UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

LARISSA ANASTÁCIO DA COSTA CARVALHO

**Hemocidina sintética Hb40-61a: estudo das
propriedades, mecanismo de ação e interação
com nanopartículas poliméricas**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

02/10/2012

LARISSA ANASTÁCIO DA COSTA CARVALHO

**Hemocidina sintética Hb40-61a: estudo das
propriedades, mecanismo de ação e interação
com nanopartículas poliméricas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas (Bioquímica)*

Orientadora: Profª Dra. Maria Teresa Machini

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Carvalho, Larissa Anastácio da Costa
C837h Hemocidina sintética Hb40-61a : estudo das propriedades,
mecanismo de ação e interação com nanopartículas poliméricas /
Larissa Anastácio da Costa Carvalho. -- São Paulo, 2012.
104p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Machini, Maria Teresa

1. Peptídio : Bioquímica I. T. II. Machini, Maria Teresa,
orientador.

574.192456 CDD

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família pela oportunidade e incentivo, principalmente à minha mãe Sonia e ao meu pai Luís por todo esforço, apoio, carinho e sacrifícios que fizeram por mim.

À pessoa especial que é o Alexandre por sempre ter acreditado em mim, pela paciência, carinho e apoio que tanto me dedicou.

À Profa. Dra. Maria Teresa Machini pela orientação, amizade, oportunidade e ensinamentos.

Ao Dr. César Remuzgo pela amizade, colaboração e ensinamentos.

Ao Dr. Cleber Liria pela amizade, auxílio e ensinamentos.

Às Profas. Dras. Ana Maria Carmona Ribeiro, Iolanda M. Cuccovia e Kátia R. Perez pela amizade, colaboração e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório Rita Tokikawa, Jéssica Roxo, Thiago Freire, Vitor Ungaro, Vinícius Millie, Janaína Rosa, Thiago Lopes e Marcos Sulca pelos momentos de descontração, apoio e amizade.

À Doris D. Araújo pela amizade, carinho e conselhos.

Aos professores do Depto. de Bioquímica do IQ-USP que me permitiram o uso de seus equipamentos: Profa. Dra. Regina Baldini, Profa. Dra. Carla Columbano, Prof. Dr. Pio Colepicolo e Prof. Dr. Sandro Marana. E aos professores da FCF-USP que doaram os microrganismos com os quais trabalhei: Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka e Prof. Dr. Sandro Rogerio de Almeida.

À Adriana e ao Wilton da Central Analítica.

À Profa. Dra. Maria Cecília B. S. Salvadori e sua técnica especialista Fernanda de Sá Teixeira pelo serviço de microscopia de força atômica prestado.

Aos Profs. do Depto. de Bioquímica do IQ-USP que contribuíram para minha formação.

Ao Prof. Dr. João H. G. Lago, meu orientador de IC, por ter me iniciado e guiado tão bem para a carreira científica.

À Secretaria de Pós Graduação e aos funcionários do IQ-USP.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP e CNPq pelo financiamento.

"I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale."

Marie Curie

RESUMO

Carvalho, L. A. C. **Hemocidina sintética Hb40-61a: estudo das propriedades, mecanismo de ação e interação com nanopartículas poliméricas**. 2012. 104p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O aumento na incidência de infecções fúngicas e a alta toxicidade ou elevado índice de resistência associado aos antimicóticos comerciais, criou um mercado carente de novas drogas. Neste contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) surgem como uma alternativa promissora ou fonte de conhecimento por desempenhar ação inibidora de crescimento e/ ou letal contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, parasitas e/ ou vírus, além de atividade antitumoral e efeito imunomodulador. Como os mecanismos pelos quais eles o fazem são diferentes daqueles das drogas não peptídicas, os AMPs estão pouco associados ao desenvolvimento de resistência microbiana. A hemoglobina (Hb) é uma fonte de peptídeos com funções biológicas diversas. O fragmento 33-61 (Hb33-61) da cadeia α da Hb bovina foi o primeiro AMP descrito a ser gerado *in vivo* no trato gastrointestinal do carrapato *Boophilus microplus*. Nossos estudos posteriores usando CD e ^1H -RMN revelaram que a amidação C-terminal deste fragmento o tornava ainda mais ativo que o primeiro e que em presença de micelas de SDS o Hb33-61a apresenta uma dobra β na porção N-terminal (Lys⁴⁰-Phe⁴³) e outra (Ser⁴⁹-Ser⁵²) seguida de α -hélice no C-terminal (Ala⁵³-Ala⁶⁰), bem como um segmento Pro⁴⁴-Leu⁴⁸ capaz de mover-se independentemente e agir como uma dobradiça. Nossas investigações usando análogos sintéticos truncados do Hb33-61a mostraram que o Hb40-61a poderia ser sua porção mínima ativa por apresentar comportamento conformacional idêntico. Nossos estudos subsequentes enfocando as suas propriedades evidenciaram a sua capacidade de causar morte rápida de cepas de *Candida*, incluindo *C. albicans* resistentes ao fluconazol e extravasamento de conteúdo e formação de poros em LUVs, revelando sua ação permeabilizante de membrana. Em continuidade ao estudo do Hb40-61a, investigamos no presente trabalho as suas propriedades e o seu mecanismo de ação contra *C. albicans*. Para isso, sintetizamos, purificamos e caracterizamos esta hemocidina, o seu análogo

inteiro composto por D aminoácidos (*ent*-Hb40-61a) e o seu análogo marcado com 5 (6) carboxifluoresceína (FAM-Hb40-61a). Ensaios com eritrócitos humanos confirmaram a baixa atividade hemolítica desses AMPs em meio de alta e baixa força iônica. O análogo *ent*-Hb40-61a apresentou a mesma atividade antifúngica que o análogo L, evidenciando um mecanismo de ação não-estereoespecífico. Análises de células de *Candida* tratadas com FAM-Hb40-61a por microscopia confocal mostraram que em $\frac{1}{2}$ MIC e MIC o peptídeo deposita-se na membrana plasmática e é internalizado, respectivamente. Citometria de fluxo demonstrou que na MIC cerca de 97% das células encontram-se marcadas pelo peptídeo, confirmou a influência negativa da alta força iônica em sua atividade, mostrou que a internalização celular na MIC é independente da temperatura e que a alteração no metabolismo energético da célula afeta de maneira negativa a internalização do peptídeo. Ensaios de permeabilidade celular com Syto 09 e iodeto de propídeo confirmaram danos progressivos à membrana plasmática de *C. albicans* com o aumento da concentração do Hb40-61a. Experimentos usando DiBAC₄(5) e de DPH revelaram que o Hb40-61a altera o potencial de membrana e afeta sua fluidez, respectivamente. Imagens preliminares das células tratadas e não tratadas com Hb40-61a por microscopia de força atômica (AFM) sugeriram alterações nas células de *C. albicans* após tratamento com a hemocidina. Medidas preliminares do diâmetro médio das células de *C. albicans* revelaram que elas diminuem após o tratamento com o peptídeo, o que pode ser mais um indício de dano à membrana plasmática por formação de poros e extravasamento de conteúdo intracelular. Assim, obtivemos fortes indícios de que o alvo do Hb40-61a é, de fato, a membrana plasmática das células de *Candida*, de que ele apresenta potencial de uso tópico para tratamento de candidíase e pode servir como modelo para o desenho de novas drogas antimicrobianas, peptídicas ou não, com propriedades ainda mais valiosas e índices terapêuticos mais elevados. Testes preliminares mostraram que é possível a adsorção do Hb40-58a à nanopartículas de PSS e que, em relação ao peptídeo livre, este arranjo mantém a atividade antifúngica com MIC superior e apresenta menor atividade hemolítica.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, *Candida*, candidíase, modo de ação, nanopartículas.

