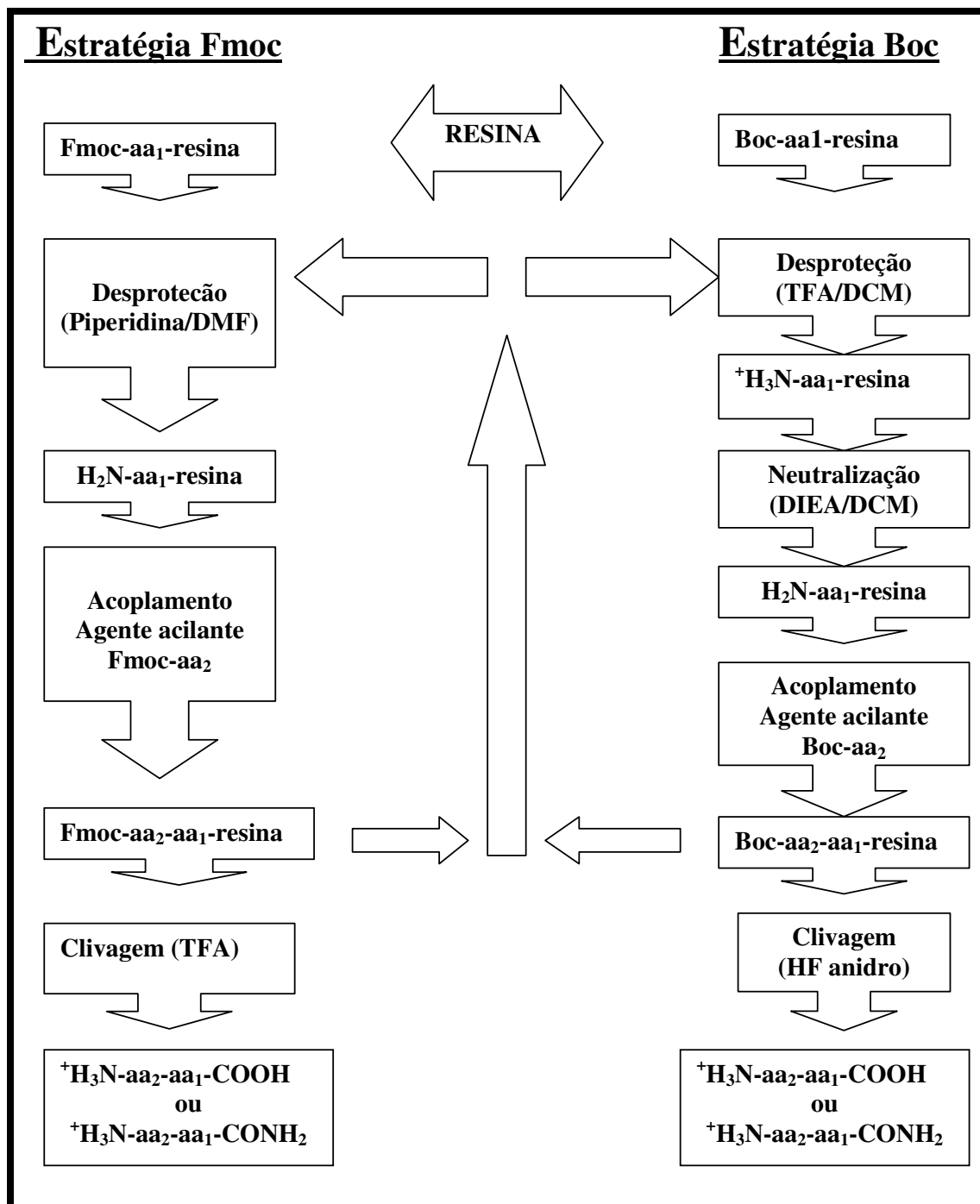


Figura 1: Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando as estratégias Boc/Bzl e Fmoc/tBu.

## 1.2. Peptídeos antimicrobianos

Esses peptídeos são ativos em doses micromolares contra uma variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, agindo por meio da permeabilização das membranas destes microrganismos, interferindo na estabilidade celular e causando sua morte.

De acordo com sua estrutura primária, a maioria do PAMs é composta por moléculas pequenas de até 5 kDa, possuindo de 8 a 50 resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A composição destas moléculas mostra uma grande quantidade de resíduos básicos de Arg e/ou Lys, que apresentam natureza catiônica, e cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos (ANDREU et al., 1998; MALOY et al., 1995). A conformação mais comum encontrada para estas moléculas é uma  $\alpha$ -hélice anfipática (OREN; SHAI, 2000), que dispõem as cadeias laterais dos aminoácidos polares em um mesmo lado e as cadeias laterais apolares do lado oposto, propiciando a interação entre peptídeos e membranas biológicas. Entre os peptídeos de defesa dos anfíbios é freqüente a ocorrência de amidação do C-terminal por modificação pós-traducional, conferindo a molécula maior carga positiva e estabilidade frente a enzimas proteolíticas.

Estas características estruturais estão relacionadas diretamente com o modo de ação dos PAMs, que apesar de diversificado, apresenta como principal mecanismo à ligação à membrana do patógeno aumentando sua permeabilidade (SHAI, 1995; CASTRO et al., 2005; TOKE, 2005) e causando a desestruturação da bicamada lipídica. Outros, porém, se ligam a um receptor específico, levando à perda de sua função.

A carga líquida de muitos peptídeos antimicrobianos é igual ou acima de +2, favorecendo a interação com membranas bacterianas que apresentam fosfolipídios carregados negativamente. Desta forma, o aumento da carga positiva do peptídeo aumenta a atividade antimicrobiana, sendo que o aumento exacerbado de cargas positivas pode ocasionar diminuição da atividade, pela desestabilização do poro devido ao aumento da repulsão entre os monômeros peptídicos (SHAI, 1999).

Estudos recentes também têm demonstrado que a introdução de um resíduo carregado na face hidrofóbica da  $\alpha$ -hélice formada pelos peptídeos antimicrobianos, aumenta a sua atividade antimicrobiana diminuindo a atividade hemolítica,

uma das condições ideais para o desenvolvimento de um novo fármaco (CHEN et al., 2005). Esta melhoria é atribuída aos diferentes mecanismos envolvidos na interação dos peptídeos com as membranas eucarióticas e procarióticas.

### 1.3. Interação com membranas

Como a membrana é o alvo primário para a maioria dos PAM, as diferenças existentes entre células eucarióticas e procarióticas podem propiciar o desenvolvimento de alvos específicos para estas moléculas. Existem três componentes principais que distinguem a membrana bacteriana e a membrana dos eritrócitos: 1) A composição lipídica, enquanto os eritrócitos contêm em sua maioria fosfolipídios dipolares (zwitteriônico) na face externa, as células bacterianas por sua vez, apresentam uma maior quantidade de fosfolipídios negativos nas duas monocamadas lipídicas. Por força da presença desta maior carga negativa nas células procarióticas, está apresentada maior interação com os peptídeos antimicrobianos catiônicos. Membranas eucarióticas possuem uma maior quantidade de esfingomielina (SM) em sua monocamada lipídica externa, enquanto o lipídeo fosfatidiletanolamina (DPPE) é o principal componente da face externa de membranas procarióticas; 2) a ausência de colesterol em membranas celulares bacterianas, que torna a membrana mais flexível e facilita a formação dos poros; 3) o maior potencial transmembranar das células bacterianas em relação aos eritrócitos (TOKE, 2005).

O primeiro passo do mecanismo de ação dos peptídeos é a interação eletrostática entre os peptídeos catiônicos e os componentes aniônicos da membrana bacteriana. No passo seguinte, os peptídeos se agregam à membrana por interação hidrofóbica, forçando a reorganização da bicamada fosfolipídica, induzindo a formação de poros. Os poros formados aumentam a permeabilidade da bicamada causando a destruição da membrana.

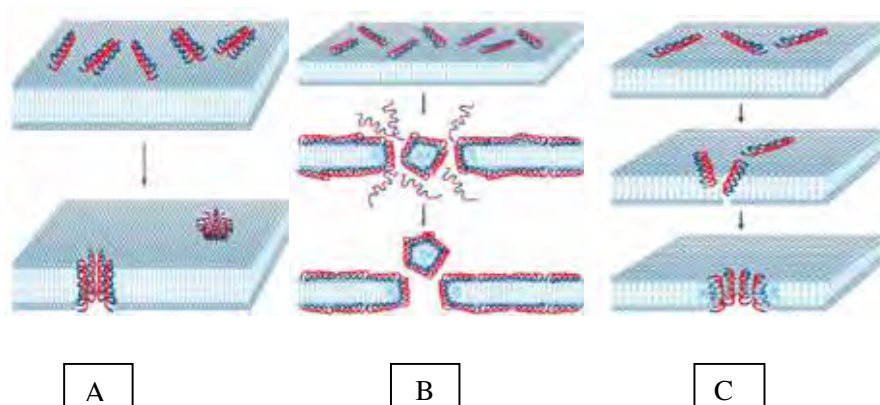
Chen et. al., (2005), sugeriram que, em células eucarióticas, o modelo utilizado para a formação dos poros é o de “*barrel- stave*”, proposto inicialmente para o peptídeo alameticina do fungo *Trichoderma viride*. No modelo “*barrel- stave*”,  $\alpha$ -hélices anfipáticas monoméricas inserem-se já na etapa inicial no interior da bicamada lipídica (hidrofóbica), interagindo posteriormente e formando poros transmembranais (figura 2A).

De outra maneira, em células procarióticas o modelo aplicado seria o de “carpete”, proposto para o peptídeo melitina, extraído da peçonha da abelha *Apis mellifera*, no qual os peptídeos interagem com as cabeças polares dos lipídeos (superfície da membrana) durante o processo de permeação, não se inserindo completamente na bicamada hidrofóbica, figura 2B (SHAI, 1999).

Um terceiro mecanismo descrito é da formação do poro toroidal, proposto para o peptídeo mangainina, extraído do anfíbio *Xenopus laevis* (LUDTKE et al., 1996; MATSUZAKI et al., 1996). De acordo com esse mecanismo, os peptídeos permanecem fortemente ligados aos lipídios, induzindo o rearranjo destas moléculas e a formação de poro (figura 2C), que contém além dos peptídeos uma parte composta de lipídios da própria membrana.

Nos três mecanismos descritos, um ponto é comum a todos, a necessidade de formação de  $\alpha$ -hélice pelos peptídeos, permitindo a sua inserção nas membranas. Este fato pode ser confirmado por trabalhos que descrevem que peptídeos sintéticos contendo somente D-aminoácidos, apresentam atividade semelhante à mesma seqüência possuindo somente L-peptídeos (SHAI, 1999).

Somado ao experimento abaixo, pequenos peptídeos lineares e cíclicos com diferentes concentrações de D e L aminoácidos também foram gerados com vários graus de seletividade e atividade antimicrobiana (OREN, 2000). A incorporação de D-aminoácidos em um determinado peptídeo nativo resultou na perda de sua atividade citotóxica, mantendo suas propriedades antibacterianas (PAPO, 2002).



**Figura 2:** Diferentes modelos propostos na literatura para descrever a permeabilização da membrana: (A) *Barrel-stave* (barril sem fundo). (B) Modelo Carpete. (C) Modelo Toroidal.

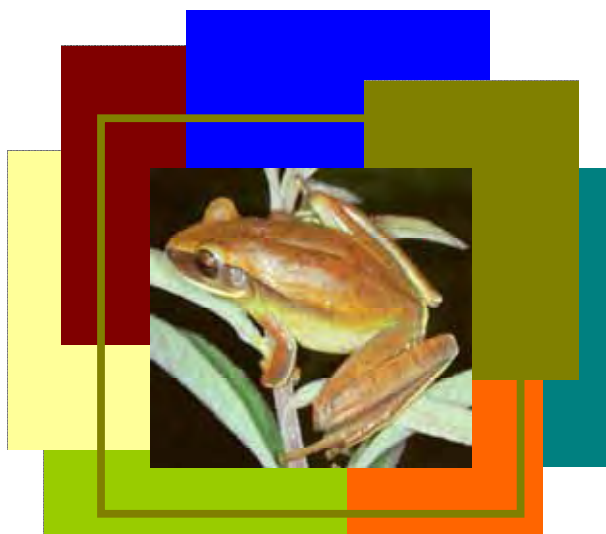
Deste modo, a interação dos peptídeos com membranas e o conhecimento do seu modo de ação são de grande interesse, pois a elucidação destes permite contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos. Nos estudos de interação peptídeos/membrana os modelos de biomembranas mais utilizados são as vesículas e as micelas.

#### 1.4. Peptídeo selvagem “*Wild type*”

O Grupo de Pesquisa em Toxicologia da Universidade de Brasília-UNB, coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana S. Castro, com quem realizamos cooperação, tem trabalhado com princípios ativos de origem animal, particularmente da secreção cutânea de anuros. Entre os peptídeos isolados, citamos um inédito na literatura proveniente da rã *Hypsiboas albopunctatus* (figura 3- conhecida também como perereca-carneirinho). Este anfíbio possui aproximadamente 55 mm e pertence à biota do cerrado. Este novo peptídeo denominado por nós de “*wild type*” (peptídeo selvagem), apresenta uma cadeia polipeptídica de 21 resíduos de aminoácidos com a seqüência: Gly-Trp-Leu-Asp-Val-Ala-Lys-Lys-Ile-Gly-Lys-Ala-Ala-Phe-Asn-Val-Ala-Lys-Asn-Phe-(Ile/Leu)-CONH<sub>2</sub>.

A amidação do C- terminal é um processo pós-tradução requerida para a atividade biológica de peptídeos bioativos, incluindo peptídeos antimicrobianos isolados de vários gêneros de anuros. A presença de uma amidação no C-terminal contribui com as várias cargas positivas exibidas por esse peptídeo e provavelmente tem um efeito direto na sua atividade biológica, aumentando os efeitos citolíticos (CASTRO et al., 2009) ou ainda reduzir a repulsão eletrostática entre o C-terminal do peptídeo e o grupo fosfodiéster dos fosfolipídios de membrana (DOURADO et al., 2007).

A análise da seqüência do peptídeo da rã *Hypsiboas albopunctatus* revela uma baixa similaridade com outras seqüências já descritas de peptídeos antimicrobianos de anuros, no entanto, apresenta similaridade com peptídeos antimicrobianos extraídos da glândula do aparelho reprodutor feminino da mosca *Ceratitis capitata*. A porcentagem de identidade encontrada na comparação com os peptídeos ceratotoxina B, B1 e B2 foi de 78%. Todas as ceratotoxinas apresentaram semelhança em 11 posições coincidentes com o “*wild type*”, principalmente na região contendo os resíduos carregados positivamente (figura 4).



**Figura 3:** *Hypsiboas albopunctatus*

[http://amphibiaweb.org/cgi/amphib\\_query?query\\_src=aw\\_lists\\_soundInclude\\_&where-genus=Hypsiboas&where-species=albopunctatus](http://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?query_src=aw_lists_soundInclude_&where-genus=Hypsiboas&where-species=albopunctatus)

Peptídeo	Seqüência	n° aa	Identificação (%)
“Wild type”	GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI	--21	100
Ceratotoxin B-	VAKKIGKAALPIAK	--29	78
Ceratotoxin B1	VAKKIGKAALPIAK	--61	78
Ceratotoxin B2	VAKKIGKAALPIAK	--61	78

**Figura 4:** Similaridade entre o peptídeo da rã *Hypsiboas albopunctatus* e outros peptídeos antimicrobianos já descritos na literatura, como o Ceratotoxin. Os resíduos idênticos são destacados em cinza. A similaridade e as seqüências dos aminoácidos de Ceratotoxin foram obtidas do sítio <http://ca.expasy.org/tools/blast/>

## 2. Objetivos

Devido à parceria dos grupos de pesquisa da UNB e UNESP, iniciamos um estudo mais detalhado da sua estrutura e função, bem como seu modo de ação.

Desta forma, o objetivo deste projeto foi substituir alguns aminoácidos na sequência do peptídeo “*wild type*” (peptídeo selvagem), visando aumentar a sua atividade antimicrobiana e diminuir a sua capacidade hemolítica. A busca de um peptídeo que apresente uma baixa atividade hemolítica e mantém a sua atividade antimicrobiana pode ser a chave para a criação de um novo fármaco.

As modificações propostas estão colocadas no Quadro 1.

NOME	SEQUÊNCIA
Hy-Wt	GWLDVAKKIGKAAFNVAKNFI-CONH <sub>2</sub>
Hy-D-V <sup>5,16</sup>	GWLD(D-V)AKKIGKAAFN(D-V)AKNFI-CONH <sub>2</sub>
Hy-D-V <sup>16</sup>	GWLDVAKKIGKAAFN(D-V)AKNFI-CONH <sub>2</sub>
Hy-K <sup>9</sup>	GWLDVAKKKGKAAFNVAKNFI-CONH <sub>2</sub>

**Quadro 1:** Peptídeos “*wild type*” e análogos com suas substituições em destaque.

O peptídeo Hy-D-V<sup>16</sup> contém uma L-valina na posição 16, no centro da face apolar da  $\alpha$ -hélice, substituída por seu isômero “D”. O Hy-D-V<sup>5,16</sup> possui, além desta alteração, a substituição de outra D-V na posição 5, e o Hy-K<sup>9</sup> possui na posição 9 uma lisina substituindo uma Ile. As substituições realizadas na face apolar do peptídeo visam a quebra da  $\alpha$ -hélice anfipática, e uma diminuição da anfipaticidade e da hemólise.

Para se atingir o objetivo principal foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- 1) Síntese, purificação e caracterização do peptídeo nativo da rã *Hypsiboas albopunctatus*, denominado de “*wild type*”;
- 2) Síntese, purificação e caracterização de 2 análogos do peptídeo “*wild type*”, contendo uma e duas D-V substituindo seu isômero “L”, e 1 contendo uma lisina na face apolar do peptídeo;
- 3) Avaliação das atividades antifúngicas;
- 4) Avaliação das atividades antibacterianas;

- 5) Avaliação das atividades hemolíticas;
- 6) Estudos de interação com micelas de SDS e LPC;
- 7) Estudos de interação com vesículas de diferentes composições para verificar a influência de diferentes lipídeos;
- 8) Estudos de permeabilização na presença de vesículas de diferentes composições;
- 9) Estudos das mudanças conformacionais no “*wild type*” e seus análogos, na presença de trifluoroetanol (TFE) e LPC através do CD.

### 3. Materiais e Métodos

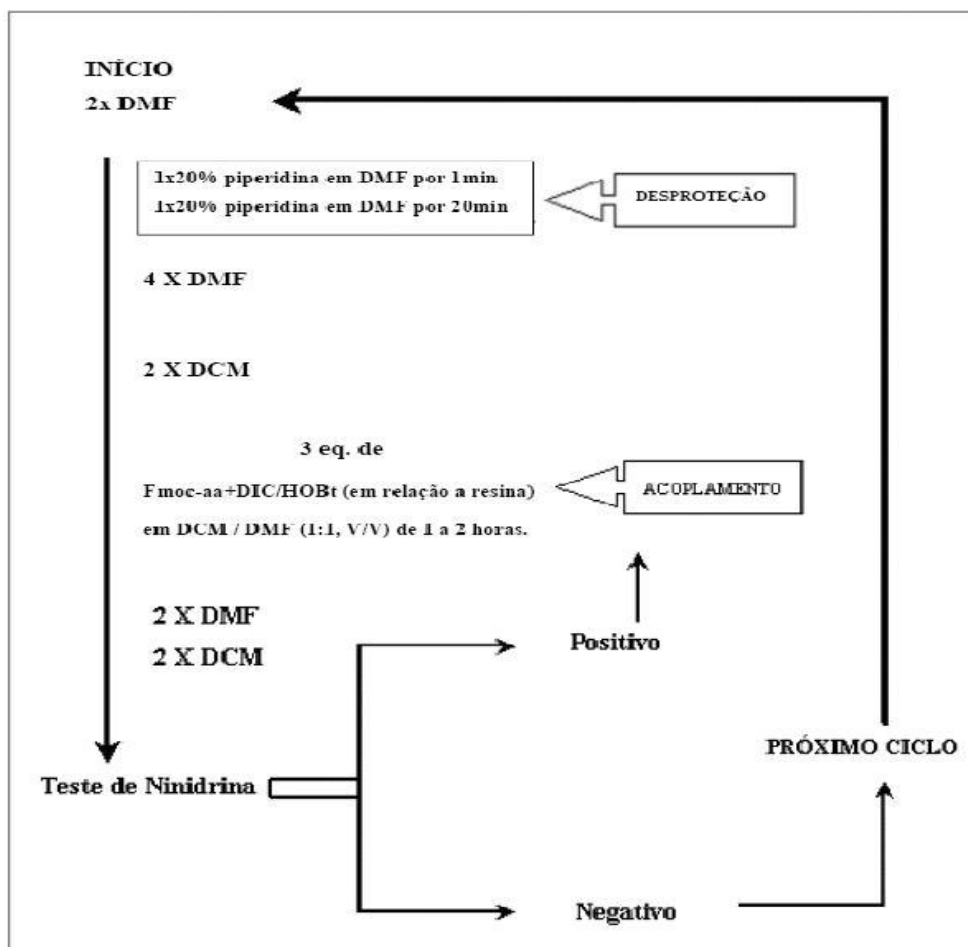
#### 3.1. Obtenção dos peptídeos

Os peptídeos utilizados neste estudo foram obtidos manualmente pelo método de SPFS através da estratégia Fmoc (FIELDS, 1990). O protocolo de síntese química consiste de passos cíclicos de desproteção e do acoplamento, intercalados por lavagens, para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante com DIC/HOBt, durante duas horas de agitação utilizando como solvente uma mistura com aproximadamente 20% de DMF (dimetilformamida) em DCM (diclorometano). Nesta etapa foi usado um excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número de sítios reativos existentes na resina. A desproteção do grupo amino após acoplamento, ou seja, a retirada do grupo Fmoc base-lábil foi realizada por meio da reação com uma solução 20% piperidina/DMF durante 20 minutos. Entre cada passo foram efetuadas lavagens subsequentes com os solventes orgânicos DMF e DCM (figura 5).