ABSTRACT

Carvalho, L. A. C. **Synthetic hemocidin Hb40-61a: study on its proprieties, mechanism of action and interactions with polymeric nanoparticles.** 2012. 104p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The increased incidence of fungal infections and the high toxicity or high level of resistance associated with conventional antimycotics created a demand for new drugs. Antimicrobial peptides (AMPs) constitute a promising alternative and/or an important source of knowledge due to their growth inhibitory action and/or lethality against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, parasites and/or viruses. Besides, AMPs display antitumoral and immunomodulator effects. As their mechanisms of action are different from those of non-peptide drugs, AMPs are less associated with the development of antimicrobial resistance. Hemoglobin (Hb) is a source of peptides with diverse biological functions. The fragment 33-61 (Hb33-61) of bovine Hb α chain was the first AMP reported to be generated *in vivo* in gastrointestinal tract of *Boophilus microplus*. Our studies of Hb33-61 using CD and ^1H -NMR showed that amidation of its C-terminal (Hb33-61a) increases its activity; in the presence of SDS micelles, Hb33-61a is characterized by a central hinge joining the C-terminal region (containing a β turn followed by a helical element) to the N-terminal region (that presents only a β turn). Our previous investigations using synthetic truncated analogues of Hb33-61a suggested that Hb40-61a could be its minimal active portion as it presented equal biological and structural properties. Our subsequent studies focusing on its properties showed its ability to quickly kill *Candida albicans* strains (including those resistant to fluconazole) and to cause leakage of the contents of LUVs and pore formation in GUVs, revealing its membrane permeabilizing action. We further investigated the properties of Hb40-61a and its possible mechanism of action against *C. albicans*. To do it, we synthesized, purified and chemically characterized it, its all-D analogue (*ent*-Hb40-61a) and its analogue labeled with 5 (6) carboxyfluorescein (FAM-Hb40-61a). Tests using human erythrocytes confirmed the low toxicity of these hemocidins at high or low ionic strength. The *ent*-analogue was as active as the all-L compound suggesting a non-

stereospecific mechanism of action. Confocal microscopy analysis of *Candida* cells treated with FAM-Hb40-61a showed that at $\frac{1}{2}$ MIC and MIC, the peptide deposits on the plasma membrane and is internalized, respectively. Flow cytometry results showed that at the MIC about 97% of the cells are marked by the peptide, confirmed the negative influence of high ionic strength on its antifungal activity and showed that the cellular internalization at the MIC is partially dependent on ATP, but independent on the temperature. Cell permeabilization assays using Syto 09 and propidium iodide confirmed progressive damage of the membrane as a function of Hb40-61a concentration. Experiments employing DiBAC₄ (5) and DPH revealed that the Hb40-61a alters the membrane potential and affects its fluidity, respectively. Preliminary atomic force microscopy (AFM) images of *C. albicans* cells before and after treatment with Hb40-61a suggested morphological changes in the plasma membrane. Preliminary measurements of the average diameters of the fungal cells indicated size reduction after treatment with the Hb40-61a probably resulting from pore formation and leakage of cell contents. Thus, we obtained strong evidences that the target of this peptide is indeed the plasma membrane of *Candida* cells. Thus, this hemocidin have the potential to be used topically for treating candidiasis and/or serve as model for the design of new antimicrobial drugs, peptide or non-peptide, with even more valuable properties and improved therapeutic indexes. Preliminary tests confirmed the possibility of adsorbing Hb40-58a to nanoparticles of polystyrene sulfate (PSS) and that resulting assembly is still active and less hemolytic than the free peptide.

Keywords: antimicrobial peptides, *Candida*, candidiasis, mechanism of action, nanoparticles.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Código de uma e três letras para os vinte aminoácidos usuais

A	Ala	alanina	M	Met	metionina
C	Cys	cisteína	N	Asn	asparagina
D	Asp	ácido aspártico	P	Pro	prolina
E	Glu	ácido glutâmico	Q	Gln	glutamina
F	Phe	fenilalanina	R	Arg	arginina
G	Gly	glicina	S	Ser	serina
H	His	histidina	T	Thr	treonina
I	Ile	isoleucina	V	Val	valina
K	Lys	lisina	W	Trp	triptofano
L	Leu	leucina	Y	Tyr	tirosina

¹H-RMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ACN	acetonitrila
But	<i>t</i> -butila
Bzl	benzila
BOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônico
CD	dicroísmo circular
CLEAR amida	<i>Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin</i>
DCM	diclorometano
DIC	1,2-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DIBAC₄ (5)	ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico) pentametina oxonol
DPH	1,6 difenil 1, 3, 5 hexatrieno
DNP	dinitrofenol
EDT	1,2-etanoditiol
FAM	5 (6) carboxifluoresceína
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	9- fluorenilmetoxycarbonila
GS	grau de substituição
GUVs	vesículas unilamelares gigantes
HF	Fluoreto de hidrogênio
HOBt	N-hidroxibenzotriazola
IGP	tampão de fosfato isotônico
LC/ESI-MS	Cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrômetro de massas (fonte de ionização por <i>electrospray</i>)
LUVs	vesículas unilamelares grandes
MeOH	metanol
MIC	mínima concentração inibitória
NMP	N-metilpirrolidona
OBu^t	éster <i>t</i> -butílico
PBS	tampão fosfato de sódio
PDB	<i>potato dextrose broth</i> (caldo de dextrose de batata)
PS	poliestireno
PSS	sulfato de poliestireno
Rink amida	resina 4-(2', 4'-Dimetoxifenilaminometil)-fenoximetila
RP-HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida
<i>t</i>-Boc	<i>terc</i> -butiloxycarbonila
TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio
TEA	triethylamina
TEAP	fosfato de triethylamina
TFA	ácido trifluoroacético (mistura H ₃ PO ₄ /TEA)
TIS	triisopropilsilano
TN	teste de ninidrina
trt	Tritila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Resistência associada às drogas antifúngicas comerciais	15
1.2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e/ ou Antifúngicos	17
1.2.1 Características gerais dos AMPs	17
1.2.2 Mecanismos de ação dos AMPs	21
1.2.3 Potencialidades e Dificuldades de uso de AMPs na terapêutica	25
1.2.4 Hemocidinas	26
1.2.5 Hemocidinas sintéticas derivadas do fragmento 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina	27
1.3 Síntese em fase sólida (SPFS), purificação e caracterização química de peptídeos	34
1.3.1 Clivagem do peptídeo da resina e desproteção total	36
1.3.2 Purificação e caracterização de peptídeos	37
1.4 Nanopartículas poliméricas em sistemas de <i>drug delivery</i>	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Materiais	41
3.2. Métodos preparativos	42
3.2.1 Síntese de peptídeos	42
3.2.2 Marcação com FAM	43
3.2.3 Clivagem e desproteção total das peptidil-resinas	43
3.2.4 Purificação dos peptídeos brutos	44
3.3 Métodos analíticos e de caracterização dos peptídeos	45
3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)	45
3.3.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)	46
3.3.3 Hidrólise total e análise de aminoácidos	46
3.4 Ensaios Biológicos	46
3.4.1 Atividade antifúngica	46
3.4.2 Atividade antibacteriana	47
3.4.3 Atividade antifúngica em meio tamponado	47
3.4.4 Atividade fungicida	47
3.4.5 Ensaio hemolítico	48
3.4.6 Análises por microscopia confocal de varredura a laser	49

3.4.7 Análises por <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS).....	49
3.4.8 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> por Hb40-61a.....	51
3.4.9 Análise por FACS para potencial de membrana plasmática de <i>C. albicans</i>	51
3.4.10 Medida da fluorescência da membrana plasmática de <i>C. albicans</i>	52
3.4.11 Análise por microscopia de força atômica (AFM).....	52
3.5 Ensaio com recobrimento de nanopartículas aniônicas de PSS com o AMP catiônico Hb40-58a.....	52
3.5.1 Preparação das dispersões de PSS e do arranjo PSS-Hb40-58a.....	52
3.5.2 Determinação da distribuição de tamanho, diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PSS livres e do arranjo PSS-Hb40-58a.....	53
3.5.3 Atividade antifúngica do PSS-Hb40-58a.....	54
3.5.4 Ensaio hemolítico do PSS-Hb40-58a.....	54
3.5.5 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> por Hb40-58a e PSS-Hb40-58a.....	54
3.5.6 Medidas preliminares do diâmetro médio de <i>C. albicans</i> antes e após tratamento com AMPs.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos.....	55
4.1.1 Considerações gerais.....	55
4.1.2 Peptídeo KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂ (Hb40-61a).....	55
4.1.3 Peptídeo FAM-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂ (FAM-Hb40-61a).....	60
4.1.4 Peptídeo D-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂ (<i>ent</i> -Hb40-61a).....	60
4.2 Bioensaios.....	60
4.2.1 Atividade antibacteriana.....	60
4.2.2 Atividade antifúngica.....	66
4.2.3 Atividade antifúngica em meio tamponado.....	68
4.2.4 Atividade fungicida.....	69
4.2.5 Efeito da força iônica do meio na atividade dos peptídeos estudados.....	69
4.2.6 Ensaio hemolítico.....	70
4.2.7 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> por Hb40-61a.....	72
4.2.8 Ação antifúngica do FAM-Hb40-61a monitorada por microscopia confocal	

de varredura a laser.....	72
4.2.9 Análise por <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS) da ação do FAM-Hb40-61a.....	74
4.2.10 Capacidade do Hb40-61a de alterar o potencial de membrana plasmática de <i>C. albicans</i>	76
4.2.11 Medida da fluorescência da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> tratada com Hb40-61a.....	78
4.2.12 Análise topográfica das células de <i>C. albicans</i> expostas ao Hb40-61a.....	79
4.3 Ensaios com recobrimento de nanopartículas aniônicas de PSS com o AMP catiônico Hb40-58a.....	80
4.3.1 Determinação da distribuição de tamanho, diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PSS livres e do arranjo PSS-Hb40-581a.....	80
4.3.2 Atividade antifúngica do PSS-Hb40-58a.....	84
4.3.3 Ensaio hemolítico para PSS-Hb40-581aa.....	84
4.3.4 Ensaio de permeabilização de membrana plasmática de <i>C. albicans</i> por PSS-Hb40-58a.....	85
4.3.5 Medidas preliminares do diâmetro médio de <i>C. albicans</i> antes e após tratamento com AMPs.....	87
5. CONCLUSÕES.....	89
6. REFERÊNCIAS.....	90

1. Introdução

1.1 Resistência Associada às Drogas Antifúngicas Comerciais

A resistência antifúngica pode ser definida como microbiológica ou clínica. A microbiológica ocorre quando se inibe o microrganismo com uma concentração de droga um pouco maior do que a utilizada em cepas selvagens. A clínica é associada à falha no tratamento, já que a dose necessária para inibição é muito maior do que a definida como segura para o composto (PFALLER, 2012).