Os aminoácidos utilizados durante a síntese foram: Fmoc-Gly, -Leu, -Asp(t-but), -Val, -Ala, -Ile, -Phe, -Asn(trt), -Lys(Boc), -Trp(Boc), sendo os grupos trt (*tritila*), *t but* (*terc-butila*) e Boc (*terc-butiloxycarbolina*), os protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos especificados acima. Todos os aminoácidos, bem como os ativadores DIC e HOBt, foram adquiridos das empresas Nova Biochem Corp, Synpep e/ou Advanced Chem Tech. Os solventes (todos PA) utilizados foram DMF, DCM adquiridos do laboratório LabSynth; e NMP (metilpirrolidona) oriundo da empresa Acros Organics (USA).

O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado empregando-se o teste de ninidrina (KAISER et al., 1970), sendo que no caso de resultado positivo (cor azul), a reação de acoplamento era repetida utilizando como solvente uma mistura contendo 20% NMP em DCM. No caso de resultado negativo (cor amarela) a Fmoc-peptidil-resina era desprotegida e o Fmoc-aminoácido seguinte era acoplado (figura 5).

Ao fim da síntese para clivar o peptídeo da resina realizou-se uma reação utilizando-se uma solução composta por 5% de água, 2,5% de fenol, 2,5% de Etanodiotiol e 5% de tioanisol (v/v) em 82,5% de TFA, conhecido como “Reagente K” (KING et al., 1990; PENNINGTON; DUNN, 1994), durante duas horas, sob agitação moderada e à temperatura ambiente. Ao término, os peptídeos foram precipitados com éter etílico gelado e lavados várias vezes com este solvente para eliminação dos reagentes presentes na solução denominada de “Reagente K”. O precipitado obtido foi colocado em uma solução contendo 0,045% de TFA em água e centrifugado. O sobrenadante, contendo o peptídeo (solúvel neste solvente), foi concentrado à baixa pressão e liofilizado obtendo-se um pó branco que foi identificado como peptídeo bruto. Os reagentes foram adquiridos dos laboratórios Fluka (TFA) e Acros Organics (cresol).



**Figura 5:** Protocolo de Síntese utilizado na síntese dos peptídeos.

### 3.2. Purificação dos peptídeos

A purificação do produto bruto da síntese foi realizada em modo semi-preparativo utilizando um HPLC Waters, equipado com coluna C<sub>18</sub> Ultrasphere BECKMAN de tamanho 30,0 cm x 1,9 cm e um coletor automático da marca Pharmacia. Durante a purificação foram recolhidos tubos de 5 em 5 mL, e a pureza das frações foi determinada por análise analítica em HPLC Prostar 400/Dynamax System VARIAN, com coluna 4,6 mm x 25 cm de fase reversa C<sub>18</sub> Ultrasphere BECKMAN. Os tubos puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras que foram analisadas na mesma coluna acima descrita.

As condições cromatográficas foram:

**Modo semi-preparativo**

Solventes: A: 0,045% TFA. H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA . Acetonitrila

Gradiente: 35-70% de solvente B em 90 minutos

Fluxo: 5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

**Modo analítico**

Solventes: A: 0,045% TFA. H<sub>2</sub>O

B: 0,036% TFA . Acetonitrila

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

Fluxo: 1,5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Após as etapas de purificação os peptídeos foram caracterizados por espectrometria de massas e análise de aminoácidos, confirmando o sucesso das sínteses.

### 3.3. Análise de aminoácidos

A composição de aminoácidos dos peptídeos foi analisada pelo método de derivatização pós-coluna por orto-ftaldeído em analisador automático Shimadzu LC 10A/C-47A. Periodicamente, o sistema é calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de retenção e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra. Para esta análise os peptídeos (0,2- 1,0 mg) foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6 N, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H<sub>2</sub>O, a 110° por 72 horas em atmosfera de N<sub>2</sub>. 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.

O produto obtido foi detectado através da fluorescência, com  $\lambda_{exc}$  de 358 nm e  $\lambda_{emiss}$  de 450 nm.

### 3.4. Espectrometria de massas

Análises dos pesos moleculares dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um aparelho Fison Plataforma no modo ESI (“*eletrospray ionization*”), com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD, sistema este controlado por uma Workstation Compaq modelo AP 200, localizado neste instituto de Química, no Departamento de Química Orgânica.

A técnica baseia-se em um analisador do tipo quadrupolo que ioniza a amostra utilizando um “*eletrospray*”. Na interpretação do espectro, utiliza-se a fórmula:

$$\frac{M + nH}{n} = \frac{m}{z}$$

Figura 6: Fórmula da interpretação de ESI.

onde M é a massa real, n é o número de cargas e H é a massa de um próton. Desta forma foi possível determinar o valor de M e confirmar a obtenção do peptídeo desejado.

### 3.5. Atividade biológica

A ação antimicrobiana dos peptídeos sintetizados Hy-Wt, Hy-D-V<sup>5,16</sup>, Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup>, foi avaliada empregando-se ensaios biológicos com diversos microrganismos. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana podem ser realizados por métodos de difusão em ágar, cujos resultados são de caráter qualitativo ou por métodos de diluição em meio líquido, que possibilita a obtenção de resultados quantitativos, como a concentração inibitória mínima CIM (SHIN, 2001; BENINCASA et al., 2006). O CIM é geralmente utilizado para avaliar graus relativos de susceptibilidade de uma bactéria a agentes

antimicrobianos e para comparar atividades relativas de fármacos comerciais contra várias espécies bacterianas.

O CIM é definido como a menor concentração em que não há crescimento detectável do microrganismo. CFM é a concentração fungicida mínima, ou seja, é a menor concentração usada da droga contra cepas de fungos, que mata os microrganismos.

### 3.5.1. Atividade antibacteriana

As linhagens de bactérias utilizadas para realizar o teste da atividade antimicrobiana foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Estas foram cultivadas em uma temperatura de 37°C até a densidade ótica atingir 1,0 (DO= 1,0 a  $\lambda=590$  nm). Na fase logarítmica as bactérias foram diluídas no meio (1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas).

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

### 3.5.2. Atividade antifúngica

Os microorganismos utilizados para o teste da atividade antifúngica foram: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90012). Os microorganismos usados para os testes foram obtidos do Laboratório de Micologia do Departamento de Análises Clínicas da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP. Os fungos foram cultivados e mantidos em ágar Sabouraud dextrose por 24 e 48h, em temperatura de 35°C.

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

As amostras foram preparadas em DMSO e o volume adicionado à placa com meio de RPMI foi calculado para que a concentração do primeiro composto natural fosse 250 µg/mL. A suspensão das células foi preparada em solução fisiológica 0,85% com uma turbidez equivalente a escala McFarland 0,5 e diluído 1:100 em RPMI para a concentração final  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  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 e anfotericina (Sigma). A concentração fungicida foi determinada retirando-se alíquotas de cada poço das placas do ensaio anterior e colocando-as em novas placas com meio de cultura estéril, sem adição de peptídeos, durante 24 horas de incubação, obtendo-se o valor da Concentração Fungicida Mínima (CFM) para cada peptídeo. Essa etapa do projeto foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa da Professora Dr<sup>a</sup>. Maria José Soares Mendes Giannini, UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Micologia Clínica.

### 3.5.3. Atividade hemolítica

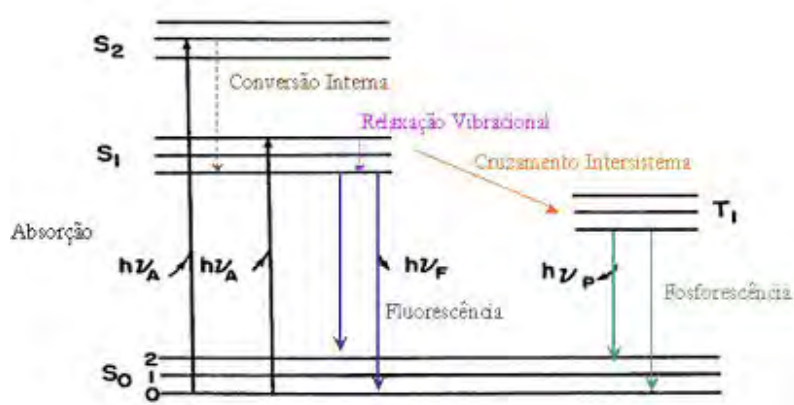
O protocolo foi modificado de Onuma *et al.* (1999). Células vermelhas de sangue humano do tipo O<sup>+</sup> foram separadas do plasma por sedimentação e lavadas 3 vezes em tampão 0,01 M Tris-HCl pH 7.4 contendo 0,15 M NaCl. Uma suspensão celular a 1% (v/v) e uma solução a 128 µM do peptídeo foram preparadas no mesmo tampão. Em tubos plásticos de 1,5 mL, diluições seriadas da solução do peptídeos foram usadas para determinar a HC<sub>50</sub> e o volume final em cada tubo foi 200 µL (100 µL da solução diluída do peptídeo e 100 µL da suspensão celular).

Depois de incubação a temperatura ambiente por 60 minutos, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 min e alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  da suspensão celular misturada com 100  $\mu\text{L}$  de 1% (v/v) Triton X-100. A referência de 0% de lise foi 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular com 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris. O ensaio foi realizado em triplicata. O valor da  $\text{HC}_{50}$  (concentração do peptídeo que causou 50% de hemólise) foi determinada por regressão logarítmica.

Os ensaios hemolíticos foram realizados pelo grupo de Professora Mariana S. Castro da Universidade de Brasília-UNB.

### 3.6. Fluorescência e UV

A espectroscopia é uma ferramenta utilizada para caracterizar grandes e pequenas macromoléculas. Moléculas que absorvem luz perdem parte desta energia por processos não radioativos (liberando calor), e em alguns casos a energia é liberada na forma de luz, esse fenômeno é conhecido como fluorescência ou fosforescência. A absorção de energia por certos grupos denominados cromóforos, os faz passar para um estado excitado (singlete excitado  $S_1$ ), ocorrendo em seguida uma emissão de parte desta energia em comprimentos de onda específicos, voltando para seu estado fundamental (singlete fundamental  $S_0$ ). Quando esta emissão é na forma de luz esta emissão é chamada de fluorescência (figura 7).



**Figura 7:** 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.

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas fundamentais para o estudo da estrutura e dinâmica de macromoléculas biológicas, especificamente proteínas e peptídeos. Essa técnica de fluorescência tem a vantagem de utilizar uma pequena quantidade do material, possuindo grande sensibilidade.

Nas análises de fluorescência de macromoléculas são usados dois tipos de fluoróforos, os fluoróforos intrínsecos (presente nas macromoléculas) e os fluoróforos extrínsecos (fluoróforos adicionados ao sistema). Cada fluoróforo possui comprimento de onda de absorção e de emissão característicos.

Os dados obtidos servem como ferramentas para estudar o ambiente em torno do fluoróforo, isto é possível, devido à sensibilidade deste componente ao ambiente que os circunda. Portanto, propriedades como comprimento de onda de emissão máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), rendimento quântico ( $\phi_F$ ), tempo de vida do fluoróforo ( $\tau_F$ ), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para caracterizar propriedades estruturais dos peptídeos.

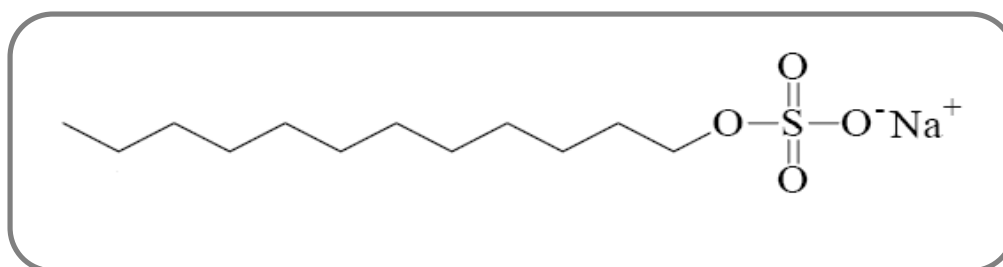
A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN. O comprimento de onda de excitação utilizado foi o de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido em uma faixa de 300 a 500 nm, obtendo-se em cada espectro a intensidade máxima de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) para cada peptídeo e condição estudada.

Os espectros de fluorescência foram obtidos através do uso de uma solução aquosa de 10  $\mu\text{M}$  de peptídeos e com um volume de 600  $\mu\text{L}$ . A concentração das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência foi determinada inicialmente pela absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado foi de 5540  $\text{M}^{-1}$  (MACH et al.,1992). Os estudos foram todos realizados em uma sala com temperatura à 25°C.

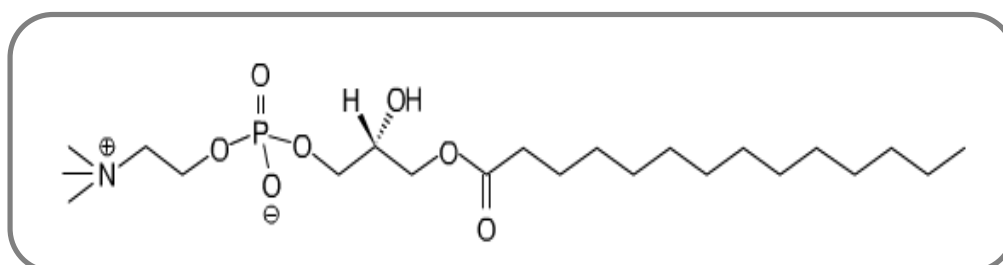
### 3.6.1. **E**studos de interação peptídeos/micelas

Análises utilizando-se miméticos de membranas foram feitas através da titulação do peptídeo com o detergente aniônico dodecil- sulfato de sódio (SDS- figura 8), e com o detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC- figura 9) adquiridos da Sigma e Avanti Polar Lipids, respectivamente. Os parâmetros usados para

analisar o comportamento estrutural dos peptídeos foram o comprimento de onda máxima de emissão ( $\lambda_{\text{max}}$ ) e a razão  $F/F_0$  (fluorescência da amostra/fluorescência na condição inicial). Nestes estudos, soluções estoque dos detergentes foram preparadas em alta concentração (SDS 200 mM e LPC 100 mM), e armazenadas sob refrigeração. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 50 mM para o SDS e 0 a 10 mM para o LPC. Para cada experimento, utilizou-se o tampão Tris HCl pH 7,4 com o intuito de deixar o meio com o pH próximo ao fisiológico.



**Figura 8:** Dodecil sulfato de sódio (SDS). Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)



**Figura 9:** 1-palmitoil-2- hidroxil-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC). Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

### 3.6.1.2. Supressão por acrilamida

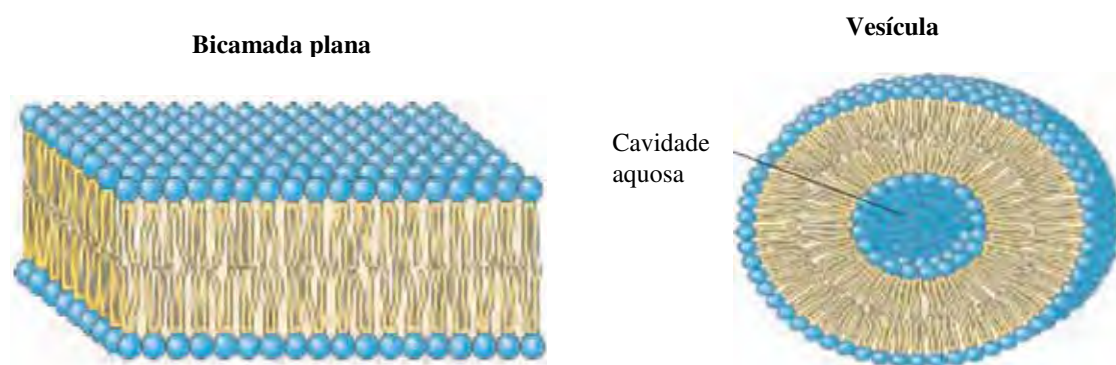
As análises foram realizadas em solução aquosa e na presença de micelas dos detergentes LPC e SDS. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10  $\mu\text{M}$ , e o volume da solução de 600  $\mu\text{L}$ . As concentrações de detergentes foram de 10 mM para o LPC e de 50 mM para o SDS. O aumento da concentração do supressor deu-se pela adição de uma

solução de acrilamida 4 M, em alíquotas de 1,5  $\mu\text{L}$  em 1,5  $\mu\text{L}$ , até que a concentração final atingisse 50  $\mu\text{M}$ .

### 3.6.2. Estudos de interação peptídeos/vesículas

Há 40 anos, o Dr. Alec Bangham observou que fosfolípidos em soluções aquosas organizam-se em bicamadas de maneira a formar estruturas vesiculares, com um compartimento aquoso em seu interior. Tais estruturas foram chamadas de vesículas e, hoje em dia, apresentam numerosas aplicações terapêuticas.

As vesículas são os modelos de membrana mais utilizados para estudar a associação peptídeo/membrana, pois sua forma de bicamada lipídica é idêntica a parte lipídica das membranas celulares. Ressaltamos, no entanto, que este sistema macromolecular é mais simples, não possuindo proteínas e carboidratos em sua composição (figura 10).



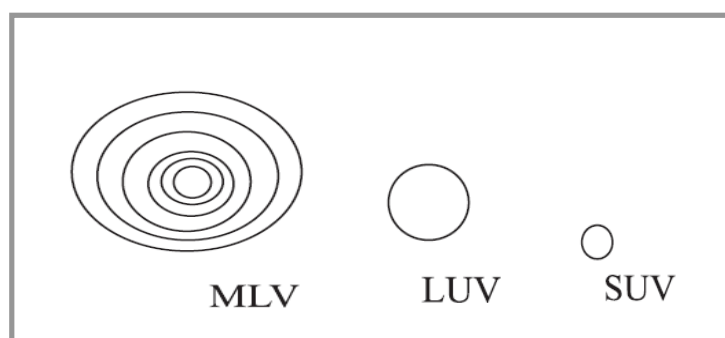
**Figura 10:** Bicamada plana de uma membrana celular à esquerda e uma vesícula à direita. (NELSON, 2006).

As vesículas podem ser classificadas de várias formas, conforme a composição química, tamanho e o número de camadas. Algumas das formas de classificação mais usadas são: 1) vesículas multilamelares grandes (MLV): formadas por vários compartimentos aquosos e lipofílicos intercalados, seu diâmetro pode variar de 100 a 5000 nm e o número de camadas pode estar entre 7 e 10; 2) vesículas unilamelares grandes (LUVs): possui um único compartimento interno aquoso e um lipofílico (bicamada lipídica), apresentando diâmetro superior a 50 nm, estas vesículas se caracterizam por terem uma tensão superficial semelhante ao das membranas celulares; 3) vesículas unilamelares pequenas (SUVs) que possuem diâmetro entre 15 e ~50 nm (figura 11).

Vesículas unilamelares têm sido usadas como modelo para estudar a interação e permeabilização de peptídeo-membrana. Essas vesículas têm sido usadas em combinação com outras técnicas espectroscópicas para decifrar a associação e a permeabilização da membrana pelos PAMs, e correlacionar os dados biofísicos dos peptídeos com a atividade bacteriana.