Nos últimos anos, o uso indiscriminado de agentes antifúngicos, levou ao aumento do número de organismos tolerantes às drogas em dosagens terapêuticas. Tal fato representa um grave risco às pessoas imunocomprometidas, como os portadores do vírus HIV, os pacientes em tratamento quimioterápico, aqueles que receberam transplantes de órgãos e os recém-nascidos, uma vez que as doenças causadas por fungos são a maior causa de morbidade e mortalidade desses indivíduos (KANAFANI e PERFECT, 2008). Além disso, tal fato tem impacto econômico mundial: em 2008, a estimativa era que, nos Estados Unidos, gastava-se cerca de US\$ 4-7 bilhões de dólares/ ano no tratamento de pacientes com infecções por microrganismos resistentes (REACT, 2008). Em pesquisa feita em 2011 no mesmo país, foi demonstrado que um paciente com infecção fúngica invasiva custa cerca de US\$ 55 mil a mais do que um paciente internado sem a doença (MENZIN *et al.*, 2011).

A maioria dos fungos que causam doenças em seres humanos apresenta baixa virulência e são contidos pelo próprio sistema imune. Um exemplo é o comensal *Candida albicans*, que está presente na microbiota natural, na mucosa da boca e no sistema reprodutor feminino. Sendo um patógeno oportunista, torna-se virulento quando seu hospedeiro encontra-se imunocomprometido (KANAFANI e PERFECT, 2008). Essa deficiência no sistema imune pode ocasionar infecções superficiais, localizadas (candidíase) e sistêmicas (candidemia).

A candidemia é a apresentação sistêmica da patogenicidade do gênero mais preocupante. Trata-se da quarta causa mais comum de infecção sanguínea nosocomial (ZILBERBERG *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2012) e é responsável por índices de mortalidade de até 40% no mundo. No Brasil, esse valor chega a 61%. Esses números ultrapassam os índices de mortalidade causados por infecções bacterianas e, por isso, requerem maior preocupação. Além disso, o número de

infecções fúngicas no Brasil é cerca de 2 a 8 vezes maior do que nos Estados Unidos e na Europa (COLOMBO *et al.*, 2007; ROSSI, 2011).

Não apenas a utilização irresponsável e a falta de hábitos higiênicos (para não disseminação de doenças), mas também a limitação na escolha da droga acarreta a resistência microbiana às drogas antibióticas. Os obstáculos no desenvolvimento de novas drogas se dão principalmente por dois motivos: (1) falta de incentivo da indústria farmacêutica que não vê nos antifúngicos um mercado lucrativo e; (2) dificuldade em encontrar drogas que não compartilhem rotas ou intermediários metabólicos com os hospedeiros e possam ser eficazes sem serem tóxicos (MCGOWAN, 2001).

Atualmente, ao contrário das infecções bacterianas, as fúngicas são combatidas por poucas opções de drogas disponíveis no mercado. São elas: (1) os azóis e os triazóis (miconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol); (2) os polienos (nistatina e anfotericina B); (3) a flucitosina (5-fluorocitosina) e; (4) as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (PERLIN, 2010). A **Tabela 01** apresenta algumas informações sobre essas classes, sendo que as mais utilizadas são o fluconazol e a anfotericina B.

Tabela 01. As quatro classes de antifúngicos disponíveis atualmente.

Classes	Mecanismo de Ação	Mecanismo de Resistência
Azóis e Triazóis	Inibição não-competitiva da enzima lanosterol 14 α-desmetilase , responsável pela síntese de ergosterol.	Efluxo celular ativo para expulsão da droga, mutações no gene <i>ERG11</i> (lanosterol 14 α -desmetilase), superexpressão da enzima e/ou substituição do ergosterol por 14- α -metilfecosterol. ^a
Polienos	Interações hidrofóbicas com o ergosterol para formação de poros e danos oxidativos.	Alterações qualitativas ou quantitativas de ergosterol na membrana. ^a
Flucitosina	Inibição da replicação do DNA e síntese proteica .	Mutações nos genes <i>FCY2</i> (citosina permease), <i>FCY1</i> (citosina deaminase) ou <i>FUR1</i> (uracil fosforibosiltransferase). ^b
Equinocandinas	Inibição não-competitiva da enzima $\beta(1,3)$-glucana sintase , responsável pela síntese de $\beta(1,3)$ -glucana, parte da parede celular.	Efluxo celular ativo para expulsão da droga, mutações no gene <i>Fsk1</i> ($\beta(1,3)$ -glucana sintase) e/ou superexpressão da enzima. ^a

^a(KANAFANI and PERFECT., 2008) e ^b(PAPON *et al.*, 2007).

1. 2. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e/ou Antifúngicos

Somos constantemente bombardeados por inúmeras espécies de microrganismos capazes de nos causar doenças. Este fato chamou a atenção de pesquisadores que evidenciaram em nosso corpo um sistema imune inato adaptativo capaz de enfrentar tal problema. Fazem parte desta imunidade inata os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que são rapidamente mobilizados para neutralizar um amplo espectro de micróbios (PETERS, 2010; PERLIN 2010).

O primeiro relato desta existência se deu em 1980 com AMPs isolados e caracterizados da hemolinfa de mariposa (*Hyalophora cecropia*): as cecropinas (HULTMARK *et al.*, 1980). Um ano depois, as α -defensinas também foram isoladas e caracterizadas de leucócitos de mamíferos (PATTERSON-DELAFIELD *et al.*, 1981). Nos humanos, os AMPs inatos mais proeminentes são as catelicidinas e defensinas, produzidas pelas células do sistema imune e as histatinas, produzidas e secretadas na saliva pelas glândulas salivares (PETERS, 2010).

Dessa maneira, a importância dos AMPs tem sido relacionada à sua presença no sistema imune inato dos organismos vivos, pois tem se mostrado efetivos contra o câncer (HANCOCK e ROZEK, 2002; HOSKIN e RAMAMOORTHY, 2008), vírus, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e apresentando efeito imunomodulador (HANCOCK, 2005). Além do mais, eles são capazes de matar cepas resistentes a diferentes drogas comerciais, o que tem lhes proporcionado ainda maior destaque e despertado grande interesse clínico (PETERS, 2010).

Segundo Cederlund e colaboradores, até 2011, mais de 1700 AMPs haviam sido identificados em fontes naturais variadas ou previstos através das sequências de genes que os codificam (CEDERLUND *et al.*, 2011). Embora este número seja alto e haja uma vasta diversidade de sequências existentes, algumas características entre os AMPs são compartilhadas.

1.2.1 Características gerais dos AMPs

Em sua maioria, os AMPs possuem cadeia peptídica pequena (12-50 aminoácidos), carga líquida positiva (+2 a +9) e estrutura anfipática (LAI e GALLO, 2009) com aproximadamente 50% de resíduos hidrofóbicos (MARR *et al.*, 2006). Estas condições são fundamentais para a sua atividade no processo de permeabilidade da membrana celular, já que entre as etapas iniciais de seus mecanismos de ação, há a atração eletrostática aos fosfolipídios carregados

negativamente e sua hidrofobicidade auxilia em sua inserção e comprometimento da membrana celular (CEDERLUND *et al.*, 2011).

Os AMPs podem apresentar estruturas de α -hélice, folha β , estruturas extendidas e/ou *loop* (LAI e GALLO, 2009), como mostra a **Figura 01**. A diversidade estrutural dos AMPs encontrados na natureza é ponto de partida para a produção de peptídeos derivados e artificiais mais potentes que apresentem as atividades biológicas desejadas para aplicações clínicas (NIJNIK e HANCOCK, 2009).