Os fosfolipídios são caracterizados por uma temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarboneto do lipídio está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e os substituintes hidrofílicos agrupados tornam-se completamente hidratados. O comprimento e a saturação da cadeia lipídica influenciam o valor de  $T_c$ , portanto, diferentes membranas compostas por lipídeos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura. (FREZÁRD, 2005). A confecção de vesículas com diferentes lipídios pode propiciar a formação de vesículas com propriedades diversas.

A carga da superfície da vesícula também pode ser manipulada pela introdução de lipídeos neutros e/ou carregados negativamente ou positivamente. Em geral, a presença de uma carga eletrostática na superfície das vesículas promove a interação com peptídeos catiônicos.



**Figura 11:** Representação esquemática dos vários tipos de vesículas, mostrando o diâmetro e o número de camadas: MLV- vesículas multilamelares, SUV- vesículas unilamelares pequenas, LUV- vesículas unilamelares grandes (SANTOS, 2002).

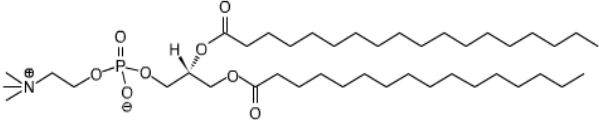
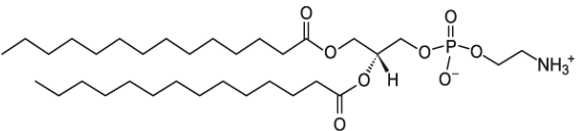
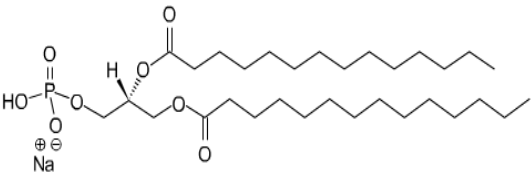
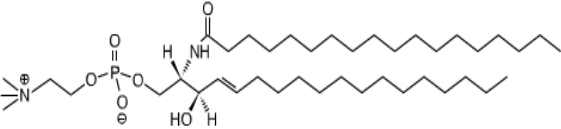
### 3.6.2.1. Preparação das vesículas

Devido à composição dos eritrócitos serem ricos em esfingomiélna (SM) e as bactérias Gram-negativas serem ricas em dipalmitoil-fosfoetanolamina (DPPE), resolvemos

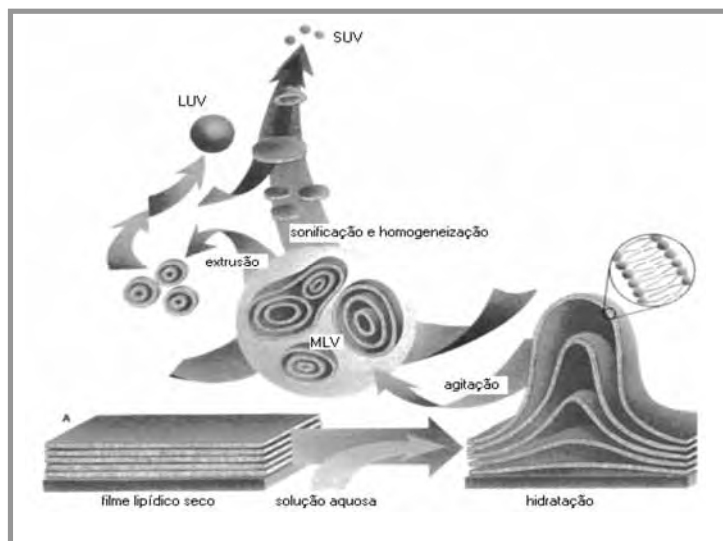
estudar a influência de cada um dos lipídeos na interação com os peptídeos. Desta forma, 2 tipos de vesículas diferentes foram confeccionadas: dipalmitoil- fosfatidilcolina (DPPC), ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA), esfingomielina (SM) na razão de 80%, 5% e 15%, respectivamente, e: dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), ácido dipalmitoil-fosfatídico (DPPA) e dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE) na mesma proporção. Para estes estudos, soluções-estoque concentradas das vesículas (15 mM/mL) foram preparadas. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 0,8 mM. Todos os lipídeos foram adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids.

Os lipídeos pesados na proporção acima descrita foram resuspendidos em clorofórmio e em metanol (4:1), e evaporados em N<sub>2</sub> até formar um filme fino aderido na parede do tubo. Este filme foi mantido sob vácuo durante 12 horas para eliminação dos solventes. Posteriormente, o filme foi hidratado com tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M com pH 7,4. Durante uma hora, o filme foi submetido repetidamente a um banho a 60° C, vortex e ultra-som para que as camadas fossem quebradas e o tamanho das vesículas diminuídas (agitação/ repouso), figura 12. Para se obter as vesículas unilamelares grandes (LUVs), as vesículas multilamelares foram submetidas à um sistema de alta pressão utilizando um extrusor, contendo filtro de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Avanti Polar Lipids). Para a homogeneização do tamanho das vesículas foram realizados 40 ciclos de extrusor nas membranas de policarbonato.

Devido à instabilidade das vesículas, a suspensão de LUV foi usada até no máximo 24 horas após a sua preparação e armazenada à 4° C. Todos os ensaios de interação foram feitos utilizando o tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,4.

Nomenclatura	Estrutura	Carga pH 7,4
DPPC (dipalmitoil fosfadidilcolina)		0
DPPE (dipalmitoil fosfaditiletalamina)		0
DPPA (dipalmitoil ácido fosfatídico)		-1
SM (esfingomielina)		0

**Quadro 2:** Lipídeos utilizados na preparação das vesículas, com sua estrutura e carga. Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)



**Figura 12:** Representação esquemática das metodologias de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLVs), vesículas unilamelares pequenas (SUVs) e vesículas unilamelares grandes (LUVs). Extraído de [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)

### 3.6.2.2. Supressão por acrilamida

Para corroborar com os estudos de interação acima, foram realizados estudos de supressão por acrilamida, visando indicar o grau de exposição do anel indol do triptofano do peptídeo na presença de vesículas.

As análises foram realizadas em solução aquosa e na presença das duas diferentes vesículas. A concentração total de lipídeo foi de 0,8 mM. As análises foram feitas em solução tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,4.

A concentração de peptídeo utilizada para os estudos foi de 10  $\mu$ M, e o volume final da solução foi de 600  $\mu$ L. O aumento da concentração do supressor deu-se pela adição de uma solução de acrilamida 4 M, em alíquotas de 1,5  $\mu$ L em 1,5  $\mu$ L, até que a concentração final atingisse 50  $\mu$ M.

### 3.6.2.3. Estudos de permeabilização

Para estudos de permeabilização, o filme formado na parede do tubo, descrito no item anterior, foi hidratado com solução de carboxifluoresceína (da empresa Sigma Aldrich) 80 mM, formando MLVs. O filme foi processado da mesma maneira descrita no item anterior, podendo-se verificar durante a etapa de extrusão a mudança da cor da solução de laranja (turvo) para levemente alaranjada (límpida). A carboxifluoresceína (CF) não incorporada as vesículas, foram removidas por filtração em gel em uma coluna Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) e estabilizada com tampão Tris- HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,4. Antes da corrida cinética, a solução com as vesículas e os peptídeos foram equilibrados em solução tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,4 durante 1 minuto.

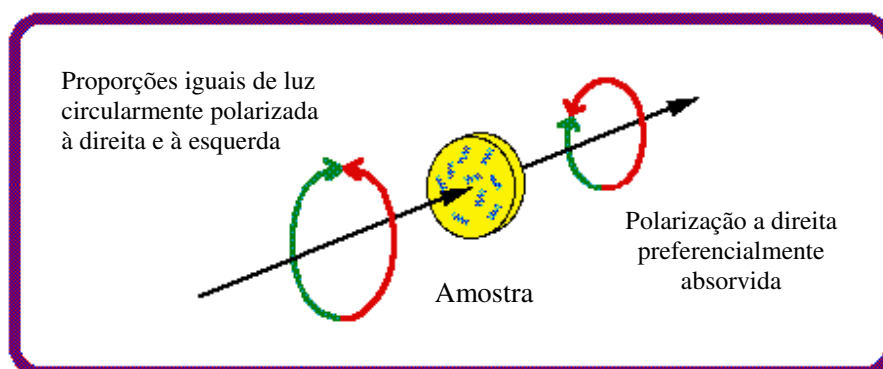
Nos estudos envolvendo a permeabilização entre peptídeos e vesículas, utilizamos um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN usando o Software Cinético (excitação 494 nm e emissão 520 nm). O valor de 100% de lise foi obtido pela adição do Triton x-100 à solução de vesículas. Este detergente provoca a lise total das vesículas, e a liberação da CF que pode ser observada pelo aumento da intensidade de fluorescência. As análises foram realizadas em tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M pH 7,4.

## 3.7. Análise estrutural dos peptídeos

### 3.7.1. Dicroísmo circular

O Dicroísmo Circular é uma técnica que possibilita visualizar a estrutura secundária de moléculas opticamente ativas, como proteínas e peptídeos. Essas podem apresentar-se em diferentes estruturas secundárias que são indicadas por bandas elípticas específicas com comprimentos de onda característicos em um intervalo de 260 a 190 nm. Essas moléculas opticamente ativas interagem com a luz polarizada e provocam alteração na luz incidente. Este fenômeno é representado pela medida da diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda após esta passar através de uma amostra, figura 13. A absorbância da luz circularmente polarizada é medida como elipticidade molar  $[\theta]_M$  em  $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$ .

Em proteínas e em peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são a ligação amida, e as cadeias laterais aromáticas do triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto (MULKERRIN, 1996).

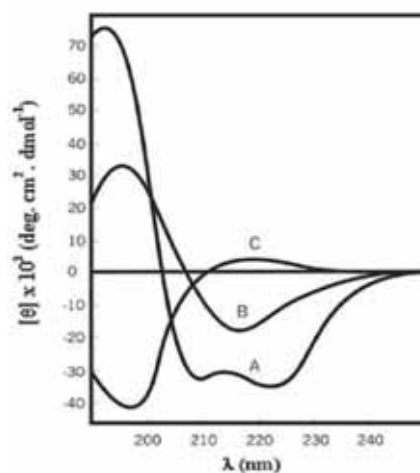


**Figura 13:** Ilustração esquemática do fenômeno de Dicroísmo Circular (REYES, 2005).

Devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH, a rotação ao redor da ligação O=C-NH da amida é restrita. A rotação é possível apenas, na ligação entre o átomo de Nitrogênio e do Carbono alfa (HN-C $\alpha$ ), representado pelo ângulo de rotação  $\Phi$  (phi), e na ligação entre o átomo de Carbono alfa e a carbonila (C $\alpha$ -C=O), representado pelo ângulo de rotação  $\Psi$  (psi). Os ângulos específicos phi e psi são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$  paralela e anti-paralela, vários tipos de dobras  $\beta$  e estrutura randômica. O cromóforo amida apresenta as transições:  $n \rightarrow \pi^*$ , centrada próximo a 220nm, com energia de transição menor, e  $\pi \rightarrow \pi^*$  centrada em 190nm.

Quando se dá o enovelamento da proteína, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, concomitantemente, o espectro da proteína ou peptídeo. Para proteínas que apresentam suas estruturas ao acaso, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto de duas bandas,  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A estrutura  $\beta$  apresenta uma banda  $n \rightarrow \pi^*$  centrada em 215 nm e uma banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  centrada em 196 nm. O espectro de uma  $\alpha$ -hélice possui essas mesmas bandas. No entanto, ele é mais complicado, pois nele a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  é desdobrada em  $\pi \rightarrow \pi^*$  (perpendicular), centrada em 191 nm, e  $\pi \rightarrow \pi^*$  (paralela) centrada em 208 nm. A transição  $n \rightarrow \pi^*$  é deslocada para um comprimento de

onda de menor energia, centrada em 222 nm. A figura 14 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.



**Figura 14:** Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (A)  $\alpha$ -hélice, (B) folha  $\beta$ -pregueada e (C) estrutura randômica (GREENFIELD; FASMAN, 1969).

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 estudos de CD foram realizados no Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo-USP, no grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos diferentes peptídeos em água, para posterior diluição à 80  $\mu$ M em solução aquosa, 60% TFE/H<sub>2</sub>O e 10 mM de LPC.

O conhecimento das estruturas secundárias de moléculas como proteínas e peptídeos são cruciais para entender a relação entre a função e a atividade dessas moléculas de grande interesse biológico.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Desenho racional dos análogos do peptídeo Hy-Wt

Como o objetivo principal deste projeto era obter análogos com alta atividade antimicrobiana e baixa capacidade hemolítica, algumas modificações foram realizadas

baseadas nos dados descritos na literatura (CHEN et al., 2005). Os análogos foram desenhados utilizando como ferramenta a projeção em “*helical wheel*” contendo as posições de 1 a 18 (figura 14) e a predição de estrutura. Na projeção de Schiffer e Edmundson- “*helical wheel*”-(1967) assume-se que o peptídeo está completamente em  $\alpha$ -hélice, podendo-se obter informações da anfipaticidade destes peptídeos. Este tipo de análise foi realizado devido aos trabalhos descritos na literatura, nos quais, a maioria dos PAMs assume este tipo de estrutura em contato com a membrana (SHAI, 1999) e da previsão de estrutura obtida no sítio *Predict Protein Server* – [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html), que mostrou que o peptídeo wild type está em  $\alpha$ -hélice. O diagrama circular helicoidal do peptídeo “*wild type*” (figura 15) mostra que a  $\alpha$ -hélice formada seria do tipo anfipática com uma face polar e uma apolar <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>.

As substituições realizadas na estrutura primária dos análogos visaram descontinuar a anfipaticidade da  $\alpha$ -hélice ou a própria  $\alpha$ -hélice, diminuindo a atividade hemolítica destes peptídeos (MALOY, 1995; MANGONI, 1996). A adição de D-aminoácidos em uma  $\alpha$ -hélice prejudica a formação desta estrutura, dificultando a sua atividade hemolítica, enquanto que a substituição de um resíduo de Ile por Lys, no meio da face apolar (figura 15), causa pela predição de estrutura (quadro 3) a formação de uma dobra beta, descontinuando a  $\alpha$ -hélice. A predição de estrutura dos peptídeos contendo D-aminoácidos não foi realizada, pois as ferramentas existentes na literatura não levam em conta este tipo de molécula.

Desta forma, 4 peptídeos com 21 resíduos de aminoácidos, foram avaliados, um possuindo a sequência original e 3 possuindo as seguintes substituições: 1) L-Lys na posição 9 resultando no peptídeo Hy-K<sup>9</sup>; 2) D-Val nas posições 5 e 16 originando o peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> e 3) D-Val na posição 16 originando o peptídeo Hy-D-V<sup>16</sup> (quadro 4).

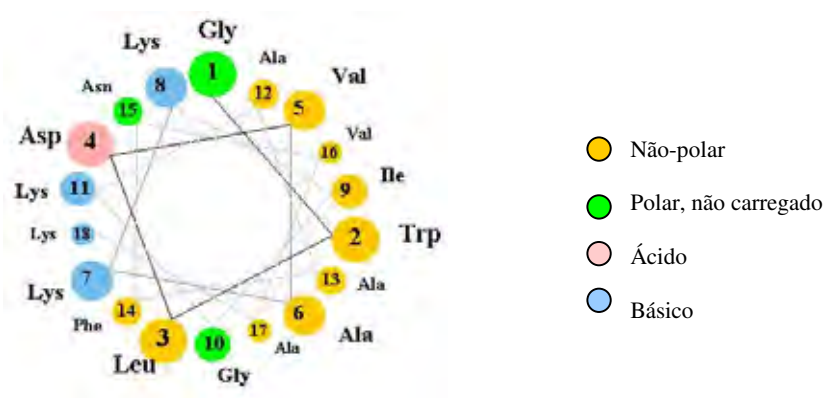
POSIÇÃO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>Hy-WT</b>	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
<b>Predição</b>	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	c	c	e
<b>Hy-K<sup>9</sup></b>	G	W	L	D	V	A	K	K	K	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
<b>Predição</b>	h	e	e	h	h	h	h	t	t	t	c	h	e	e	e	h	h	h	h	h	e

(h)  $\alpha$ -hélice, (e) estrutura estendida, (c) random coil, (t) dobra beta.

**Quadro 3:** Estrutura primária dos peptídeos e suas projeções

POSIÇÃO:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>Hy-WT</b>	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
<b>Hy-D-V<sup>5,16</sup></b>	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
<b>Hy-D-V<sup>16</sup></b>	G	W	L	D	V	A	K	K	I	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I
<b>Hy-K<sup>9</sup></b>	G	W	L	D	V	A	K	K	K	G	K	A	A	F	N	V	A	K	N	F	I

**Quadro 4:** Estrutura primária e as respectivas substituições em vermelho nos análogos.



**Figura 15:** Diagrama circular helicoidal (“*helical wheel*”) prevista para o peptídeo “*wild type*” proposto pelo programa *Predict Protein Server*.

## 4.2. Síntese e caracterização dos peptídeos

A resina utilizada para a síntese foi a *Rink Resin*, de forma que os peptídeos sintetizados foram obtidos com a extremidade C-terminal na forma de amida.

O primeiro peptídeo foi sintetizado com escala inicial de 0,2 mmol/g, e massa de resina de 0,3 g (grau de substituição inicial da resina = 0,7 mmol/g). Na posição 11 a síntese foi interrompida e a resina dividida em duas partes, ambas com 0,1 mmol de escala. Uma parte originou a seqüência denominada “*wild type*” (“peptídeo selvagem”) e outra parte foi armazenada. Os análogos foram sintetizados em uma nova síntese com escala inicial de 0,3 mmol/g e massa da resina de 0,450 g. Na posição 17, a síntese foi interrompida e dividida em duas partes, uma com 0,2 mmol/g e outra com 0,1 mmol/g. O lote com 0,1 mmol/g seguiu da posição 17 até a posição 10, colocando-se na posição 9 um resíduo de L-Lys, e seguindo até a posição 1, dando origem ao peptídeo Hy-K<sup>9</sup>. Nos 0,2 mmol/g restantes colocou-se na posição 16 um resíduo de D-Val, e seguiu-se até a posição

6. Nesta posição, a síntese foi interrompida e dividida em partes iguais. Sendo, uma sintetizada com L e outra com D-Val na posição 5, resultando ao final duas seqüências: Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-D-V<sup>16</sup>.

Todos os peptídeos necessitaram de 1 ou mais reacoplamentos durante a síntese (teste de ninidrina positivo). Os números de reacoplamentos necessários foram de: 26 para Hy-D-V<sup>5,16</sup>, 27 para o Hy-D-V<sup>16</sup>, 7 para a Hy-K<sup>9</sup> e 8 para o Hy-Wt. Desta forma não foi possível relacionar o rendimento da síntese com o número de reacoplamentos, pois apesar dos peptídeos Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-D-V<sup>16</sup> mostrarem praticamente o mesmo número de reacoplamentos apresentaram rendimentos diferentes (tabela 1). O mesmo ocorreu para os peptídeos Hy-K<sup>9</sup> e Hy-Wt. Acreditamos desta forma, que o baixo rendimento e o alto teor de contaminantes no produto bruto final foram decorrentes de erros experimentais.

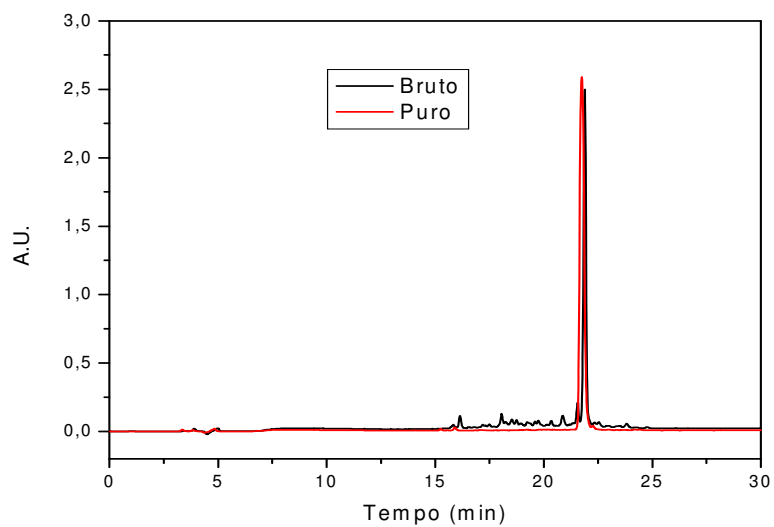
Os peptídeos passaram por processo de clivagem, resultando após as etapas de clivagem, extração e liofilização, um material branco floculoso (peptídeo bruto).