Figura 01. Estruturas de peptídeos antimicrobianos (AMPs). (A) AMPs que formam α -hélice (magainina 2); (B) AMPs compostos por uma série de folhas β (β -defensina 1); (C) AMPs que adotam estrutura extendida (indolicidina) e; (D) AMPs que possuem estrutura em loop (gramicidina) (Adaptado de PETERS *et al.*, 2010).

Uma diferença marcante dos AMPs em relação aos antibióticos convencionais é o fato da rápida atividade bactericida em concentrações próximas ou iguais às MICs (mínimas concentrações inibitórias) (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2001), o que dificulta o surgimento da resistência microbiana. Além disso, alguns AMPs, em concentrações superiores às MICs, chegam a matar 99,999% das bactérias em 5 minutos (STEINBERG *et al.*, 1997).

Acredita-se que alguns AMPs sejam seletivos: capazes de matar apenas os microrganismos e apresentar baixa toxicidade para as células do hospedeiro. De fato, por fazerem parte da imunidade inata, espera-se este comportamento. É o caso da magainina 2, isolada da pele do sapo africano *Xenopus laevis*, que apresenta MIC na faixa de 2-50 μ M contra bactérias e causa apenas 50% de hemólise em eritrócitos humanos com 1000 μ M (MATSUZAKI, 2009).

Esta seletividade decorre da interação preferencial de AMPs catiônicos anfipáticos com superfícies negativas e/ou hidrofóbicas. Fungos e bactérias são dotados de uma estrutura extracelular que mantém sua integridade estrutural e lhes confere proteção contra danos mecânicos e estresse osmótico, a chamada parede celular. Sua composição varia de acordo com o organismo, mas para todos eles ela age como uma barreira protetora. Dessa forma, fica evidente que para exercer sua

atividade antimicrobiana, no caso dos AMPs que tem como alvo a membrana plasmática, eles devem ser capazes de interagir e ultrapassar a parede celular e alcançar seu alvo: a bicamada lipídica.

As paredes celulares bacterianas contêm moléculas aniônicas, atrativas aos AMPs, como lipopolisacarídeos (Gram-negativas), ácido teicóico e lipoteicóico na camada de peptídeoglicanos (Gram-positivas; MATSUZAKI, 2009). Ela desempenha papel importante na eficácia dos AMPs, pois já foi demonstrado que *Staphylococcus aureus* aumenta a carga positiva de sua parede celular para repelir AMPs como as protegrinas (PESCHEL *et al.*, 1999). Estudos de microscopia eletrônica mostraram também que a ação inibitória de uma série de AMPs pode ser parcialmente explicada pelos efeitos na parede celular, como quebras em sua estrutura, desintegração, afinamento e septação anormal (HARRIS *et al.*, 2009). As membranas plasmáticas bacterianas também são carregadas negativamente, uma vez que são ricas em fosfolipídeos ácidos, como fosfatidilglicerol e cardiolipina. Já foi comprovado que bactérias com maior quantidade de cargas negativas em suas membranas são mais suscetíveis à magainina 2 (MATSUZAKI *et al.*, 1997).

Esta seletividade celular também ocorre com leveduras como a *Candida albicans*, já que sua membrana plasmática contém ligações fosfodiésteres em abundância (**Figura 02**), o que confere carga líquida negativa à célula em pH fisiológico e propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas à superfície celular. Sua parede celular é rica em manoproteínas contendo cadeias longas e ramificadas com ligações *N*-glicosídicas entre resíduos manosil e cadeias menores e lineares de manana unidas por ligações *O*-glicosídicas, que constituem cerca de 30-40% do peso seco da parede celular (KLIS *et al.*, 2001), além de conterem quitina e cadeias β -1,3 e β -1,6 glicanas. Novamente fica evidente a importância da parede celular por um estudo que demonstrou que no caso da *Saccharomyces cerevisiae* a perda de manosilfosfato causa uma drástica redução de cargas negativas, impossibilitando as células de interagir com o marcador fluorescente carregado positivamente *Alcian Blue*, utilizado para corar polissacarídeos ácidos como glicosaminoglicanos (HARRIS *et al.*, 2009). As membranas plasmáticas de leveduras são constituídas basicamente de 52% de proteínas, 7% de fosfolipídeos e 4% de ergosterol, além de outros compostos minoritários (NELSON e COX, 2005). Entre os componentes lipídicos estão as fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilserinas (PS) que estão localizadas preferencialmente na parte citoplasmática; e fosfatidilcolinas (PC)

e esfingolípídeos na parte externa da membrana plasmática (HITCHCOCK *et al.*, 1986 e VAN DER REST *et al.*, 1995).

Figura 02. Estrutura da parede celular de *Candida albicans*. A membrana externa é rica em polímeros de manose (manana) que são associadas covalentemente à proteínas (glicoproteínas). A parede interna contém os polissacarídeos quitina e β -1,3 glucana, que confere força e forma à célula. As proteínas externas são ligadas à camada interna predominantemente por glicosilfosfatidilinositol (GPI) que são unidos ao esqueleto através de ligações flexíveis β -1,6 glucana. (Adaptado de GOW *et al.*, 2012).

Interações hidrofóbicas desempenham papel fundamental entre os AMPs anfipáticos e células de mamíferos, já que nestas células os fosfolípídeos ácidos encontram-se no interior da membrana plasmática cuja parte externa é composta principalmente por fosfatidilcolina e esfingomielina zwitteriônicas, embora gangliosídeos negativamente carregados estejam presentes em pequenas quantidades, como mostra a **Figura 03** (MATSUZAKI, 2009).

Embora comprovadamente certos peptídeos exibam esta seletividade (MATSUZAKI, 2009), determinados AMPs são altamente hemolíticos, como é o caso da melitina, isolada do veneno da abelha *Apis mellifera*. Este peptídeo, muitas vezes utilizado como controle positivo em ensaios hemolíticos ou de dano na membrana celular, tem sua alta citotoxicidade relacionada a um zíper de leucina presente em sua estrutura. Tal fato não invalida o seu uso como agente antimicrobiano, uma vez que estudos de estrutura-atividade revelaram que análogos modificados neste motivo estrutural apresentam menor citotoxicidade e atividade antimicrobiana tão potente quanto a própria melitina, que apresenta MIC de 3-4 μ M contra certas bactérias e fungos (PANDEY *et al.*, 2010).

Figura 03. Bases moleculares da seletividade dos AMPs. Eles podem adquirir estrutura anfipática com uma face carregada positivamente (azul) e uma face hidrofóbica (marrom). Interação eletrostática entre as cargas positivas dos AMPs e negativas dos componentes (vermelho) na superfície da célula mamífera (esquerda) e superfície da célula bacteriana (direita) é a maior força para a associação dos AMPs às células. Grupos carregados negativamente de cadeia de carboidratos de glicoproteínas (não mostrado) também pode formar sítio de ligação para AMPs. Interação hidrofóbica entre o AMP e a membrana lipídica também são importantes (adaptado de Matsuzaki, 2009).

Vários AMPs, isolados de fontes naturais diversas, têm sido estudados por grupos de pesquisa brasileiros (SILVA *et al.*, 2000; VERLY *et al.*, 2008; CABRERA *et al.*, 2008; CRUSCA Jr. *et al.*, 2010; CALDERON *et al.*, 2011; BOZELLI *et al.*, 2012). Além de realizar pesquisa em química de peptídeos (KIYOTA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2004; LOFFREDO *et al.*, 2009; REMUZGO *et al.*, 2009), desde 1998 o nosso grupo vêm investigando diferentes aspectos de compostos com ação antimicrobiana, tais como migalina (PEREIRA *et al.*, 2007), gomesina (FÁZIO *et al.*, 2007), cheferina I (REMUZGO *et al.*, 2010; REMUZGO *et al.*, em preparação), fragmentos de acanthoscurrina (REMUZGO *et al.*, 2009) e bacteriocinas (J.R. LIMA, projeto de Pós-Doutorado em desenvolvimento), bem como buscado outros novos em venenos de serpentes (M.A.S. LOPEZ, projeto de Doutorado em desenvolvimento).

1.2.2 Mecanismos de ação dos AMPs

O mecanismo de ação pelo qual os AMPs são capazes de matar os microrganismos é tópico de grande interesse científico, uma vez que a sua elucidação pode auxiliar no *design* de novas drogas com potencial terapêutico.

AMPs que formam α -hélice e são anfipáticos, quando analisados pela projeção em roda de Schiffer e Edmundson, exibem um padrão de distribuição dos resíduos, de modo que parte da molécula apresenta caráter hidrofóbico e a outra hidrofílico. Nela, os aminoácidos consecutivos estão separados por 100° entre si e cada círculo contem 3,6 aminoácidos, como na **Figura 04**.

Figura 04. Projeção de roda de Schiffer-Edmundson de três AMPs. (A) Fragmentos N-terminal da Dermaseptina S; (B) Cecropina P e; (C) Magainina 2. Em vermelho são mostrados os resíduos hidrofílicos e em azul os hidrofóbicos (extraído de OREN e SHAI, 1998).