O peptídeo Hy-Wt bruto apresentou um bom perfil cromatográfico com 84% de pureza, seguido dos análogos, Hy-D-V<sup>16</sup> com 76%, Hy-D-V<sup>5,16</sup> com 55% e Hy-K<sup>9</sup> com 13%. O grau de pureza do bruto foi acompanhado pelo rendimento da síntese, isto é, quanto maior o grau de pureza maior o rendimento obtido (tabela 1). Desta forma o mais baixo grau de pureza foi obtido para o peptídeo Hy-K<sup>9</sup>.

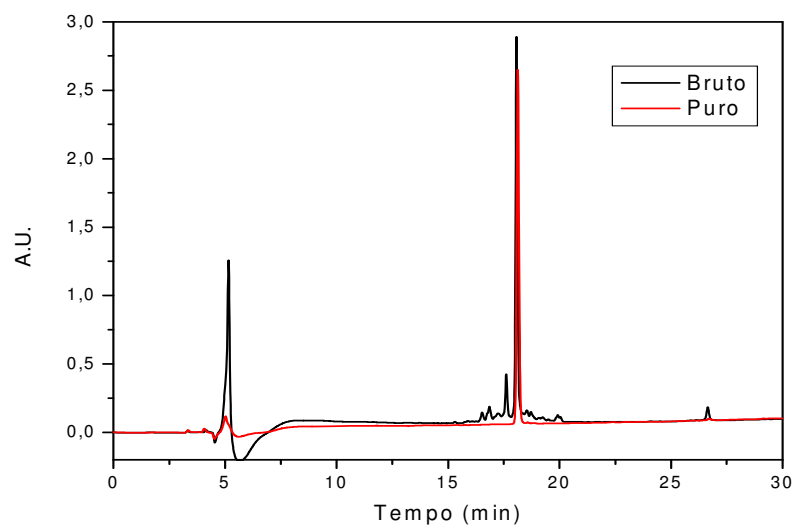
Os materiais obtidos foram purificados em HPLC, resultando em frações com diferentes graus de pureza (tabela 1). Os cromatogramas dos peptídeos brutos e puros estão nas figuras 16, 17, 18 e 19.

**Tabela 1:** Valores das massa e dos graus de pureza do peptídeo bruto e das frações do “wild type”, Hy-D-V<sup>5,16</sup>, Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup>.

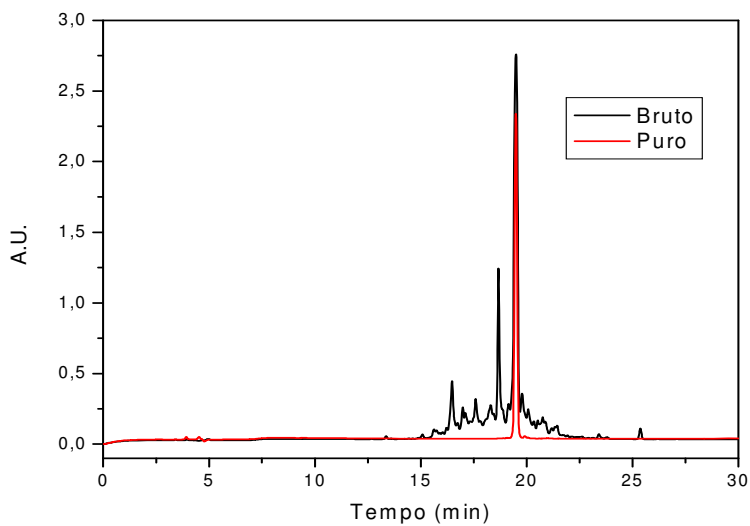
Peptídeo	Fração	Massa (mg)	Pureza (%)	Rendimento (%)
Hy-Wt	Bruto	71	84	
	1a	39	100	17
Hy-D-V <sup>5,16</sup>	Bruto	186	55	
	1a	35	100	7
Hy-D-V <sup>16</sup>	Bruto	201	76	
	1a	59	100	12
Hy-K <sup>9</sup>	Bruto	240	13	
	1a	9	100	2



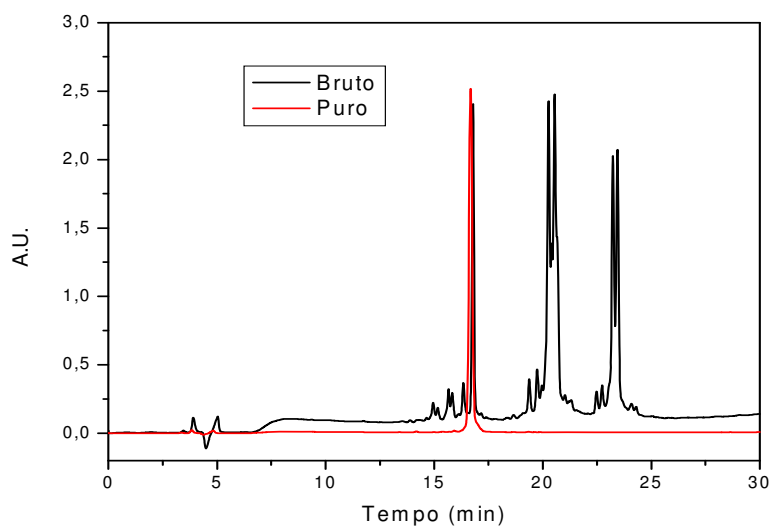
**Figura 16:** Perfil cromatográfico do Hy-Wt bruto e puro. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.



**Figura 17:** Perfil cromatográfico do Hy-D-V <sup>5.16</sup> bruto e puro. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.



**Figura 18:** Perfil cromatográfico do Hy-D-V<sup>16</sup> bruto e puro. Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.



**Figura 19:** Perfil cromatográfico do Hy- K<sup>9</sup> bruto e puro . Programa: gradiente de 5 a 95% B em 30 minutos. Solvente A: 0,045% TFA/H<sub>2</sub>O e B: 0,036% TFA/Acetonitrila. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.

Cada peptídeo, devido às alterações em sua estrutura primária apresentou tempos de retenção ( $T_R$ ) diferentes. A tabela 2 mostra as diferenças dos tempos em que o peptídeo foi retido na coluna. A ordem obtida foi: Hy-K<sup>9</sup> < Hy-D-V<sup>5,16</sup> < Hy-D-V<sup>16</sup> < “wild type”. Estes resultados mostraram que as substituições alterando-se uma ou duas L-Val por D-Val, podem estar causando alterações estruturais do peptídeo, pois eluem da coluna em tempos diferentes comparativamente ao “wild type”. O menor tempo de retenção dos peptídeos contendo D-Val indica que a hidrofobicidade do peptídeo diminuiu, provavelmente provocada pela quebra da  $\alpha$ -hélice que é obtida quando D-aminoácidos são introduzidos em uma estrutura helicoidal (AVRAHAMI, 2003; NELSON, 2006; PAPO, 2002;). No caso do Hy-K<sup>9</sup>, como ocorreu a substituição de um aminoácido apolar por um polar, isto é, Ile por Lys, este eluiu mais rápido da coluna do que os outros análogos, ou seja, ele teve sua hidrofobicidade diminuída, portanto uma menor interação com a coluna C<sub>18</sub>.

**Tabela 2:** Tempo de retenção ( $T_R$ ) e variação em comparação com “wild type”.

<b>Peptídeos</b>	<b><math>T_R</math>(min)</b>	<b><math>\Delta t_R</math>(X- WT)</b>
<b>1- Hy- K<sup>9</sup></b>	13,89	-4,23
<b>2- Hy-D-V<sup>5,16</sup></b>	14,54	-3.58
<b>3- Hy-D-V<sup>16</sup></b>	16,09	-2.03
<b>4- Hy- Wt</b>	18,12	0

#### 4.2.1. Caracterização dos peptídeos

##### 4.2.1.1. Análise de aminoácidos

Para confirmar a obtenção dos peptídeos desejados foram feitas várias caracterizações.

A primeira análise realizada foi a de aminoácidos (AAA). Esta é importante, pois permite obter a composição de aminoácidos, a concentração relativa entre eles e o conteúdo peptídico (teor de peptídeo na amostra).

As análises confirmaram a presença e a proporção relativa correta de todos os aminoácidos presentes em cada peptídeo (tabela 3), com exceção do triptofano que é degradado durante a hidrólise ácida.

Tabela 3: Análise de aminoácidos dos peptídeos sintetizados.

Proporção Relativa dos aminoácidos								
Aminoácidos	Peptídeos							
	Hy-Wt		Hy-D-V <sup>5,16</sup>		Hy-D-V <sup>16</sup>		Hy-K <sup>9</sup>	
	esp.	obtido	esp.	obtido	esp.	obtido	esp.	obtido
<b>Asp</b>	3	3,2	3	3,3	3	3,3	3	3,2
<b>Gly</b>	2	2,2	2	1,8	2	2,2	2	2,1
<b>Ala</b>	4	4,3	4	3,7	4	4,2	4	4,0
<b>Val</b>	2	1,8	2	2,1	2	2,0	2	2,0
<b>Ile</b>	2	1,9	2	2,1	2	2,1	1	1
<b>Leu</b>	1	0,9	1	0,8	1	0,8	1	0,9
<b>Phe</b>	2	1,8	2	2,1	2	2,0	2	1,9
<b>Lys</b>	4	3,8	4	4,1	4	3,7	5	4,8

#### 4.2.1.2. Espectrometria de massas

A caracterização dos peptídeos também foi realizada através da espectrometria de massas, apresentando resultados condizentes com o teórico. O espectro do peptídeo Hy-Wt (MM = 2289,8 g/mol) apresentou picos de 1145,9 (carga+2), 764,2 (carga+3) e 573,4 (carga +4), figura 20. Os espectros dos análogos Hy-D-Val<sup>5,16</sup> e Hy-D-Val<sup>16</sup> são semelhantes ao “*wild type*”, pois as substituições são de resíduos de L-valina por “D”, portanto, não houve alteração na massa molecular. Já o espectro do peptídeo Hy-K<sup>9</sup> (MM = 2303,3 g/mol) apresentou picos de 1153 (carga +2), 769 (carga +3), 577 (carga +4), figura 21. Estes dados confirmam o sucesso da síntese e do material obtido.

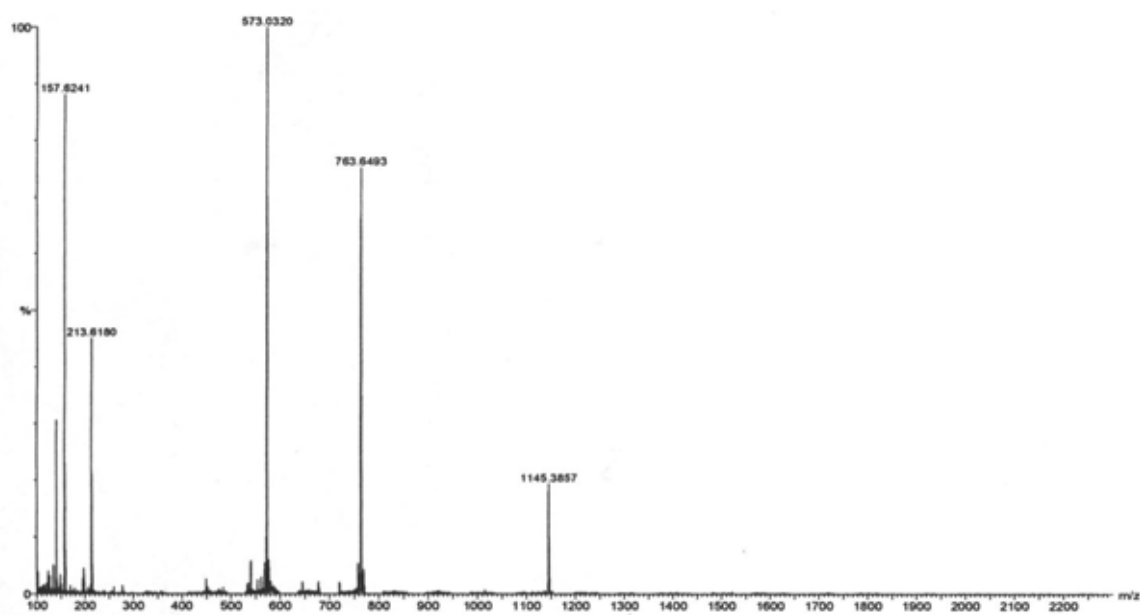


Figura 20: Espectro de massas do peptídeo puro: Hy-Wt

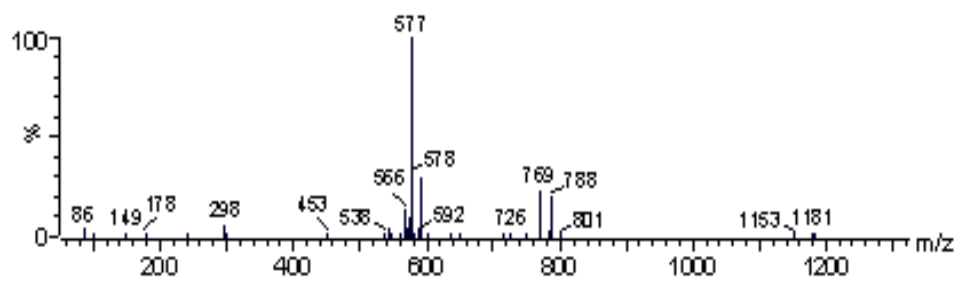


Figura 21: Espectro de massas do peptídeo puro: Hy-K<sup>9</sup>

### 4.3. Atividade biológica

Após a caracterização dos peptídeos, estes foram submetidos a estudos de atividade biológica para verificar o efeito de cada modificação na cadeia polipeptídica.

#### 4.3.1. Atividade antibacteriana

Uma série de PAMs vem sendo testados com eficiência contra bactérias, como: *E. coli* (Gram-negativa), *S. aureus* (Gram-positiva) e *P. aeruginosa* (Gram-negativa). A maioria dos PAMs é catiônica (apresenta aminoácidos com carga positiva em sua estrutura- Lys, His e Arg) em pH fisiológico, o que facilita a interação com as membranas desses microrganismos. O primeiro passo no modo de ação destes peptídeos envolve a interação com a membrana citoplasmática no caso das bactérias Gram-positivas, enquanto que, em bactérias Gram-negativas as interações ocorrem também com a membrana externa.

Nos estudos de ação antimicrobiana, o “*wild type*” (Hy-Wt) foi o mais eficiente, apresentando os mais baixos valores de CIM, para todas as bactérias testadas, *E. coli* 4  $\mu\text{M}$ , *S. aureus* 1  $\mu\text{M}$  e *P. aeruginosa* 8  $\mu\text{M}$ . O peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> apresentou valores de CIM com valores acima de 16  $\mu\text{M}$ , sendo o menos eficaz, enquanto o Hy-K<sup>9</sup> mostrou valores de CIM acima de 8  $\mu\text{M}$ . Desta forma, todos os peptídeos apresentaram boa capacidade de inviabilizar a bactéria Gram-negativa *E. coli*, apresentando valores de no máximo 16  $\mu\text{M}$  de CIM. Para a *P. aeruginosa*, uma bactéria também Gram-negativa, os peptídeos mostraram valores de CIM acima de 8  $\mu\text{M}$  a 128  $\mu\text{M}$ .

Na bactéria Gram-positiva *S. aureus* os peptídeos Hy-Wt e Hy-D-V<sup>16</sup> foram os mais ativos, com valores de CIM de 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  respectivamente

Bactérias Gram-negativas como *E.coli*, são particularmente suscetíveis a ação de peptídeos catiônicos, pois suas membranas além de apresentarem fosfolipídios carregados negativamente, também apresentam lipopolissacarídeos carregados negativamente favorecendo a interação com os peptídeos (EPAND; VOGEL, 1999). Creditamos a alta eficácia destes peptídeos a esta bactéria ao fato de todos os peptídeos estudados serem catiônicos, e carregados positivamente em pH fisiológico. Os peptídeos Hy-Wt, Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-D-V<sup>16</sup> apresentaram carga +4, e o Hy-K<sup>9</sup> apresentou carga +5. No entanto, podemos verificar que somente este fator não é suficiente para explicar a maior atividade do “*wild*

*type*” em relação ao Hy-K<sup>9</sup>, pois este último apesar de ser mais carregado não foi o mais ativo. Desta forma, outros fatores como a estrutura devem ser considerada.

Já os estudos de Samuelsen (SAMUELSEN et al., 2005) mostraram que os peptídeos antimicrobianos não são tão eficazes contra bactérias Gram-positivas como a *S. aureus*. Os poucos casos descritos até o momento que apresentaram resistência a PAMs, incluem espécies de microrganismos como *S. aureus*, que possuem membranas com baixo potencial elétrico, essencial para interação e/ou entrada do peptídeo (SAMUELSEN et al., 2005). Os nossos resultados mostraram que os peptídeos podem ser um eficiente agente contra esta bactéria, pois apresentaram baixo valor de CIM, principalmente os peptídeos Hy-Wt e Hy-D-V<sup>16</sup>.

Os estudos de atividades antimicrobianas mostraram que os todos peptídeos tem a capacidade de inibir o crescimento/matar algumas espécies de bactérias.

**Tabela 4:** Valores da atividade antimicrobiana para os peptídeos sintetizados.

BACTÉRIAS	PEPTÍDEOS			
	Hy-Wt	Hy-D-V <sup>5,16</sup>	Hy-D-V <sup>16</sup>	Hy-K <sup>9</sup>
<i>E. coli</i>	4 µM	16 µM	4 µM	8 µM
<i>S. aureus</i>	1 µM	64 µM	2 µM	não determinado
<i>P. aeruginosa</i>	8 µM	128 µM	16 µM	32 µM

#### 4.3.2. Atividade antifúngica

Vários trabalhos (BENINCASA, 2006; GREGORY, 2009) têm demonstrado a afinidade dos PAMs por membranas de bactérias. Entretanto, há pouca informação a respeito do conhecimento do mecanismos de ação desses peptídeos contra os fungos. Sugere-se ainda que a seletividade dos PAM para os fungos envolve também a presença do ergosterol nas suas membranas plasmáticas (AVRAHAMI, 2003).

Desta forma, nesta etapa do trabalho avaliamos a capacidade antifúngica destes peptídeos.

Em todas as cepas de fungos testadas, o peptídeo mais ativo foi o “*wild type*”. A maior eficácia foi contra a *C. parapsilosis* que apresentou o menor valor de CIM para o peptídeo “*wild type*”, seguido de *C. neoformans* e *C. albicans* e *C. krusei*.

O controle de infecções por fungos representa ainda hoje, um dos graves problemas na saúde, sendo necessário o desenvolvimento de fármacos efetivos e com baixos efeitos colaterais. Entretanto, nos últimos anos, relatos de cepas resistentes a todas as modalidades de tratamentos disponíveis atualmente vem se tornando cada vez mais frequentes, tornando estas doenças infecciosas um grande desafio aos pesquisadores.

Dentre os organismos testados, chamamos atenção para a *Candida albicans*, que é um importante patógeno humano, sendo responsável atualmente por 80% dos casos de infecções fúngicas em ambientes hospitalares. Neste fungo, os peptídeos apresentaram uma baixa CIM, indicando a possibilidade de sua aplicação como um protótipo para o desenvolvimento de fármacos.

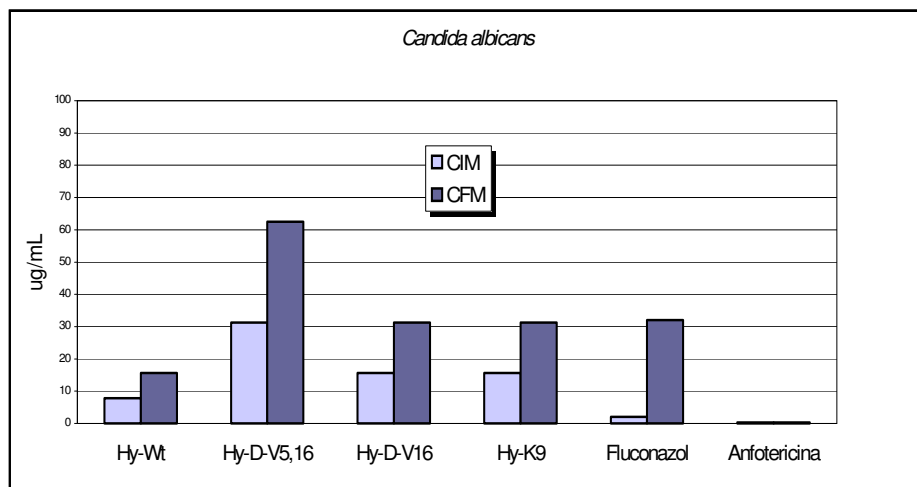
Os estudos das atividades antifúngicas mostraram que os peptídeos testados possuem a capacidade de inibir o crescimento (fungistático) e matar algumas espécies de fungos (fungicida).