Embora existam apenas modelos que procurem exemplificar possíveis mecanismos de ação, supõe-se que os AMPs possam agir via mecanismos não específicos como interação com a membrana plasmática, uma vez que mecanismos mediados por receptores não se aplicariam a peptídeos compostos apenas por D-aminoácidos e já foi demonstrado que análogos da magainina 2 e ceropina compostos por D-aminoácidos apresentam a mesma atividade de seus análogos L (OREN e SHAI, 1998).

Como mostra a **Figura 05**, dada esta informação e a conformação assumida pelos AMPs em ambiente hidrofóbico, alguns modelos foram propostos para os peptídeos catiônicos que formam α -hélice e têm como alvo a membrana plasmática: (1) ripas de barril; (2) carpete; (3) poro toroidal.

Segundo o modelo ripas de barril (*barrel-stave*; **Figura 05A**), o AMP anfipático deve interagir sua face hidrofóbica com as cadeias carbônicas dos lipídeos da membrana plasmática e expor sua face hidrofílica de modo a compor o lúmen do canal transmembranar formado. Para agir via este modelo, o peptídeo precisa ser hidrofóbico o suficiente para penetrar no cerne lipídico da membrana (SHAI, 2002; REDDY *et al.*, 2004). Este modelo é sugerido apenas para a alameticina, um AMP produzido pelo fungo *Trichoderma viride* (HUANG, 2000).

Figura 05. Modelos de mecanismos de ação propostos para permeabilização de membranas por AMPs. (A) *Barrel-stave* (B) Modelo Carpete; (C) Poro toroidal. Os peptídeos estão representados como cilindros cuja face cinza é hidrofóbica e a azul hidrofílica (extraído de TOKE, 2005).

O modelo *carpete* (**Figura 05B**) descreve inicialmente a interação eletrostática entre os resíduos carregados positivamente do peptídeo e as cargas negativas dos fosfolípidos. O AMP então se acumula na superfície da membrana plasmática, recobrando-a de forma análoga a um tapete. Em altas concentrações, o AMP pode mimetizar a ação de um detergente levando à desintegração da membrana plasmática via formação de micelas (BECHINGER e LOHNER, 2006). Uma etapa transiente pode ser a formação de poros na membrana durante seu colapso, permitindo a livre passagem de moléculas e íons para o interior da célula (OREN e SHAI, 1998). A *dermaseptina* é um peptídeo proveniente da pele de anfíbios que age via modelo *carpete* (BRODGEN, 2005).

No modelo poro toroidal (**Figura 05C**), o peptídeo anfipático interage eletrostaticamente com a membrana plasmática fosfolipídica e une-se paralelamente a esta. Dessa forma, o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolípeos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro, assim, neste modelo, o lúmen do poro é intercalado de peptídeos e cabeças polares dos fosfolípeos. A formação deste poro é transiente e pode auxiliar na entrada de mais peptídeo na célula (LUDTKE *et al.*, 1996; BRODGEN, 2005). Este tipo de formação de poro pode ser induzido pela magainina 2. Os poros formados por este peptídeo são maiores do que os da alameticina (que age via *barrel-stave*), já que apresentam 3-5 nm de diâmetro interno e 7-8,4 nm de diâmetro externo, como mostra a **Figura 06** (BRODGEN, 2005).

Figura 06. Representação esquemática dos modelos (A) ripas de barril para alameticina, representados por cilindros que possuem 11Å de diâmetro. O diâmetro do poro é de 18Å. As moléculas de lipídeo estão representadas por uma cabeça oval e duas caudas hidrofóbicas e (B) poro toroidal para magainina, representados por cilindros laranjas embebidos na região hidrofóbica. O diâmetro do poro é 30Å. A superfície cinza representa as cabeças polares dos fosfolípeos. Azul e vermelho representam as faces hidrofílicas e hidrofóbicas dos peptídeos, respectivamente (extraído de HUANG, 2000).

Diversas estratégias experimentais têm sido usadas para desvendar o modo de ação de AMPs: marcação do peptídeo com molécula fluorescente, que pode ser a 5 (6) carboxifluoresceína (FAM, FISCHER *et al.*, 2003); utilização de marcadores fluorescentes de potencial de membrana, caso seja necessário saber se o peptídeo rompe a membrana biológica ou forma poros nela (KIM *et al.*, 2001); uso de marcadores fluorescentes de núcleo ou organelas, para saber se o peptídeo possui um alvo interno celular (TAYLOR *et al.*, 2009); emprego de desacopladores da cadeia respiratória como o 2,4-dinitrofenol (DNP) ou azida sódica (NaN_3) para descobrir se a ação do AMP consome ou não ATP (KIM *et al.*, 2001); microscopia confocal e citometria de fluxo para analisar permeabilização celular (TAYLOR *et al.*, 2009) e até ensaios de apoptose (PARK e LEE, 2010).

1.2.3 Potencialidades e Dificuldades de Uso de AMPs na Terapêutica

Com a descoberta do papel dos AMPs produzidos por plantas e animais de combate às infecções microbianas, foi proposto que os mesmos pudessem ser base de uma nova classe de antimicrobianos clínicos (DIAMOND *et al.*, 2009).

A lista de vantagens inclui: (1) fácil metabolização; (2) baixa resistência microbiana; (3) ação microbicida; (4) efeito sinérgico com outras drogas antibióticas; (5) amplo espectro de ação; (6) uso científico para ampliação do conhecimento e *design* de novas drogas. Dentre as desvantagens estão: (1) alta suscetibilidade à proteólise, principalmente aqueles formados exclusivamente de L-aminoácidos; (2) alto custo; (3) certo grau de citotoxicidade; (4) perda significativa da potência em meios de alta força iônica (WIESNER *et al.*, 2010).

Tais desvantagens são alvos de estudo e de tentativas de melhoria de pesquisadores em todo o mundo. Relatos na literatura indicam maior resistência à proteólise do AMP com a amidação da sua porção C-terminal (MACHADO *et al.*, 2007) ou ciclização envolvendo aminoácidos D e L (MACHADO *et al.*, 2012). Em relação ao alto custo de produção, estudos da relação estrutura-atividade vêm sendo desenvolvidos para se obter peptídeos menores, portanto mais baratos, e tão ou mais ativos do que os naturais (MACHADO *et al.*, 2007). Quanto à redução de potência em alta força iônica, pesquisas indicam que mudanças na hidrofobicidade, anfipaticidade, carga e grau de α -hélice auxiliam a solucionar o problema (MACHADO *et al.*, 2012). Assim, pode-se traçar uma comparação entre os AMPs e os antimicrobianos disponíveis no mercado, encontrada na **Tabela 02**.

Apesar das dificuldades mencionadas anteriormente alguns AMPs já estão no mercado. Dois peptídeos catiônicos cíclicos, Gramicidina S (GS) e Polimixinas B e E, foram aprovados para uso em formulações comerciais. A pomada Oncilon-A M[®] contém GS e é indicada no alívio de inflamação e coceiras causadas por dermatoses. O medicamento Bedfordpoly B[®] contém sulfato de polimixina B e é indicado em infecções sanguíneas, do trato urinário e meninges causadas principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Estes peptídeos também são potentes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e contra alguns fungos e nematoides (no caso da GS). Acredita-se que seus mecanismos de ação estejam relacionados à perturbação da integridade da membrana plasmática microbiana. Entretanto, as polimixinas apresentam nefrotoxicidade e neurotoxicidade e a GS alta

Tabela 02. Comparação entre antibióticos convencionais e os AMPs catiônicos (adaptada de MARR *et al.*, 2006).

Propriedades	Antimicrobianos convencionais	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
Espectro de ação	Geralmente seletivos	Amplo
Mecanismos	Específicos	Geralmente por atração eletrostática e dano a membrana celular ou alvo interno
Alvos celulares	Geralmente um ou uma classe de alvos	Menos específicos
Índice de resistência	Após poucas passagens em subMIC	Geralmente não é detectada, necessitaria de muitas passagens pela subMIC para induzir resistência
Farmacocinética	Variável, mas os ingeríveis por semana estão sendo desenvolvidos	Tempo de meia-vida curtos devido à susceptibilidade a peptidase
Toxicologia	Costumam ser o grupo mais seguro de fármacos	Não há estudos de toxicidade tópica ou sistêmica, mas podem ser citotóxicos
Custos	Geralmente baratos (US\$ 0,80/g)	Geralmente caros (US\$ 50-400/g)

atividade hemolítica (MOGI e KITA, 2009). O Pexigan (variante da magainina 2) chegou até a fase III de estudos e mostrou-se eficiente na cicatrização de feridas, apresentando baixa toxicidade. Entretanto, em 1999 a FDA o rejeitou alegando que o mesmo não trazia nenhuma vantagem em relação às drogas antibióticas já atuantes no mercado (WIESNER *et al.*, 2010).

Com isso, observa-se que os AMPs são compostos promissores no que diz respeito à aprovação clínica, mas para isso ainda necessitam de maiores estudos em relação às suas propriedades e modo de ação.

1.2.4 Hemocidinas

O termo hemocidina (*hemoglobin microbicial peptides*) foi citado pela primeira vez em 2000 por Mak e colaboradores como maneira de descrever AMPs provenientes de proteínas contendo grupo heme (hemoglobina, mioglobina e citocromo c), estes peptídeos apresentam certas peculiaridades como: amplo espectro de ação (contra bactérias e fungos), atividade dependente da força iônica do meio em que atuam, mecanismo de ação em que o alvo primário são as membranas celulares, atividade microbicida em concentrações micromolares, para a maioria, estruturação em α -hélice e natureza catiônica (MAK *et al.*, 2000). Em humanos, já foram identificadas hemocidinas no sangue menstrual (MAK *et al.*, 2004) e na placenta (LIEPKE *et al.*, 2003). As **Tabelas 03 e 04** listam hemocidinas

soladas a partir de diversas fontes naturais ou obtidas *in vitro* após clivagem proteolítica, respectivamente.

1.2.5 Hemocidinas sintéticas derivadas do fragmento 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina

Os carrapatos são capazes de transmitir uma série de patógenos a seus hospedeiros, o que tem causado um grande impacto econômico mundial. Uma vez que os parasitas adquirem diversos microrganismos durante sua alimentação sanguínea, o seu intestino deve apresentar sistemas eficientes de defesa. Componentes importantes da imunidade intestinal podem incluir fragmentos derivados da hidrólise química ou enzimática de proteínas (CRUZ e DAFFRE, 2011).

Com a colaboração do nosso grupo de pesquisa e o Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes da Profa. Dra. Sirlei Daffre do ICB-USP, foi isolado e identificado o fragmento Hb33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina, uma hemocidina gerada no conteúdo intestinal do carrapato *Boophilus microplus*. Sabendo que a amidação no C-terminal de um peptídeo leva a uma maior resistência à ação de peptidase e pode potencializar a sua atividade (MACHADO *et al.*, 2007) sintetizamos em seguida o seu análogo amidado (Hb33-61a), que se mostrou ainda mais ativo do que o natural contra bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* A270, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis*) e contra fungos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*) (FOGAÇA *et al.*, 1999).

Nossos estudos estruturais do Hb33-61a usando espectroscopias de dicroísmo circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN) revelaram um comportamento conformacional randômico em solução aquosa, mas em presença de micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS), o Hb33-61a apresentou dobra β na porção N-terminal (Lys⁴⁰-Phe⁴³) e outra (Ser⁴⁹-Ser⁵²) seguida de α -hélice no C-terminal (Ala⁵³-Ala⁶⁰), a análise dos espectros adicionais de ^1H -RMN mostrou também que quando essa hemocidina liga-se a membranas biológicas, as regiões N- e C-terminal são capazes de se mover independentemente graças ao segmento Pro⁴⁴-Leu⁴⁸ que age como uma “dobradiça”. Tal estruturação pode ser parcialmente responsável pela habilidade do peptídeo de permeabilizar a membrana bacteriana

Tabela 03. Sequências dos fragmentos derivados da hemoglobina com atividade antimicrobiana gerados *in vivo*.

Peptídeo	Fragmento	Fonte	Referência
FLSFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAK	α (33-61) bovina	Conteúdo intestinal do carrapato de boi <i>B. microplus</i>	Fogaça <i>et al.</i> , 1999
VLSPADKTNIK	α (1-11) coelho	Conteúdo intestinal do carrapato de coelho <i>Ornithodoros moubata</i>	Nakajima <i>et al.</i> , 2003
SPADKTNIKTAWEKIGS	α (3-19) coelho		
VCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKV VAGVANALAHKYH	β (111-146) humana	Placenta humana	Liepke <i>et al.</i> , 2003
WQKMVTAVASALSSRYH	γ (130-146) humana		
SFPTTKTYFPHFDSLHGSAQVK	α (35-56) humana	Sangue menstrual humano	Mak <i>et al.</i> , 2004
AHHFGKEFTPPVQAAYQKV-VAGVANALAHKYH	β (115-146) humana		
AAHLPAEFTPAVHASLDF	α (110-128) humana	Conteúdo da secreção cervicovaginal humana	Brown <i>et al.</i> , 2006
LVVVLARNFGKFFTPVLQADFQKV VAGVANALAHRYH	β (109-145) ovino	Sangue de ovelha	Tharp <i>et al.</i> , 2007
FLSFPTTKTY	α (32-41) humana	Conteúdo do endométrio humano	Deng <i>et al.</i> , 2009
VNFKLLSHSLLVTLASHL	α (97-114) bovina	Sangue de boi	Hu <i>et al.</i> , 2010

Tabela 04. Sequências dos fragmentos derivados da hemoglobina com atividade antimicrobiana gerados *in vitro*.

Peptídeo	Fragmento	Obtenção <i>in vitro</i>	Referência
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERM	α (1-32) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	Mak <i>et al.</i> , 2000
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDM	α (33-76) humana		
PNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	α (77-141) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLVYPWTQRFLESFGDLSTPDAVM	β (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNLKGT FATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	β (56-146) humana		
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALER	α (1-31) humana	Digestão por Arg-C	
MFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLR	α (32-92) humana		
VDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	α (93-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGR	β (1-30) humana		
LLVYPWTQR	β (31-40) humana		
FFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNLKGT FATLSELHCDKLHVDPENFR	β (41-104) humana		
LLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	β (105-146) humana		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	α (1-23) bovina	Digestão por pepsina	Froidevaux <i>et al.</i> , 2001
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDM	α (33-76) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	Parish <i>et al.</i> , 2001
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNVAHVDDMR	α (1-76) humana		
PNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	α (77-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLVYPWTQRFESFGDLSTPDAVM	β (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNLKGT FATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYH	β (56-146) humana		
VTLASHLP SDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	α (107-136) bovina	Digestão por pepsina	Daoud <i>et al.</i> , 2005
VTLASHLP SDFTPAVHASLDKFLANVSTVLT SKYR	α (107-141) bovina	Digestão por pepsina	Nedjar-Arroume <i>et al.</i> , 2006
STVLT SKYR	α (133-141) bovina		
TSKYR	α (137-141) bovina		
QADFQKVVAGVANALAHRYH	β (126-145) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERM	α (1-32) bovina	Digestão por pepsina	Nedjar-Arroume <i>et al.</i> , 2008
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEAL	α (1-29) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEA	α (1-28) bovina		

VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAE	α (1-27) bovina		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEY	α (1-23) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (33-98) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	α (33-97) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (34-98) bovina		
FPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN	α (36-97) bovina		
PTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF	α (37-98) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELS	α (33-83) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELS	α (34-83) bovina		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALT	α (33-66) bovina		
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALT	α (34-66) bovina		
FLSFPTTKTYFPHF	α (33-46) bovina		
FLSFPTTKTYFPH	α (33-45) bovina		
LSFPTTKTYFPHF	α (34-46) bovina		
FPTTKTYFPH	α (36-45) bovina		
FPTTKTYFPHF	α (37-46) bovina		
VTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVLSKYR	α (107-141) bovina		
VTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	α (107-136) bovina		
VTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVS	α (107-133) bovina		
STVLSKYR	α (133-141) bovina		
SKYR	α (137-141) bovina		
ARNFGKFFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH	β (114-145) bovina	Digestão enzimática	Cruz et al., 2010
FTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH	β (121-145) bovina		
QADFQKVVAGVANALAHRYH	β (126-145) bovina		
LAHRYH	β (140-145) bovina	Digestão por pepsina	Catiau <i>et al.</i> , 2011
MLTAEKAAVTAFWGVKVKDEVGGEALGRL	β (1-30) bovina		
MLTAEKAAVTAF	β (1-13) bovina	Digestão por pepsina	Adje <i>et al.</i> , 2011
KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAA	α (40-63) bovina		
ADFQKVVAGVANALAHRYH	β (127-145) bovina		
KYR	α (139-141) bovina		
(H)LDDLKGTFAALSELHCDKLHVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKEFTPVL	β 77–125		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHF	α 1–46	Digestão por pepsina	Adje <i>et al.</i> , 2011
(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	α 67–106		
(L)LVTLASHLPDFTPAVHASLDKFLANVSTVLSKYR	α 106–141		