Na cepa de *Candida albicans*, o peptídeo mais ativo foi Hy-Wt, sendo fungistático na concentração de 7,8 µg/mL e fungicida na concentração 15,6 µg/mL. Os análogos apresentaram valores de CIM maiores, isto é, acima de 15,6 µg/mL, figura 22.

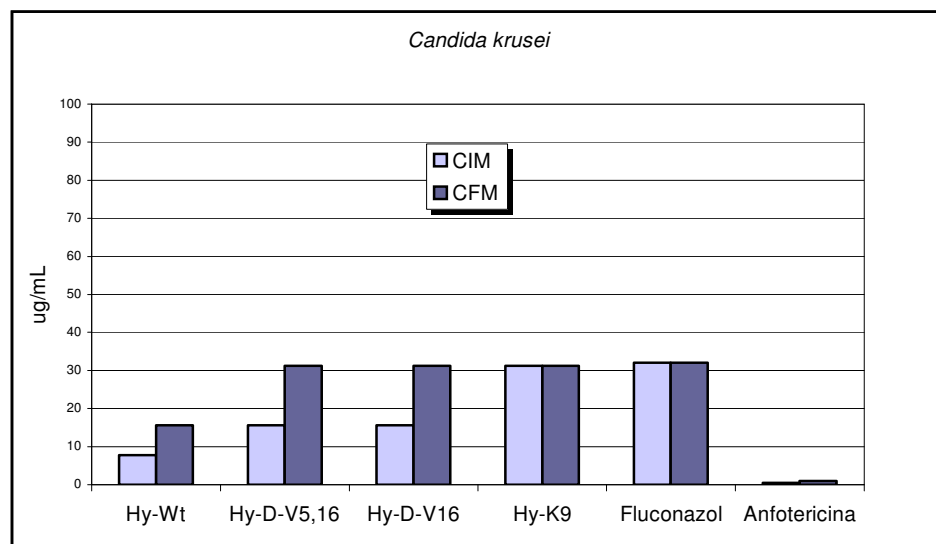
Para a cepa de *Candida krusei*, o peptídeo mais ativo também foi o “wild type” com CIM de 7,8 µg/mL e CFM de 15,6 µg/mL. Os análogos não foram tão eficientes, mas também apresentaram boa atividade. Os análogos Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-D-V<sup>16</sup> apresentaram os mesmos valores de CIM 15,6 µg/mL e CFM 31,2 µg/mL, e o análogo Hy-K<sup>9</sup> foi fungicida na concentração de 31,2 µg/mL, figura 23.

Em *Candida parapsilosis*, o “wild type” apresentou CIM de 3,9 µg/mL e o CFM de 7,8 µg/mL. O análogo Hy-D-V<sup>16</sup> mostrou CIM de 7,8 µg/mL e CFM de 31,2 µg/mL e os peptídeos Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> apresentaram baixa atividade, com valores de CIM e CFM acima de 15,6 µg/mL, figura 24.

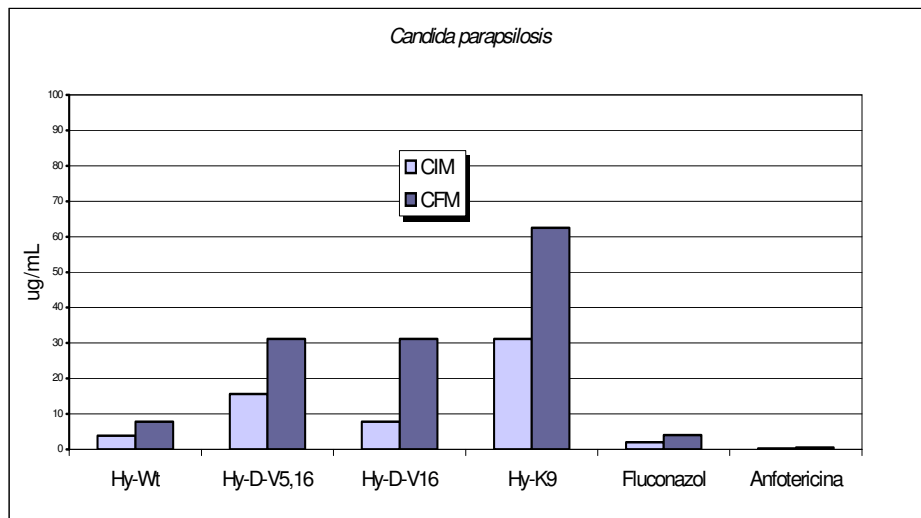
Em fungos de *Cryptococcus neoformans*, o “wild type” agiu como fungicida em 7,8 µg/mL. O análogo Hy-D-V<sup>16</sup> mostrou ser fungicida em 15,6 µg/mL e os Hy-D-V<sup>5,16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> apresentaram CIM de 15,6 µg/mL e CFM de 31,2 µg/mL, figura 25.



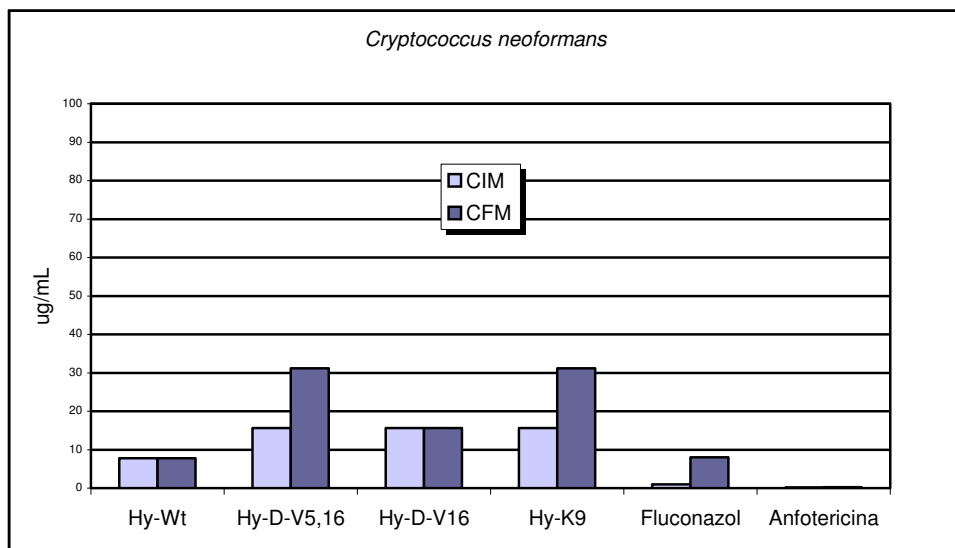
**Figura 22:** Valores de CIM e CFM para a levedura de *Candida albicans*



**Figura 23:** Valores de CIM e CFM para levedura de *Candida krusei*



**Figura 24:** Valores de CIM e CFM para a levedura de *Candida parapsilosis*



**Figura 25:** Valores de CIM e CFM para levedura de *Cryptococcus neoformans*

### 4.3.3. Atividade hemolítica

O efeito das alterações realizadas na estrutura primária do peptídeo em suas atividades hemolíticas também foi realizada. Este estudo é importante, pois, o peptídeo ideal seria aquele que possui baixa atividade hemolítica e alta atividade antimicrobiana.

Vale lembrar que, a literatura relaciona peptídeos ativos contra células bacterianas e sem atividade hemolítica, com a presença de vários resíduos carregados positivamente (EPAND; VOGEL, 1999). De forma contrária, peptídeos que apresentam pequenos valores de carga da cadeia peptídica revelam-se hemolíticos (SHAI, 1999).

Embora todos os peptídeos tenham apresentado atividade hemolítica, foram observadas diferenças entre eles, associadas as substituições de resíduos nas novas cadeias peptídicas. O peptídeo “*wild type*” foi o único que apresentou hemólise elevada, com  $HC_{50} = 26 \mu M$ . Os análogos Hy-D-V<sup>5,16</sup>, Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> na concentração máxima testada de  $64 \mu M$  apresentaram 16, 23 e 12% de hemólise, respectivamente. Desta forma, todas as modificações causaram uma grande diminuição na atividade hemolítica. A baixa hemólise destes análogos, pode ser atribuída a possível desestruturação da  $\alpha$ -hélice obtida.

A partir desses dados em conjunto com os dos testes antimicrobianos, acreditamos que os peptídeos Hy-D-V<sup>5,16</sup>, Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> podem atuar como agentes antimicrobianos sem apresentarem alta lise das hemácias, servindo como modelos para compreender melhor seus mecanismos de ação.

## 4.4. Fluorescência e UV

O triptofano é um aminoácido fluorescente presente em muitas proteínas. A fluorescência do cromóforo indol pertencente a este resíduo é altamente sensível ao ambiente, podendo ser utilizada para monitorar alterações conformacionais em proteínas e interações com outras moléculas (CHEN; BARKLEY, 1998).

O triptofano responde sensivelmente a polaridade do meio, sendo que em ambiente apolar, o grupo indol apresenta uma emissão com comprimento de onda menor (maior energia). O aumento da polaridade do meio, incluindo a formação de pontes de hidrogênio com o solvente, desloca a emissão para comprimentos de ondas maiores - região do vermelho (menor energia) “*red shift*”.

A presença do triptofano na estrutura do peptídeo permite detectar desta forma, a interação do peptídeo com modelos de membranas, mostrando detalhes do seu modo de ação. Essa abordagem foi complementada por estudos de apagamento de fluorescência (“*quenching*”), onde a titulação de acrilamida – hidrossolúvel – permitiu a determinação da constante de Stern Volmer e informações sobre a exposição do triptofano ao meio (EFTINK et al., 1976).

#### 4.4.1. Estudos em micelas

Geralmente, as moléculas de surfactantes em ambiente polar tendem a se agregar formando esferas, com as caudas hidrofóbicas voltadas para o seu interior e os grupos hidrofílicos ou carregados para fora. Essas moléculas se agregam a partir de uma concentração micelar crítica. A concentração micelar crítica é a concentração mínima de detergente na qual as micelas se formam. Abaixo da CMC, os surfactantes estão predominantemente na forma de monômeros.

As micelas formadas podem ser utilizadas como modelos de membrana, pois mimetizam em parte uma bicamada lipídica.

##### 4.4.1.1. Micelas de LPC

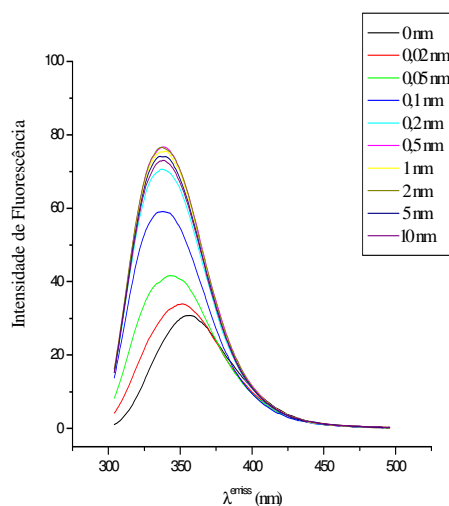
O LPC é um detergente dipolar, possuindo uma carga negativa próxima da cadeia acila e uma positiva em sua extremidade, diferindo dos lipídeos por conter uma única cauda acila e não duas. Desta forma em solução aquosa e a partir da CMC, que é de aproximadamente 1,1 mM (MORAIS et al., 2007), forma micelas e não vesículas. O LPC pode ser considerado quimicamente próximo a fosfatidilcolina (fosfolipídio presente na membrana celular de alguns organismos), apresentando uma cabeça polar com um fosfato ligado à cauda acila e um grupo colina.

Os dados obtidos a partir da titulação de LPC estão nas figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31. Pode-se notar para todos os peptídeos uma diminuição de aproximadamente 20 nm no comprimento de onda de emissão máxima  $\lambda_{\max}$  - “*blue shift*” - e um aumento de 2,5 vezes na intensidade de fluorescência, indicando uma migração para um ambiente apolar. Isso indica que os peptídeos interagiram com a micela. Ressaltamos que acima da CMC, estes parâmetros não variaram, indicando que após a formação da micela, não houve mudança no tipo de interação com este modelo de membrana.

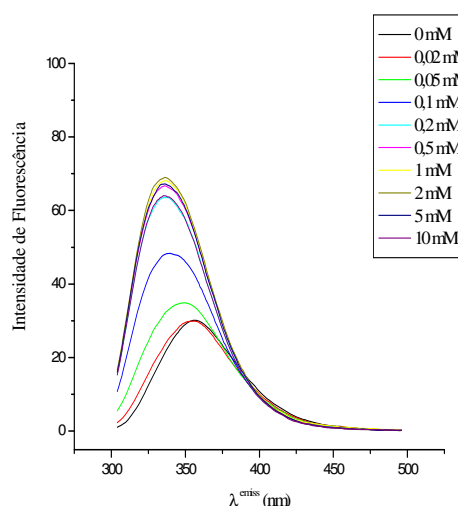
Para efeito de comparação entre os peptídeos, considerou-se o comprimento de onda máximo mais adequado, pois mudanças conformacionais sofridas pelo peptídeo ou interações com moléculas carregadas do sistema em análise, podem causar alterações da intensidade de fluorescência (CHEN; BARKLEY,1998).

#### 4.4.1.2. Micelas de SDS

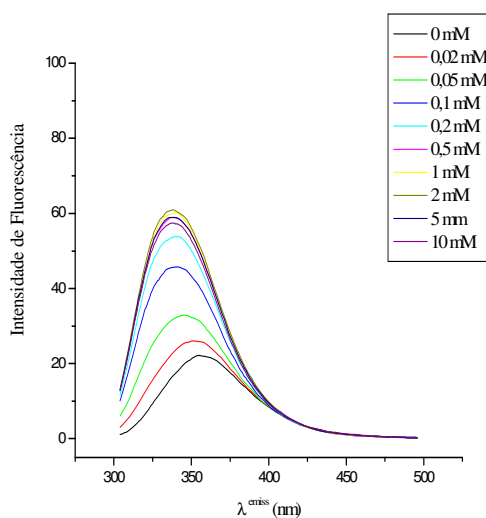
Nos estudos de titulação com SDS (figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37), que forma micelas aniônicas, pode-se observar um aumento da intensidade de fluorescência em concentrações abaixo da CMC, indicando uma interação de monômeros do SDS com o peptídeo. Este fato não foi observado para o peptídeo com duas “D”-val, Hy-D-V<sup>5,16</sup>, que não mostrou esta interação. Com o aumento da concentração de SDS, o ambiente se tornou mais apolar, até a formação de micelas -CMC 8,0 mM (STAFFORD et al., 1989). Comparativamente com o peptídeo em solução, ocorreu a diminuição do comprimento de onda máximo e a diminuição da intensidade da fluorescência, após atingir a CMC. Estes dados indicam interação do peptídeo com a micela. A diminuição da intensidade de fluorescência, contrária do esperado pode ser atribuída à supressão da fluorescência pelas cargas presentes no SDS. Estes dados podem indicar que a região N-terminal dos peptídeos pode estar na superfície da micela.



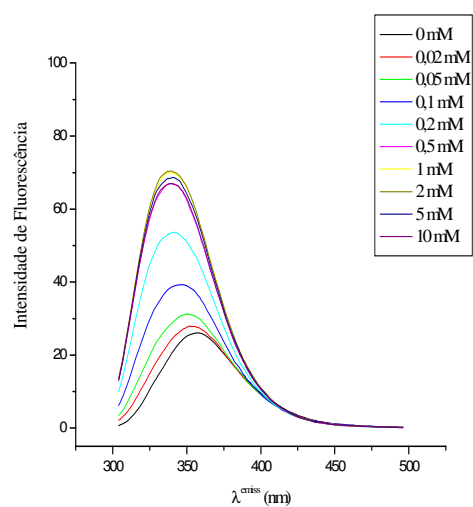
**Figura 26:** Espectros de fluorescência do peptídeo Hy-Wt em diferentes concentrações de LPC.



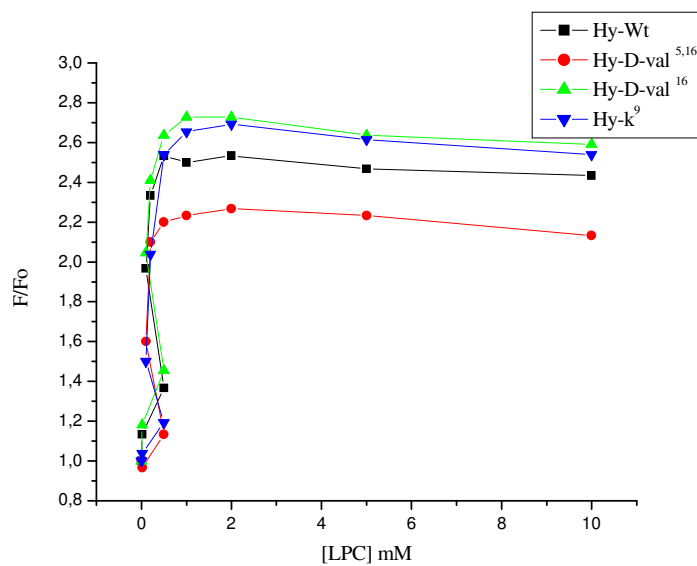
**Figura 27:** Espectros de fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> em diferentes concentrações de LPC



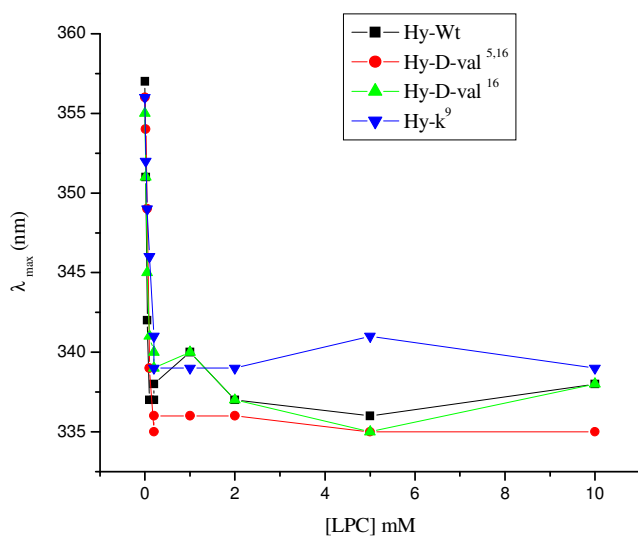
**Figura 28:** Espectros de fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>16</sup> em diferentes concentrações de LPC.



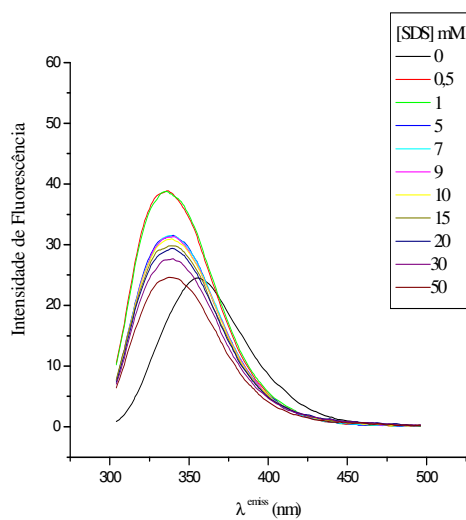
**Figura 29:** Espectros de fluorescência do peptídeo Hy-K<sup>9</sup> em diferentes concentrações de LPC.



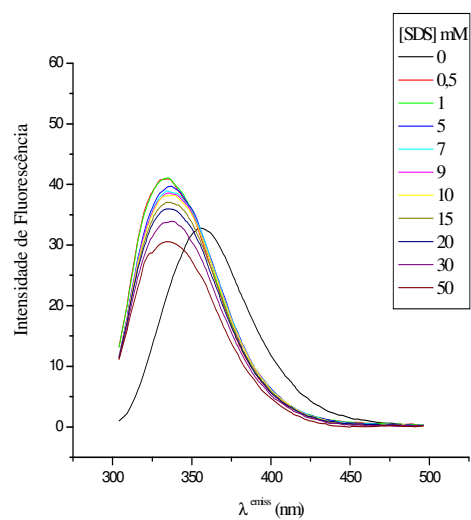
**Figura 30:** Gráfico da variação da intensidade de fluorescência em função da [LPC] para todos os peptídeos.



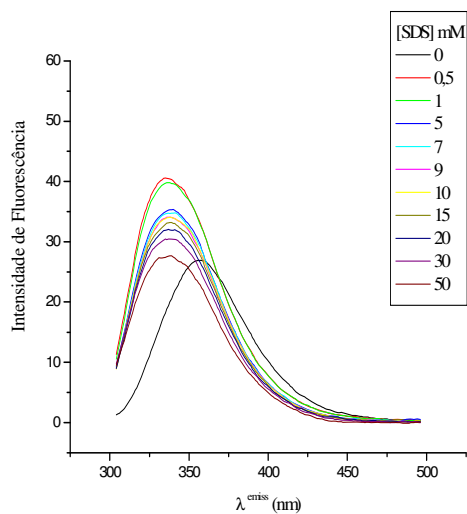
**Figura 31:** Gráfico da variação de  $\lambda_{\text{max}}$  de emissão em função da [LPC] para todos os peptídeos.



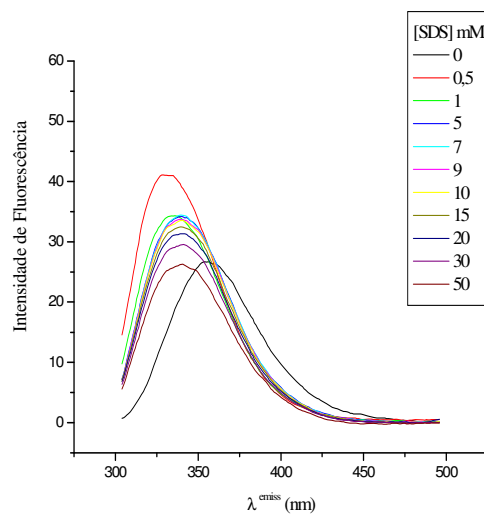
**Figura 32:** Espectros de fluorescência do Hy-Wt em diferentes concentrações de SDS.



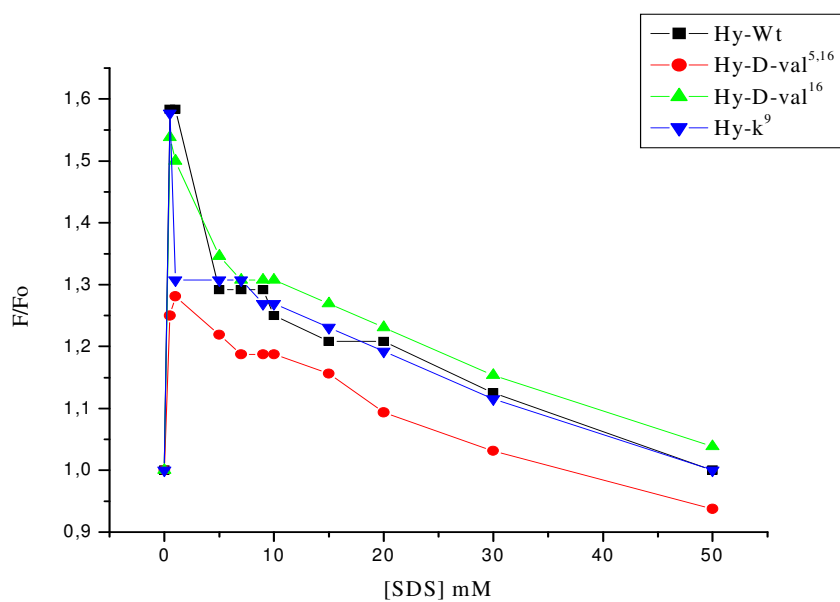
**Figura 33:** Espectros de fluorescência do Hy-D-V<sup>5,16</sup> em diferentes concentrações de SDS.



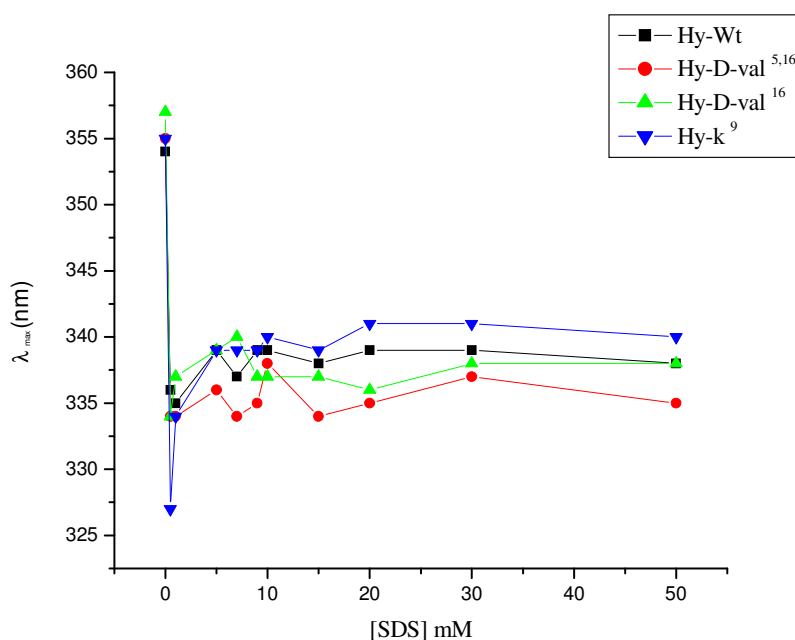
**Figura 34:** Espectros de fluorescência do Hy-D-V<sup>16</sup> em diferentes concentrações de SDS.



**Figura 35:** Espectros de fluorescência do Hy-K<sup>9</sup> em diferentes concentrações de SDS.



**Figura 36:** Gráfico da variação da Intensidade de fluorescência em função da [SDS] para todos os peptídeos.



**Figura 37:** Gráfico da variação de  $\lambda_{\max}$  de emissão em função da [SDS] para todos os peptídeos.

#### 4.4.2. Estudos de supressão de fluorescência

Para complementar os estudos acima foram realizados experimentos de supressão de fluorescência com os peptídeos em solução e na presença das micelas. O supressor utilizado foi a acrilamida, que é um eficiente “apagador” da fluorescência do triptofano. Este agente diminui a intensidade de fluorescência via contato físico (colisão) com o anel indol excitado. Assim, um maior apagamento da fluorescência indica uma maior exposição do triptofano ao meio polar e uma menor inserção na micela.

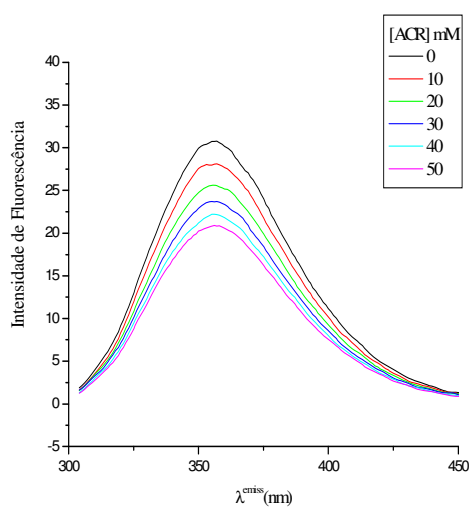
Essa supressão pode ser medida numericamente através da constante de *Stern-Volmer* para cada peptídeo nas diferentes condições estudadas (EFTINK et.al., 1976). A constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) é um parâmetro obtido a partir da tangente da curva de supressão, que relaciona a intensidade de fluorescência ( $F_0/F$ ) em função da concentração de apagador ( $F_0/F$ ).

A titulação por acrilamida é mostrada nos espectros 38, 39, 40 e 41, onde verificou-se a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do

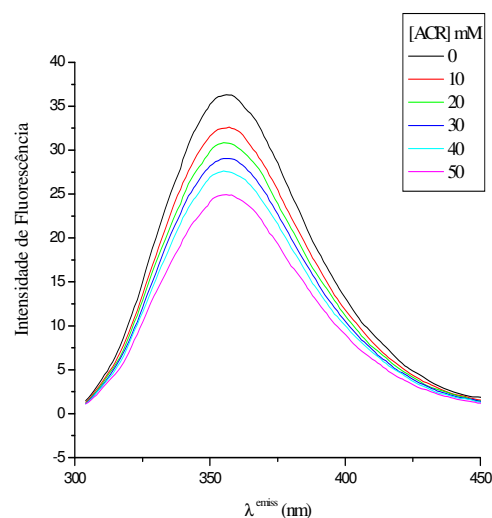
supressor. Pode-se observar também que o comprimento de onda de emissão não se alterou, comprovando que a supressão foi do tipo dinâmica.

Na comparação dos valores obtidos de Ksv (tabela 5), pode-se observar que independente do detergente usado, os apagamentos foram maiores em água do que nas micelas, confirmando a interação dos peptídeos com estes modelos de membrana (figuras 42, 43 e 44). Menores apagamentos indicam que o triptofano está menos exposto ao meio e conseqüentemente mais inserido na micela.

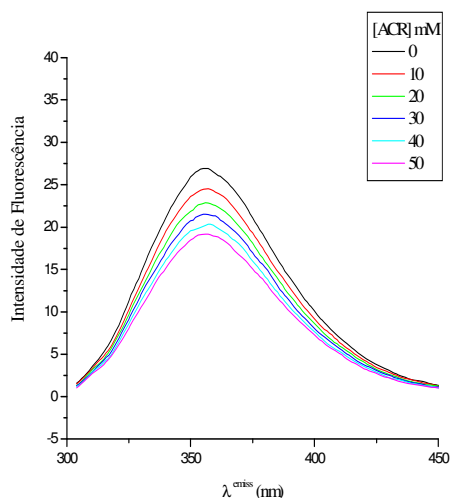
Os valores Ksv (maiores valores) obtidos em solução mostram que a região N-terminal dos peptídeos “*wild type*” e Hy-D-V<sup>5,16</sup> está mais exposta ao meio que tais regiões nos outros análogos. Estes dados sugerem uma maior agregação entre as cadeias peptídicas ou uma estruturação intra-cadeia dos peptídeos Hy-K<sup>9</sup> e Hy-D-V<sup>16</sup>.



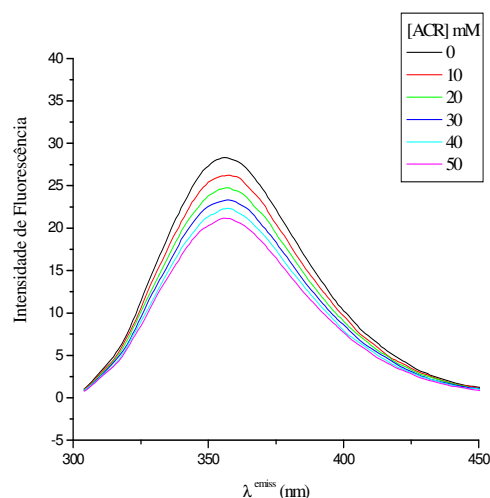
**Figura 38:** Espectros de fluorescência do Hy-Wt em solução com diferentes concentrações de acrilamida pH 7,4.



**Figura 39:** Espectros de fluorescência do Hy-D-V<sup>5,16</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida pH 7,4.



**Figura 40:** Espectros de fluorescência do Hy-D-V<sup>16</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida pH 7,4.

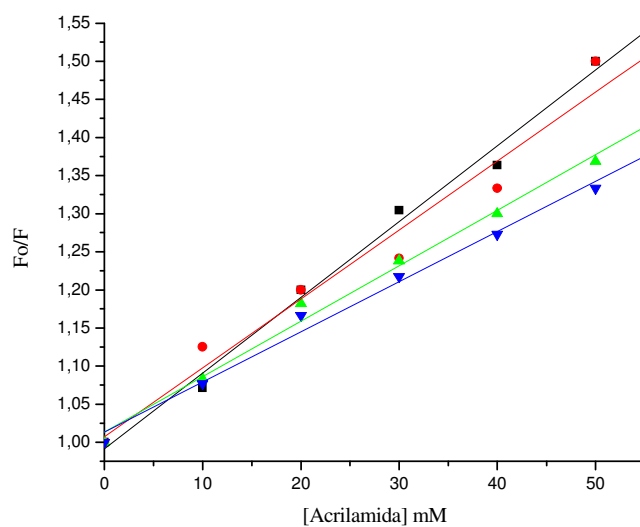


**Figura 41:** Espectros de fluorescência do Hy-K<sup>9</sup> em solução com diferentes concentrações de acrilamida pH 7,4.

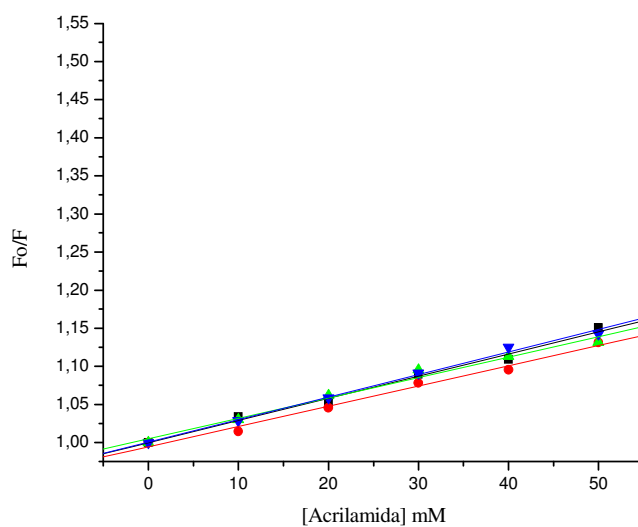
Para as micelas de LPC e SDS pode-se analisar que todos os peptídeos apresentaram valores muito próximos de  $K_{sv}$ , indicando a mesma interação com as micelas. Comparativamente, em micelas de SDS os peptídeos mostraram menor imersão do que com LPC (tabela 5), pois apresentaram maiores valores de  $K_{sv}$  (~ 5 contra 3). Ressaltamos que, devido à maior semelhança estrutural entre o LPC e os lipídios de membrana, acreditamos que os resultados nas micelas deste detergente são os mais próximos dos que seriam encontrados na membrana biológica.

**Tabela 5:** Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) nos detergentes LPC e SDS e em solução.

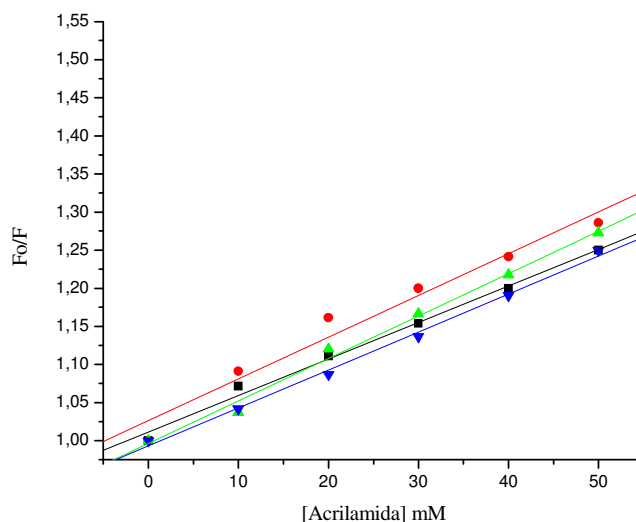
Peptídeos	$\lambda$ max solução (nm)	$\lambda$ max LPC (nm)	$\lambda$ max solução (nm)	$\lambda$ max SDS (nm)	$K_{sv}$ SDS ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ LPC ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ solução ( $M^{-1}$ )
Hy-Wt	357	338	354	337	4,8	2,9	10,0
Hy-D-V <sup>5,16</sup>	356	335	355	335	5,5	2,7	9,0
Hy-D-V <sup>16</sup>	355	338	357	338	5,6	2,7	6,6
Hy-K <sup>9</sup>	356	339	355	340	5,0	2,9	7,3



**Figura 42:** Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V<sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V<sup>16</sup> (▲) e Hy-K<sup>9</sup> (▼) em solução aquosa pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.



**Figura 43:** Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V<sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V<sup>16</sup> (▲) e Hy-K<sup>9</sup> (▼) em LPC - pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.



**Figura 44:** Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V<sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V<sup>16</sup> (▲) e Hy-K<sup>9</sup> (▼) em SDS - pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

Os resultados obtidos de maneira geral indicam que todos peptídeos interagem igualmente com as membranas, não sendo este fator o responsável pela diferença na atividade biológica.

#### 4.4.3. Estudos em vesículas

Modelos de membrana superiores às micelas são representados pelas vesículas. A principal vantagem desses sistemas, além de mimetizar melhor a bicamada lipídica, é que se pode variar as suas composições. Desta forma, é possível estudar cada tipo de lipídeo isoladamente, medindo a contribuição de cada um na interação com os peptídeos.

Nestes estudos, foram estudados a contribuição de dois diferentes lipídeos na interação com os peptídeos: SM e DPPE. A SM foi avaliada por ser o principal fosfolipídio na membrana externa de eritrócito, estando diretamente associada à hemólise. O DPPE foi escolhido por ser o principal lipídeo existente em bactérias Gram-negativas (LIU, 2008). Desta forma, foram avaliados isoladamente lipídeos presentes nas membranas de organismos procariotos (DPPE) e eucariotos (SM). Para completar a composição das vesículas dois outros lipídeos foram utilizados, o ácido fosfatídico (DPPA) e a fosfatidilcolina (DPPC), que foram utilizados nas mesmas concentrações nos dois sistemas

de membranas utilizados. A DPPA foi utilizada por apresentar carga negativa, mimetizando assim o potencial eletroquímico das membranas. A DPPC foi usada por não ser possível experimentalmente preparar vesículas de DPPE acima de 15%, sendo este lipídeo utilizado para completar a vesícula. Todos os lipídios acima possuem 2 cadeias de ácido graxo palmitoil, com exceção da SM.

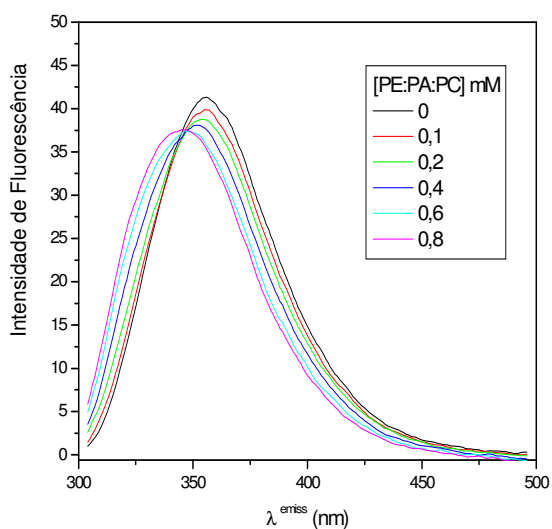
#### 4.4.3.1. Interação peptídeo/ vesículas

##### 4.4.3.1.1. Vesículas contendo PE

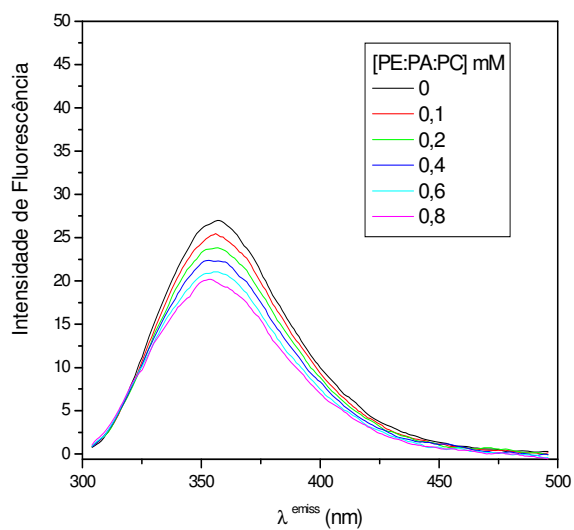
O lipídeo fosfatidiletanolamina (PE) está presente na membrana de bactérias Gram-negativa de *E. coli*, membrana discoidal (bovina), na mielina humana, etc.

Os dados obtidos nos espectros de fluorescência de todos os peptídeos, representados nas figuras 45, 46, 47, 48, 49 e 50 mostram que a intensidade de fluorescência diminui com o aumento da concentração de lipídeo. Essa diminuição da intensidade de fluorescência indica uma mudança conformacional do peptídeo, aproximando as cadeias laterais dos aminoácidos carregados ao triptofano, funcionando como supressores. Este resultado também pode ser explicado pela aproximação dos grupos carregados dos lipídeos que também podem agir como supressores. O esperado para a interação com a parte apolar das vesículas seria o aumento da intensidade.