(L)VTLASHLPDFTP AVHASL DKFLANVSTVLT SKYR	α 107–141		
(H)LDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSL	α 73–105		
(L)ARNFGKEFTPV LQADFQKV VAGVANALAHRYH	β 114–145		
(L)SAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEALERMFLSF	α 3–36		
(M)LTAEKAAVTA FWGKVKVDEVGGEALGRLLVY	β 2–34		
(L)ASHLPDFTP AVHASL DKFLANVSTVLT SKYR	α 110–141		
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEALERM	α 1–33		
(F)LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAA	α 34–65		
(A)HGKKVLDSFSNGMKHLDLKGTF AALSELH	β 62–91		
VLSAADKGNVKA AWGKVGGHAAEYGAEALERM	α 1–32		
MLTAEKAAVTA FWGKVKVDEVGGEALGRL	β 1–30		
(L)VTLASHLPDFTP AVHASL DKFLANVSTV	α 107–136		
(D)DLKGTF AALSELHCDKLHVDPENFKL	β 75–104		
(L)VTLASHLPDFTP AVHASL DKFLANVS	α 107–133		
(D)LHAHKLRVDPVNFKLLSHSLLVTL	α 86–105		
(F)AALSELHCDKLHVDPENFKLL	β 85–105		
(L)VTLASHLPDFTP AVHASL DKF	α 107–128		
(L)QADFQKV VAGVANALAHRYH	β 126–145		
(L)TKAVEHLDDLPGALSELSDL	α 67–86		
(P)VNFKLLSHSLL	α 96–106		
(L)ARNFGKEFTPV	β 114–124		
F)KLLSHSLL	α 99–106		
(F)KLLSHSL	α 99–105		
(K)KLLSHSL	α 100–105		
(L)TSKYR	α 137–141		
ADFQKV VAGVANALAHRYH	β (127–145) bovina		

(SFORÇA *et al.*, 2005), tal como tem sido proposto para outros AMPs (GAZIT *et al.*, 1996).

Posteriormente, dada a relevância clínica de *Candida albicans* (GUPTE *et al.*, 2002), sintetizamos, purificamos e testamos frente à *Candida albicans* MDM8 fragmentos truncados do Hb33-61a nas formas acetiladas, amidadas ou com carboxilas livres, concluindo que os análogos amidados apresentavam maior atividade antifúngica em relação àqueles contendo carboxila livre, como na **Tabela 05**. Além disso, o fragmento Hb40-61a mostrou ser a porção mínima ativa para ação antifúngica do Hb33-61a (MACHADO *et al.*, 2003) e o mesmo comportamento conformacional na presença de micelas de SDS, como mostrado nas **Figuras 07 e 08** (MACHADO *et al.*, 2007). Em sequência, estudamos o comportamento do Hb40-61a em colaboração com o Laboratório de Sistemas Biomiméticos da Profa. Dra. Iolanda M. Cuccovia do IQ-USP em termos da interação com modelos de bicamadas lipídicas para verificar a sua capacidade de permeabilizá-los. Através do uso de vesículas unilamelares grandes (LUVs) contendo 5-carboxifluoresceína ou pirenotetrasulfonato de sódio (PTS) no seu interior, extravasado para o meio após exposição ao Hb40-61a, foi confirmada tal propriedade da hemocidina sintética (PEREZ *et al.*, em preparação; CARVALHO *et al.*, em preparação).

Tabela 5. Código, sequência, hidrofobicidade média e MICs frente a *C. albicans* MDM8 dos peptídeos (Extraído de MACHADO *et al.*, 2007).

Código	Sequência	Hidrofobicidade média ^a	MIC ^b (μM)
Hb33-61a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	-0,70	3,12-6,25 (10,0-20,0) ^c
Hb33-61	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-OH	-0,70	12,5-25,0 (40,1-80,1) ^c
Hb33-52a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGS-NH ₂	-0,41	50,0-100,0 (116,4 232,8) ^c
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH	-1,11	3,12-6,25 (7,54-15,1) ^c
Hb40-61	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-OH	-1,11	12,5-25,0 (30,1-60,3) ^c
Hb48-61a ^d	LSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	-0,98	>200,0 (>274,9) ^c

^aOs valores de hidrofobicidade média foram calculados de acordo com Kyte e Doolittle (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html>). ^bOs MICs foram expressos no intervalo de concentração [a]-[b], em que [a] é a maior concentração testada com o microrganismo em crescimento e [b] é a menor concentração que causa 100% de inibição de crescimento. ^cOs valores em parênteses estão em μg/mL. ^dA forma de carboxila livre de Hb48-61a não foi incluída na tabela, uma vez que não apresentou atividade frente a *C. albicans*.

Em estudo subsequente, sintetizamos novos análogos do Hb33-61 que demonstraram seu potencial frente a *C. albicans* IAL2151 resistente à fluconazol e *Micrococcus luteus* A270. O Hb40-61a não apresentou sinergismo com fluconazol, um

Figura 07. Visão estereoespacial do modelo de mínima energia do Hb33-61a obtida por RMN em presença de micelas de SDS a pH 4,0 e 37°C. (Extraído de SFORÇA *et al.*, 2005).

Figura 08. Sobreposição dos resíduos Ala⁵³-Lys⁶¹ (A) e de Tyr⁴²-Phe⁴⁶ (B) Hb40-61a (azul) com a região correspondente na estrutura cristalina da cadeia α da hemoglobina bovina (vermelho). (Extraído de MACHADO *et al.*, 2007).

candidacida convencional, mas apresentou uma cinética de morte rápida frente a *C. albicans* MDM8. Esta hemocidina sintética se mostrou pouco hemolítica e capaz de causar morte de cepas de *C. albicans* específicas (NOGUEIRA, 2007).

Desse modo, o presente projeto visou dar continuidade ao estudo das propriedades do fragmento Hb40-61a, a menor porção ativa da molécula Hb33-61 gerada *in vivo* (MACHADO *et al.*, 2007), bem como tentou elucidar o seu mecanismo de ação e sua interação com nanopartículas poliméricas.

1.3 Síntese em fase sólida (SPFS), purificação e caracterização química de peptídeos (MACHADO *et al.*, 2004; REMUZGO *et al.*, 2008)

Convencionalmente, a síntese de peptídeos em fase sólida utiliza um suporte polimérico insolúvel (resina) ao qual o aminoácido C-terminal protegido no grupo α -amina e na cadeia lateral reativa é ligado covalentemente pela formação de uma ligação amida ou éster (**Figura 09**). Ocorrem ciclos de desproteção do grupo α -amina protetor da aminoacil-resina seguidos de ciclos de acoplamento de aminoácido (síntese na direção C- para N-terminal) para construir a peptidil-resina de interesse. Para tal, compostos específicos reagem com a carboxila livre do aminoácido protegido que está sendo acoplado, gerando uma espécie mais reativa, que permite a formação da ligação éster ou amida em temperatura ambiente ou mais rapidamente em alta temperatura (LOFREDO *et al.*, 2009).

Figura 09. Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida.

De acordo com os tipos de protetores do grupo α -amina dos aminoácidos empregados, a síntese pode ser feita por duas estratégias: *t*-Boc (t-butiloxicarbonila) e Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila). Na estratégia *t*-Boc, o grupo *t*-Boc é ácido-lábil e geralmente removido em presença do ácido trifluoroacético. Na estratégia Fmoc, o grupo protetor Fmoc é lábil a bases orgânicas como a piperidina (MACHADO *et al.*, 2004).

A escolha da resina a ser utilizada deve levar em consideração a estratégia (já que a ligação peptídeo-resina deve ser estável nas condições reacionais em que o protetor do grupo α -amina é removido) e a necessidade de obter o peptídeo com o C-terminal na forma amidada ou carboxila livre. Entre outros fatores, a solvatação da resina no meio de reação também é crucial para uma reação rápida e completa. De fato, quando grãos da resina não estão devidamente entumescidos, os seus sítios de reação são de difícil acesso, diminuindo as velocidades das reações (AMBLARD *et al.*, 2006).

O suporte polimérico utilizado inicialmente na composição das resinas foi o poliestireno (PS), como é o caso das resinas Wang, MBHA e Rink amida (COIN *et al.*, 2007; **Figura 10**). Isso confere a elas certas características como baixa polaridade, capacidade de intumescimento em solventes polar apróticos como dimetilformamida (DMF) e diminuição de volume nos polares como metanol (MeOH; AMBLARD *et al.*, 2006). Entretanto, existem certas sequências de peptídeos que são reconhecidamente difíceis de serem sintetizadas por SPFS, as chamadas “*difficult sequences*”, como é o caso do fragmento 101-132 da acantoscurreina recentemente estudado em nosso laboratório (REMUZGO *et al.*, 2009; MILAN *et al.*, em preparação).

Figura 10. Estruturas das resinas Rink amida, MBHA e Wang derivadas de poliestireno.