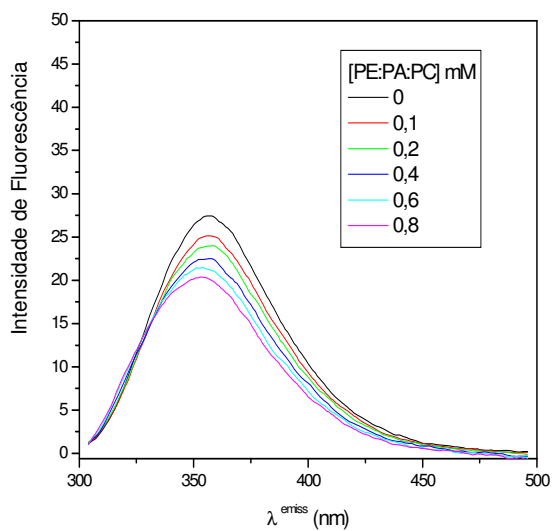
Analisando a variação do comprimento de onda de emissão máxima em função da concentração de vesículas, a maior diminuição ocorreu para o peptídeo “*wild type*”, indicando uma maior interação com a vesícula. Os demais peptídeos mostraram pequena variação de comprimento de onda de emissão máxima, indicando pouca interação com as vesículas.



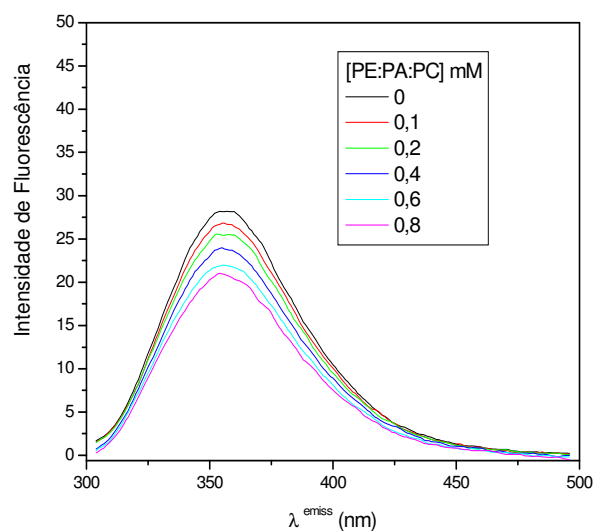
**Figura 45:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-Wt obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC e pH 7,4.



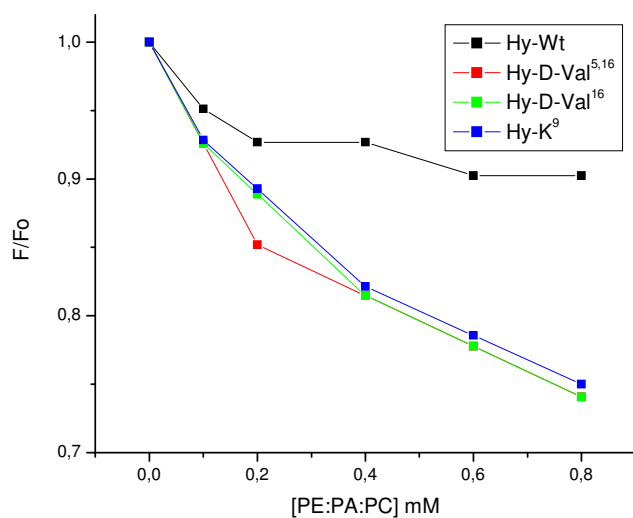
**Figura 46:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC e pH 7,4.



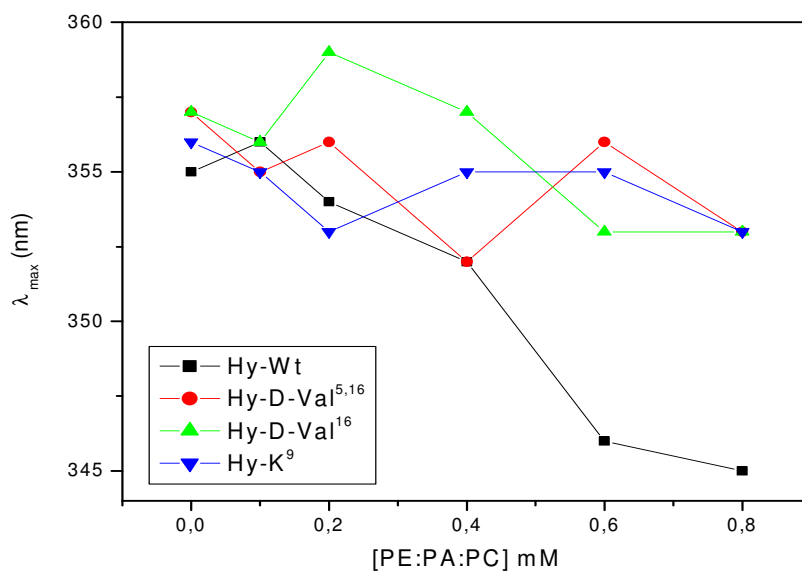
**Figura 47:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-K<sup>9</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC e pH 7,4.



**Figura 48:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de PE:PA:PC e pH 7,4.



**Figura 49:** Gráfico da variação da intensidade de Fluorescência em função da [PE:PA:PC] de todos os peptídeos.

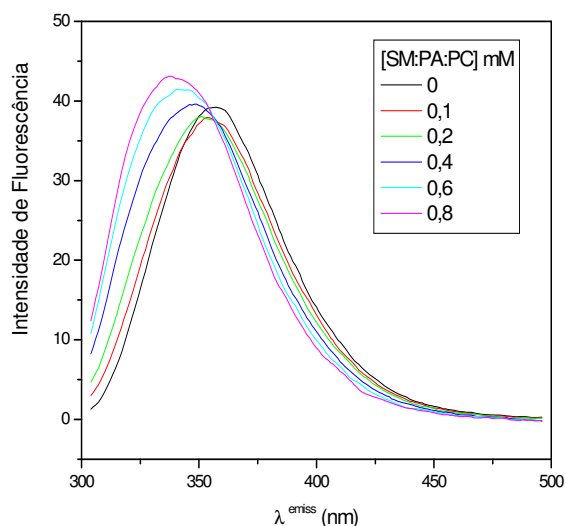


**Figura 50:** Gráfico da variação de  $\lambda_{\max}$  em função da [PE:PA:PC] para todos os peptídeos.

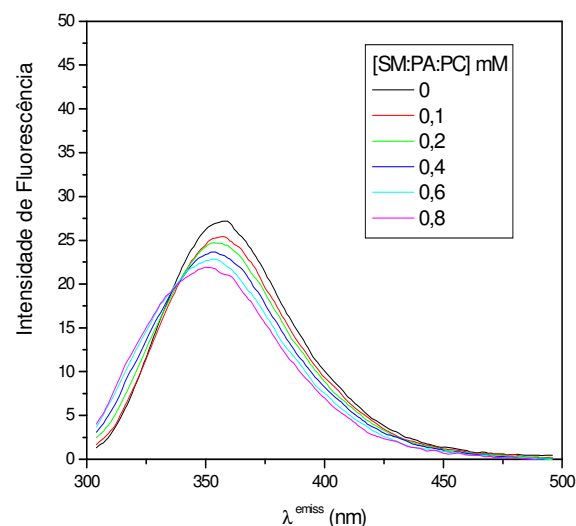
#### 4.4.3.1.2. Vesículas contendo SM

O lipídeo esfingomielina (SM) é importante, pois está presente em grande quantidade na monocamada externa da membrana dos eritrócitos e da mielina de humanos.

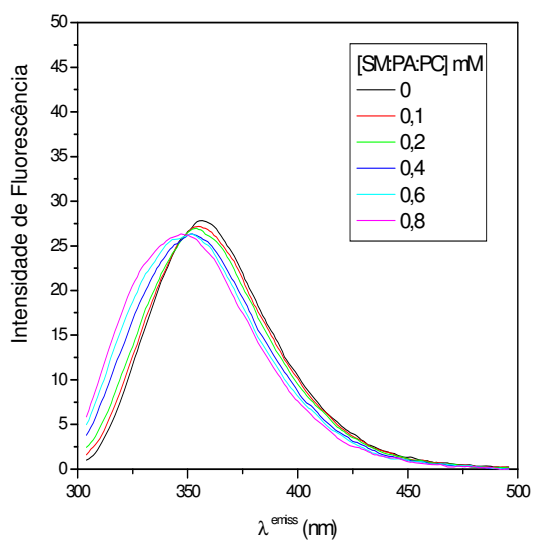
Os espectros de fluorescência mostrados na figura 51, “*wild type*”, apontaram redução na intensidade de fluorescência apenas nas duas primeiras titulações, em seguida ocorre um aumento da intensidade, indicando que a região do peptídeo que apresenta o triptofano está imerso na vesícula. Esta interação também pode ser confirmada pelo deslocamento para a região de comprimentos de onda menores - “*blue shift*” – indicando uma migração da região contendo o triptofano para um meio mais apolar. Os demais peptídeos, da mesma forma que com as vesículas contendo DPPE, apresentaram baixa interação com as vesículas contendo SM figuras 52, 53, 54, 55 e 56.



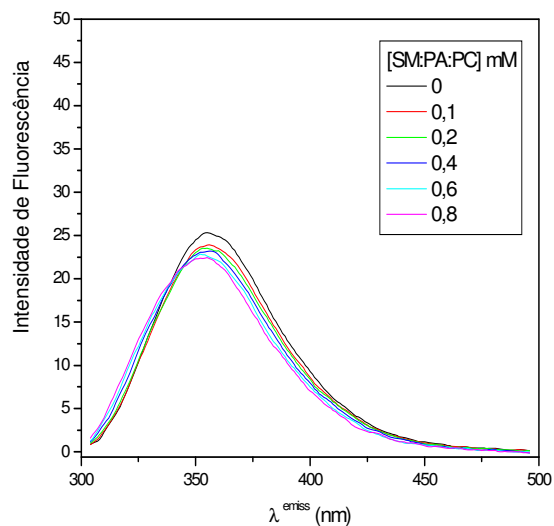
**Figura 51:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-Wt obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC e pH 7,4.



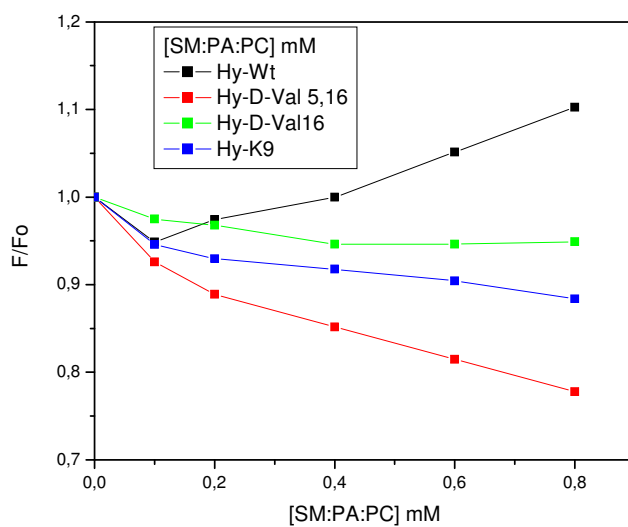
**Figura 52:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC e pH 7,4.



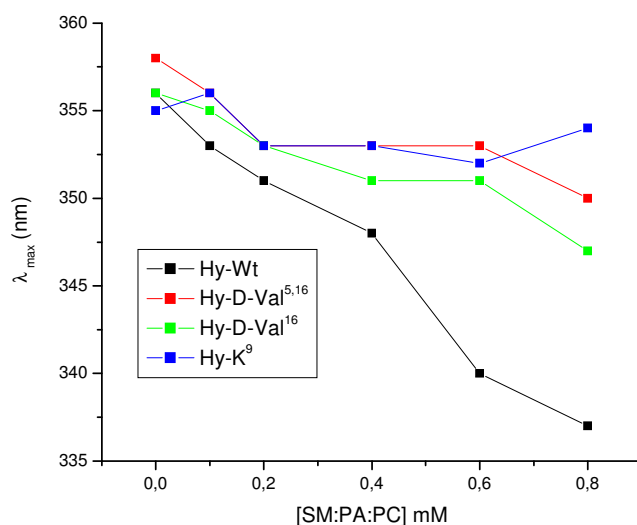
**Figura 53:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-K<sup>9</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC e pH 7,4.



**Figura 54:** Espectros de Fluorescência do peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> obtidos em diferentes concentrações da vesícula de SM:PA:PC e pH 7,4.



**Figura 55:** Gráfico da variação da Intensidade de Fluorescência em função da [SM:PA:PC] de todos os peptídeos.



**Figura 56:** Gráfico da variação do  $\lambda_{\max}$  em função da [SM:PA:PC] de todos os peptídeos.

#### 4.4.4. Estudos de supressão de fluorescência

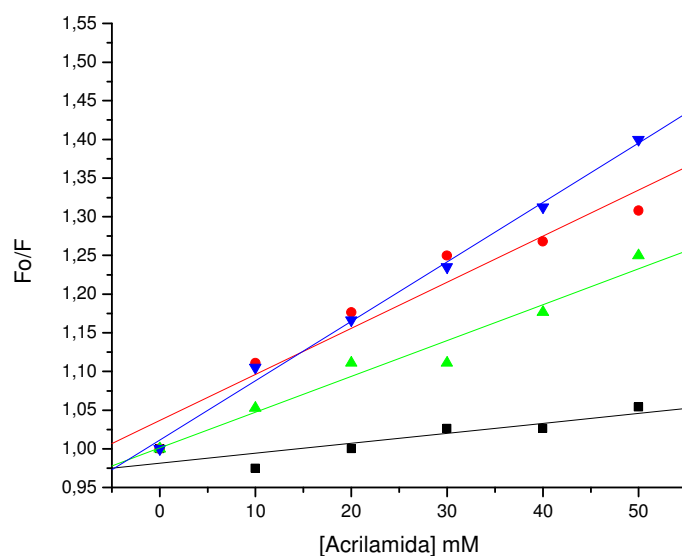
Para compreender melhor a interação dos peptídeos com as vesículas, avaliamos a supressão da fluorescência do triptofano pela acrilamida. Estes estudos foram realizados de forma similar aos obtidos com as micelas. Comparando os valores da  $K_{sv}$  apresentados na tabela 6, podemos visualizar que todos os apagamentos obtidos nos vesículas foram menores do que em água. No entanto, os valores de  $K_{sv}$  indicam que o único peptídeo que apresentou alto grau de interação com as vesículas foi o “*wild type*”. Os demais peptídeos apresentaram altos valores de  $K_{sv}$  comparativamente ao “*wild type*” indicando pouca interação com as vesículas, ou ainda a região contendo o Trp está situada na superfície da vesícula, principalmente para o Hy-K<sup>9</sup>, que apresentou valores de  $K_{sv}$  próximos em solução e neste mimético de membrana.

A alta e baixa interação dos análogos com micelas e vesículas, respectivamente, pode ser explicada pela maior flexibilidade da micela. Neste modelo, a repulsão das cabeças polares existentes nos detergentes, faz com que o ângulo de interação entre estes monômeros seja maior, facilitando a interação dos peptídeos. Nas vesículas, a maior interação entre os ácidos graxos, propicia uma maior aproximação entre as cabeças polares,

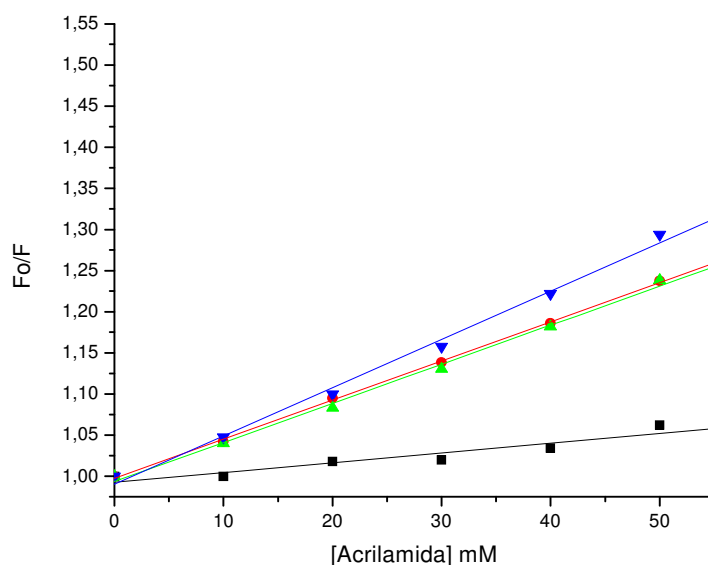
permitindo um maior empacotamento e uma maior rigidez, dificultando a penetração dos peptídeos.

**Tabela 6:** Valores de emissão de fluorescência do triptofano e das constantes de *Stern-Volmer* ( $K_{sv}$ ) das vesículas (PE:PA:PC), (SM: PA:PC) e em solução.

Peptídeos	$\lambda_{max}$ solução (nm)	$\lambda_{max}$ PE (nm)	$\lambda_{max}$ solução (nm)	$\lambda_{max}$ SM (nm)	$K_{sv}$ PE ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ SM ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ Solução ( $M^{-1}$ )
Hy-Wt	355	337	356	345	1,19	1,29	10,0
Hy-D-V <sup>5,16</sup>	357	350	357	353	4,75	5,96	9,0
Hy-D-V <sup>16</sup>	357	347	356	353	4,75	4,63	6,6
Hy-K <sup>9</sup>	359	353	355	353	5,86	7,0	7,3



**Figura 57:** Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V<sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V<sup>16</sup> (▲) e Hy-K<sup>9</sup> (▼) em vesículas de PE:PA:PC em pH 7,4. ( $F_0$ ) é a fluorescência inicial e ( $F$ ) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.



**Figura 58:** Supressão de fluorescência pela acrilamida dos peptídeos Hy-Wt (■), Hy-D-V<sup>5,16</sup> (●), Hy-D-V<sup>16</sup> (▲) e Hy-K<sup>9</sup> (▼) em vesículas de SM:PA:PC em pH 7,4. (Fo) é a fluorescência inicial e (F) fluorescência obtida para cada concentração de acrilamida.

#### 4.4.5. Permeabilização peptídeo/ vesícula

Para complementar os estudos anteriores, avaliamos a capacidade de lise de cada um dos peptídeos em função da composição da vesícula. Para isto, a permeabilização dos dois tipos de vesículas descritas anteriormente, isto é, com SM ou com DPPE, foi analisada na presença de cada um dos peptídeos. Nestes estudos o teor de lise foi acompanhado pela liberação de carboxifluoresceína (CF), um fluoróforo extrínseco, que quando liberado da vesícula, provoca um aumento da intensidade de fluorescência. A lise da vesícula causa a liberação do fluoróforo diluindo este composto e provocando o aumento da fluorescência. O aumento da intensidade de fluorescência e o tempo em que o máximo é atingido indicaram o grau de permeabilização da vesícula pelo peptídeo.

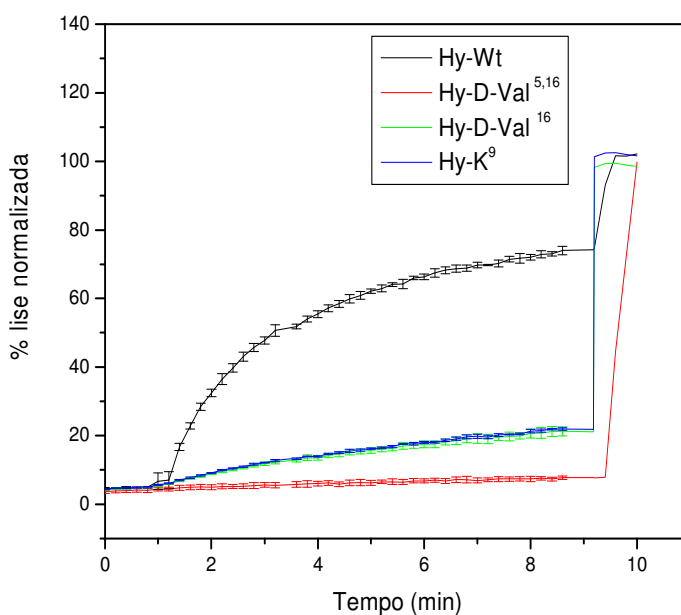
O mecanismo de liberação do corante induzida pelos peptídeos nas vesículas é do tipo tudo ou nada, ou as vesículas perdem todo o seu conteúdo ou não são afetadas (GREGORY, 2009).

A liberação máxima da CF, ou seja, a lise total da vesícula (100 %) foi obtida com o detergente triton em 9 minutos, sendo este valor utilizado para normalizar os experimentos.

Com o intuito de estabelecer um resultado mais eficiente, os experimentos foram realizados em triplicata e o erro calculado (figuras 59 e 60).

#### 4.4.5.1. Vesículas contendo PE

O peptídeo “*wild type*” foi o que apresentou maior capacidade de permeabilização em comparação aos seus análogos, com 72% da carboxifluoresceína liberada. Os peptídeos Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup>, apresentaram uma leve permeabilização das vesículas - 20%, enquanto o peptídeo Hy-D-V<sup>5,16</sup> quase não apresentou capacidade de permeabilização, com 6% de lise.



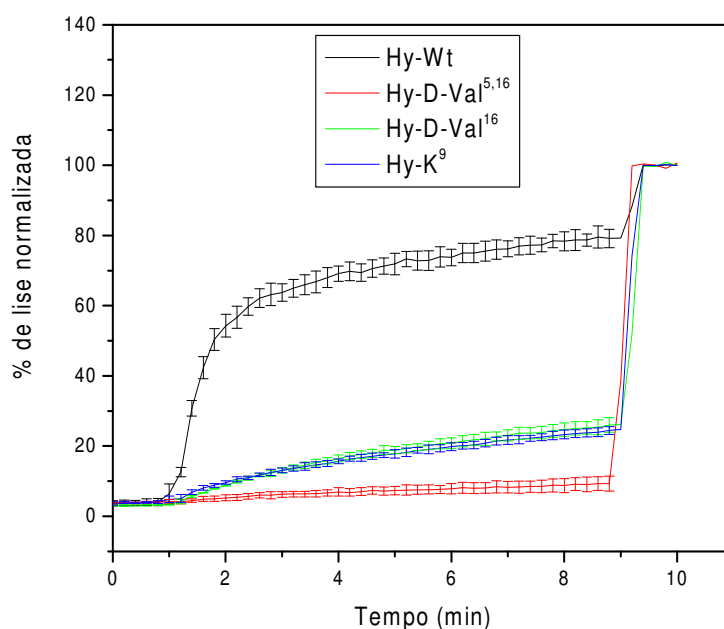
**Figura 59:** Liberação da carboxifluoresceína em vesículas de PE:PA:PC para 2 µM de peptídeos em função do tempo.

#### 4.4.5.2. Vesículas contendo SM

O peptídeo selvagem foi, da mesma maneira que o obtido para a vesícula contendo DPPE, o que apresentou maior lise, com aproximadamente 77%. Os seus análogos Hy-D-V<sup>16</sup> e Hy-K<sup>9</sup> mostraram 22% de permeabilização. O Hy-D-V<sup>5,16</sup>, semelhante aos experimentos com vesículas contendo PE, quase não apresentou lise, apenas 7%.

As comparações entre as duas vesículas, com o lipídeo de DPPE e a SM, indicaram que os peptídeos interagem da mesma forma nos dois tipos de vesículas. O único peptídeo que apresentou uma alta permeabilização foi o “*wild type*”. Os análogos tiveram pouca capacidade de permeabilizar estes modelos de membrana.

Estes estudos mostraram uma maior sensibilidade que os testes biológicos realizados na comparação entre as atividades dos peptídeos, mas mantendo de forma geral, os resultados obtidos, isto é, “*wild type*” > Hy-D-V<sup>16</sup> ~ Hy-K<sup>9</sup> > Hy-D-V<sup>5,16</sup>.



**Figura 60:** Liberação da carboxifluoresceína em vesículas de SM:PA:PC para 2 μM de peptídeos em função do tempo.

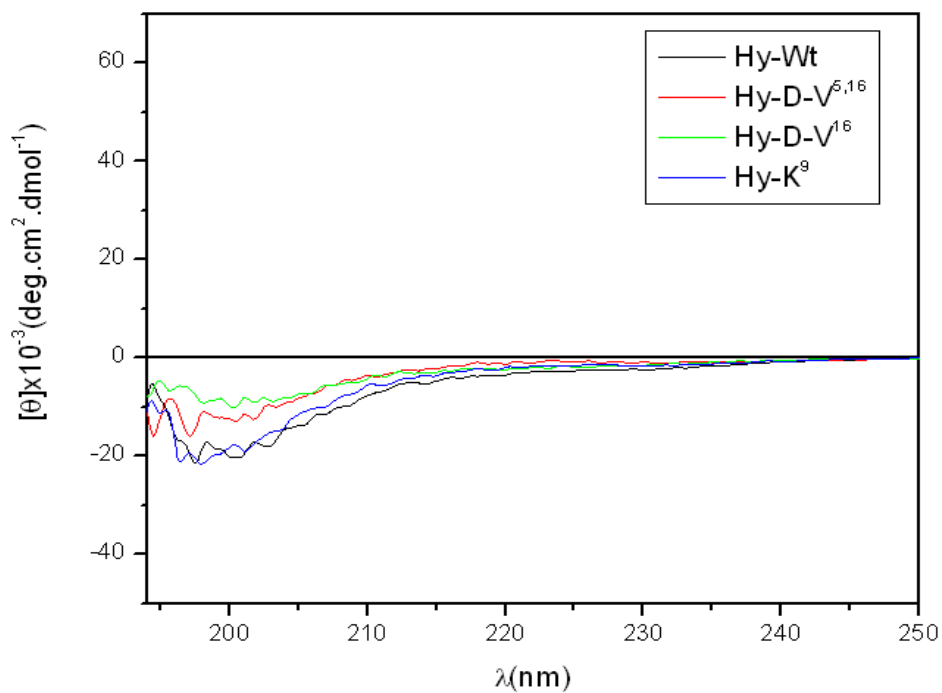
## 4.5. Dicroísmo circular

Para avaliar a relação estrutura/função e as modificações que estes peptídeos sofreram ao interagir com modelos de membrana foram estudadas as mudanças estruturais do “*wild type*” (Hy-Wt) e seus análogos, quando se altera o meio aquoso para um solvente conhecidamente estruturante (TFE) e para um mimético de membrana (LPC) (figuras 61, 62 e 63).

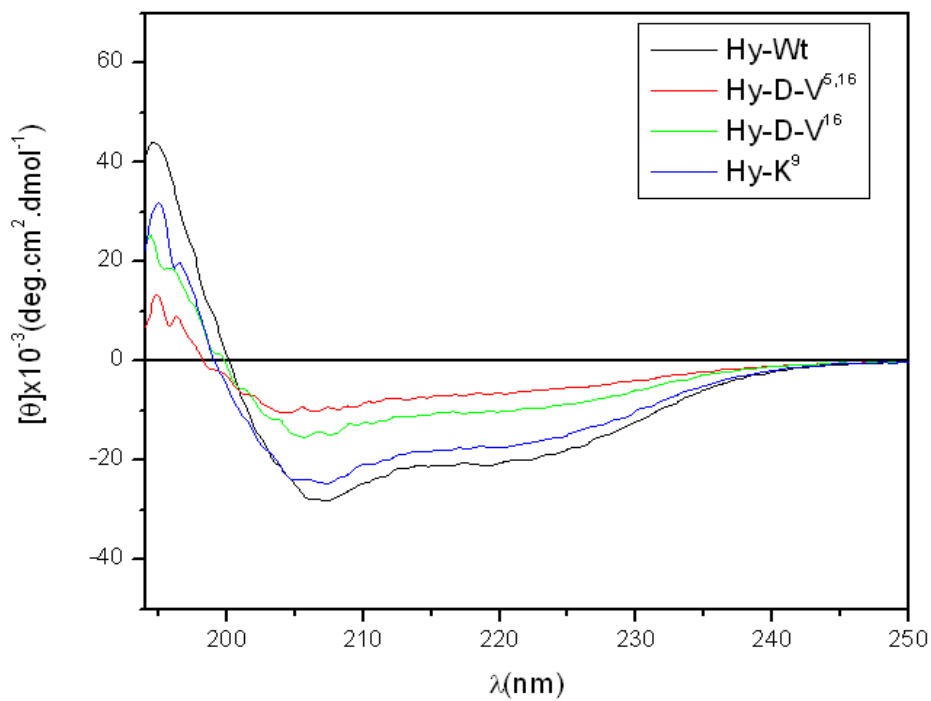
Nos dados obtidos em solução aquosa, os peptídeos não apresentaram uma estrutura secundária definida, ou seja, sua estrutura está ao acaso (“*random coil*”). Este tipo de resultado é indicado pela banda negativa em 202 nm.

Ao adicionar 60% de TFE ao meio foi observado que os peptídeos Hy-Wt, Hy-D-V<sup>16</sup>, Hy-K<sup>9</sup> e em menor intensidade o Hy-D-V<sup>5,16</sup> assumem estrutura em  $\alpha$ -hélice, caracterizada por duas bandas negativas, uma em 208 nm e outra em 222 nm, e uma banda positiva em 192 nm. Nos estudos com miméticos de membrana e utilizando micelas de LPC, os peptídeos também adquiriram estrutura em  $\alpha$ -hélice. Na avaliação dos espectros obtidos, pode-se notar uma diferença de absorção entre os estudos com TFE e LPC. Em TFE a banda em 208 nm foi mais intensa que em 222 nm, no entanto, em micelas a relação entre estas bandas foi menor, isto é, as absorções ficaram com intensidades próximas, indicando que os peptídeos estavam mais agregados.

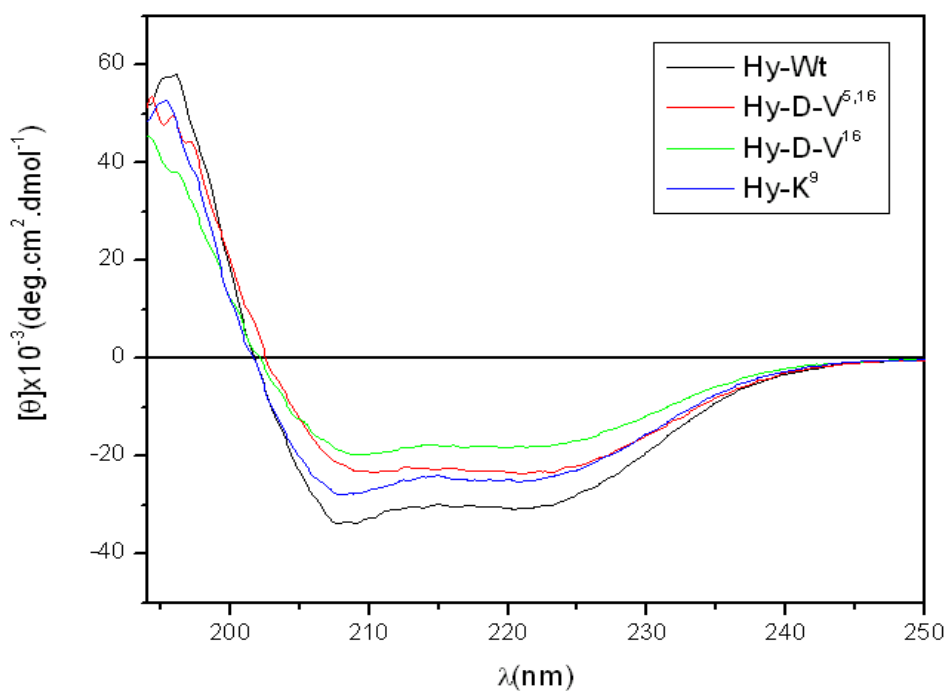
Os resultados obtidos nestes experimentos indicam que o mecanismo de ação do peptídeo aparentemente está relacionado com a sua estruturação em  $\alpha$ -hélice. O peptídeo “*wild type*”, foi o que apresentou maior atividade biológica e maior teor de  $\alpha$ -hélice. No entanto, para os demais peptídeos não foi possível verificar qualquer relação entre a estrutura obtida por CD e as atividades antimicrobianas e antifúngicas.



**Figura 61** Espectro de CD dos peptídeos em solução aquosa pH 7,4.



**Figura 62:** Espectro de CD dos peptídeos em TFE pH 7,4 .



**Figura 63:** Espectro de CD dos peptídeos em LPC pH 7,4.

## 5. Conclusões

Das informações apresentadas neste trabalho, podemos concluir que:

1. A estratégia para síntese de peptídeos em fase sólida através do protocolo Fmoc/tBu para obtenção dos peptídeos foi viável.
2. O processo de purificação através do HPLC mostrou ser eficiente viabilizando o material com um alto índice de pureza.
3. O processo de espectrometria de massas e análise de aminoácidos confirmou o sucesso dos peptídeos sintetizados.
4. Nos ensaios antimicrobianos, os peptídeos apresentaram atividades antibacterianas e antifúngicas contra todas os microorganismos testados. No entanto, todas as modificações causaram diminuição nestas atividades. Em alguns casos, as atividades antifúngicas foram as mesmas.

5. Os ensaios da atividade hemolítica mostraram que todos os peptídeos apresentaram atividade hemolítica, mas os análogos foram os que tiveram a mais baixa hemólise.
6. A comparação com os valores de atividade hemolítica com os de atividade antimicrobiana mostraram que os análogos possuem uma possibilidade de aplicação terapêutica maior, pois apresentaram diminuição na atividade hemolítica muito maior que na antibacteriana, isto é, a razão atividade antimicrobiana/atividade hemolítica maior.
7. As interações peptídeo/ mimético de membrana (LPC e SDS) indicam que todos os peptídeos interagem de modo similar com as micelas, sendo que em LPC esta interação foi maior que em SDS.
8. Nos estudos com as vesículas apenas o “*wild type*” mostrou uma interação mais eficiente. Este resultado em comparação com os obtidos em micelas, pode ser explicado pela maior rigidez deste tipo de modelo, dificultando a interação do peptídeo.
9. A comparação dos dados de interação dos peptídeos com as vesículas de PE e SM não mostrou diferenças significativas, mostrando que a natureza do lipídio não parece ser importante na especificidade do peptídeo.
10. Nos estudos de permeabilização, a maior lise foi obtida para o peptídeo “*wild type*”. Sendo que seus análogos apresentaram na mesma concentração um teor de lise menor. Estes resultados estão coerentes com os obtidos com as interações com vesículas, isto é, o peptídeo que mais interage é o que mais lisa.
11. Os experimentos com TFE e LPC, indicam que os peptídeos quando em meio aquoso, apresentam uma estrutura ao acaso e quando em presença do TFE e LPC passaram a uma estrutura em  $\alpha$ -hélice. No entanto, com exceção do “*wild type*” (maior teor de alfa hélice e mais atividade), não foi possível fazer uma relação entre o teor desta estrutura e a atividade biológica.

De um modo geral, não foi possível obter uma relação entre as atividades biológicas e os dados de interação e de conformação obtidos, mostrando que o mecanismo de ação destes peptídeos está longe de ser um tópico encerrado.

Acreditamos que as informações obtidas neste trabalho servirão como parâmetros para futuros estudos que buscam elucidar os mecanismos de ação deste tipo de peptídeo e na busca de novos fármacos. A identificação de novas moléculas capazes de atuar em sistemas biológicos pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais.

## Referências

- ALBERICIO, F. Editorial: current perspectives in peptide chemistry. I. Synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 99-100, 2000.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.
- APPONYI, M. A.; PUKALA, T. L.; BRINKWORTH, C. S.; MASELLI, V. A.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J.; BOOKER, G. W.; WALLACE, J. C.; JOHN, A.; SEPAROVIC, F.; DOYLE, J.; LLEWELLYN, L. E. Host-defense peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v. 25, n. 6, p. 1035-1054, 2004.
- AVRAHAMI, D.; SHAI, Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D, L- amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. **Biochemistry**, v. 42, p. 14946-14956, 2003.
- BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian Skin - a promising resource for antimicrobial peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 205-209, 1995.
- BENINCASA, M.; SCOCCHI, M.; PACOR, S.; TOSSI, A.; NOBILI, D.; BASAGLIA, G.; BUSETTI, M.; GENNARO, R. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 950-959, 2006.
- BOWIE, J. H.; WEGENER, K. L.; CHIA, B. C. S.; WABNITZ, P. A.; CARVER, J. A.; TYLER, M. J.; WALLACE, J. C. Host defense antibacterial peptides from skin secretions of Australian amphibians. The relationship between structure and activity. **Protein and Peptide Letters**, v. 6, n. 5, p. 259-269, 1999.
- CASTRO, M. S.; MATSUSHITA, R. H.; SEBEN, A.; SOUSA, M. V.; FONTES, W. Hylins: bombinins H structurally related peptides from the skin secretion of the Brazilian tree-frog *Hyla biobeba*. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 89, 2005.

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

CHEN, Y.; BARKLEY, M. D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976-9982, 1998.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13-1, p. 12316-12329, 2005.

DOURADO, F. S.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; MELO, J. A. T.; BLOCH, C. Jr.; SCHWARTZ, E. F. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. **Toxicon**, v. 50, p. 572-580, 2007.

EFTINK, M. R.; GUIRON, C. A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins-quantitative- determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-680, 1976.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochemistry et Biophysical Acta**, v. 1462, p. 11-28, 1999.

FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. **International Journal of Peptide & Protein Research**, v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GREGORY, M. S.; POKORNI, A.; ALMEIDA, F. F. P. Mangainin 2 Revisited: a test of the quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles. **Biophysical Journal**, v. 96, p. 116-131, 2009.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.

HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402-410, 2000.

JUBILUT, G. N.; CILLI, E. M.; TOMINAGA, M.; MIRANDA, A.; OKADA, Y.; NAKAIE, C. R. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 1089-1092, 2001.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595, 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 Peptide Research**, v. 36, n. 3, p. 255-266, 1990.

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

LIU, A. L. Advances in planar lipids bilayers and liposomes. In: LOHNER, K.; SEVCSIK, E.; PABST, G. **Liposome-based biomembrane mimetic systems: implications for lipid-peptide interactions**. San Diego: Academic Press, 2008. v. 6, 286 p.

LUDTKE, S. J.; HE, K.; HELLER, W. T.; HARROUN, T. A.; YANG, L.; HUANG, H. W. Membrane pores induced by magainin. **Biochemistry**, v. 35, n. 43, p. 13723-13728, 1996.

MACH, H.; MIDDGAUGH, C. R.; LEWIS, R. V. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 74-80, 1992.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, U.; MIRANDA, M. T. M. Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MALOY, W. L.; KARI, U. P. Structure-activity studies on magainins and other host-defense peptides. **Biopolymers**, v. 37, n. 2, p. 105-122, 1995.

MANGONI, M. L.; PAPO, N.; SAUGAR, J. M.; BARRA, D.; SHAI, Y. C.; SIMMACO, M.; RIVAS, L. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**, v. 45, n. 35, p. 11361-11368, 1996.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11361-11368, 1996.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149, 1963.

MORAIS, L. G. M.; FAZIO, A. M.; VIEIRA, R. F. F.; NAKAIE, R. C.; MIRANDA, M. T. M.; SCHREIER, S.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1768, p. 52-58, 2007.

MOTTA, A. S. **Produção de substâncias bioativas de origem natural e avaliação de seu efeito sobre fungos fitopatogênicos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Projeto E & T- a5). Disponível em: < [http://www.amazonia.desenvolvimento.gov.br/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=14](http://www.amazonia.desenvolvimento.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=14) >. Acesso em: 10 nov. 2008.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 2006.

NICOLAS, P.; VANHOYE, D.; AMICHE, M. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 24, p. 1669-1680, 2003.

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 clupectoxism. **Toxicon**, n. 37, p. 55-65, 1999.

OREN, Z.; SHAI, Y. Cyclization of a cytolytic amphipathic alpha-helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. **Biochemistry**, v. 39, p. 6103-6114, 2000.

PAPO, N.; OREN, Z.; PAG, U.; SAHL, H. G.; SHAI, Y. The consequence of sequence alteration of an amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide and its diastereomers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 33913-33921, 2002.

PRATES, M. V.; SFORÇAN, M. L.; REGIS, W. C. B.; LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. S.; PERTINHEZ, T. A.; ARAÚJO, A. L. T.; AZEVEDO, R. B.; SPISNI, A.; BLOCH, C. Jr. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13.018-13.026, 2004.

PENNINGTON, M. W.; DUNN, B. M. Peptide synthesis protocols. In: \_\_\_\_\_ . (Ed.). **Methods in biology molecular**. Totowa: John M. Walker, 1994. v. 35, 321 p.

REYES, L. F. **Estudos funcionais e estruturais da proteína recombinante humana UBE2G2 (Ubiquitin)- conjugation enzyme E2G2**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução)- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

SANTOS, C. N.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6 B, p. 1181-1185, 2002.

SAMUELSEN, O.; HAUKLAND, H. H.; KAHL, B. C.; VON EIFF, C.; PROCTOR, R. A.; ULVATNE, H.; SANDVIK, K.; VORLAND, L. H. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1126-1129, 2005.

SCHIFFER, M.; EDMUNDSO, A. B. Use of Helical Wheels to represent structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysical Journal**, v. 7, n. 2, p. 121, 1967.

SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 11, 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. **Biochemical et Biophysical Acta, Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 55-70, 1999.

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

STAFFORD, R. E.; FANNI, T.; DENNIS, E. A. Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids. **Biochemistry**, n. 28, p. 5113-5120, 1989.

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