Pesquisas levaram a uma nova geração de resinas, que utilizam polímeros alternativos ao poliestireno como suporte; o trimetilolpropano etoxilato triacrilato, faz parte da resina *Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin* ou simplesmente CLEAR (**Figura 11**). Por isso, a CLEAR intumescce mesmo em solventes mais polares, permitindo que as cadeias polipeptídicas em crescimento dentro da malha da resina fiquem acessíveis durante as reações, diminuindo a possibilidade de formação de agregados ou folhas β entre as cadeias peptídicas ligadas à resina, o que facilita a síntese de sequências peptídicas difíceis (KEMPE e BARANY, 1996).

fornecia um produto de alta qualidade com bom rendimento. Entretanto, dada a periculosidade do HF, esta estratégia foi abandonada como tem sido feito na maior parte dos laboratórios distribuídos ao redor do mundo (CHAN e WHITE, 2000).

Na estratégia Fmoc, no entanto, as peptidil-resinas obtidas são submetidas a ácidos orgânicos como o ácido trifluoroacético (AMBLARD *et al.*, 2006). Nesta etapa, todos os grupos protetores das cadeias laterais reativas são removidos e a ligação peptídeo-resina é rompida. Por isso, a Fmoc se tornou uma alternativa à Boc (FIELDS, 1997).

A utilização de *scavengers* também é fundamental nesta etapa da síntese, uma vez que estes impedem que carbocátions produzidos durante a remoção de grupos alquil protetores de cadeias laterais, alquilem resíduos de aminoácidos susceptíveis. Os “scavengers” mais usados são: anisol, p-cresol e tióis (como o etanoditiol, EDT, e o tiobismetano; LLYOD-WILLIAMS, 1997), embora derivados de silano possam ser utilizados (como o triisopropilsilano; SOLÉ *et al.*, 1992). A escolha depende da natureza dos grupos protetores e das propriedades das cadeias laterais não protegidas. O reagente R, por conter o EDT, um dos scavengers mais eficientes para sequências que possuem aminoácidos sensíveis como His, Gln, Ser, Thr, Tyr e Cys, é indicado para todas as sequências (LLYOD-WILLIAMS, 1997).

1.3.2 Purificação e caracterização de peptídeos (MACHADO *et al.*, 2004)

Uma vez obtido o peptídeo livre bruto, ele deve ser devidamente purificado. As purificações dos peptídeos sintéticos brutos obtidos podem ser feitas pela cromatografia preparativa, de coluna de troca-iônica, fase normal ou reversa (KIYOTA *et al.*, 2003). A abordagem mais versátil e eficaz é a cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência (RP-HPLC; WELLINGS e ATHERTON, 1997).

As frações devem ser analisadas por cromatografia de fase reversa, eletroforese ou modalidades acopladas à espectrometria de massas. Aquelas que contêm o peptídeo de interesse são reunidas e liofilizadas. O peptídeo purificado é submetido à análise de aminoácidos para a determinação da composição de aminoácidos e conteúdo peptídico.

1. 4 Nanopartículas poliméricas em sistemas de *drug delivery*

O uso de materiais poliméricos nanoparticulados para transportar agentes terapêuticos é hoje tema frequente e importante na pesquisa farmacêutica e biomédica. Uma vez que o tamanho dessas nanopartículas (NP; 10 a 1000 nm) pode ser similar àqueles de proteínas ou DNA (CARMONA-RIBEIRO, 2010), há um grande interesse no desenvolvimento de NP que atuem em *drug delivery*, entregando a droga a um sítio alvo com aumento de estabilidade química, potencial terapêutico e redução de efeitos colaterais (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Sílica, látex ou partículas hidrofóbicas podem ser revestidas com lipídeos ou peptídeos catiônicos e caracterizadas por isotermas de adsorção, tamanho médio de partícula por espalhamento de luz dinâmico, análise do potencial da superfície e estabilidade coloidal (CARMONA-RIBEIRO, 2010). Um sistema ideal de NP é aquele em que se consegue carregar mais droga para reduzir a sua quantidade a ser administrada. Neste tipo de *drug delivery*, o transporte da droga pode ser feito por dois métodos: incorporação da substância concomitante à produção da NP ou adsorção por incubação. A adsorção de agentes terapêuticos segue a isoterma de Langmuir: $\theta = \frac{\alpha \cdot P}{1 + \alpha \cdot P}$ onde θ é a fração coberta da superfície, P é a pressão do gás ou concentração e α é uma constante (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

A possibilidade de utilização de drogas peptídicas é atraente na medicina, uma vez que se conhece bem o seu papel em diferentes organismos. Entretanto, tal utilização é limitada pela rápida degradação dos peptídeos por peptidases presentes no trato gastrointestinal. Além disso, eles precisam ser administrados via parenteral, tornando os seus tempos de meia vida curtos, demandando uma administração mais frequente. Assim, a possibilidade de formulação com NP para administração oral ou parenteral tem sido propostas, o que chama a atenção por tornar possível também a administração via oral de proteínas, peptídeos e genes à alvos específicos como órgãos ou tecidos (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Partículas de poliestireno sulfato de sódio (PSS; **Figura 12**) vem sendo utilizadas clinicamente no tratamento de hipercalcemia, pois elas apresentam baixa toxicidade. Da mesma forma, a adsorção de insulina em micropartículas de PSS forneceu ótimos

resultados em relação à administração/ absorção do hormônio e diminuição da glicose sanguínea (TAKENAGA *et al.*, 1998).

Figura 12. Estrutura da partículas de poliestireno sulfonato de sódio.

2. Objetivos

O presente projeto visou dar continuidade ao estudo da hemocidina sintética Hb40-61a. Para tal:

1. Sintetizamos, purificamos e caracterizamos quimicamente o Hb40-61a, o seu análogo *ent* (*ent*-Hb40-61a) e o análogo marcado com 5(6)carboxifluoresceína (FAM-Hb40-61a).
2. Determinamos as suas ações fungistática e fungicida em presença e ausência de sal frente a cepas de *Cândida* envolvidas com a candidíase (*C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258), bem como suas atividades antibacterianas frente à *E. coli* ATCC25922 e *S. aureus* ATCC25923, todas disponíveis em nosso laboratório.
3. Determinamos as suas ações frente a eritrócito humanos.
4. Realizamos experimentos com sondas fluorescentes, tais como marcadores de potencial, dano e fluidez de membranas biológicas, na tentativa de compreender o mecanismo da ação permeabilizante dessa hemocidina sintética.
5. Foram feitos estudos preliminares da possibilidade de adsorção do peptídeo Hb40-58a à nanopartículas de poliestireno sulfatado (PSS) como mecanismo de *drug-delivery*.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Resinas

Foram utilizadas as resinas Rink amida da Bachem (EUA) para a primeira síntese do Hb40-61a e FAM-Hb40-61a e a resina CLEAR amida da Peptides International (EUA) para a segunda síntese do Hb40-61a e *ent*-Hb40-61a, ambas com grau de substituição 0,40 mmol/g.

As nanopartículas de PSS foram obtidas da Interfacial Dynamics Corporation (Portland, Oregon).

Derivados de aminoácidos e reagentes acopladores

O Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH e Fmoc-Tyr(But)-OH foram adquiridos da Advanced ChemTech (EUA); o Fmoc-Lys(Boc)-OH da Bachem (EUA); o Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH e Fmoc-Thr(tBu)-OH da Bachem California (EUA); o Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln-OH e Fmoc-D-Lys(Boc)-OH da NovaBiochem Comp. (EUA) e o Fmoc-Ser-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH e todos os outros Fmoc-D-aminoácidos da Peptides International (EUA).

Os reagentes ativadores ou acopladores utilizados foram: DIC da Sigma Chemical Co. (EUA), HOBt da Protein Research Foundation (EUA) e TBTU da Advanced ChemTech (EUA).

O FAM e o BOP foram obtidos da Nova Biochem (EUA).

Solventes, ácidos, bases e detergentes

Os solventes DCM, DMF, MeOH, 2-propanol e DMSO de grau analítico provinham da Merck (Alemanha); NMP da Applied Biosystems (EUA). A ACN era de grau cromatográfico da Vetec Química Fina Ltda (Brasil).

Outros reagentes como anidrido acético, piperidina, DIPEA e ninidrina foram obtidos da Applied Biosystems (EUA), enquanto que a TEA, o TFA e o ácido ortofosfórico provinham da Merck (Alemanha) e o TIS da Aldrich (EUA).

Meios de cultura

Os reagentes utilizados nos ensaios biológicos foram PDB (pH=5,1±0,2), peptona e dextrose da DB (EUA), ágar da HiMedia (Índia) e cloreto de sódio da Nuclear (Brasil).

Sondas fluorescentes

O marcador de potencial de membrana DiBAC₄ (5) foi adquirido da Invitrogen (Molecular Probes, EUA). O DPH da Sigma Aldrich (EUA). O Kit *Live/Dead Funga Light* da Invitrogen (L34952, EUA).

Microorganismos

As cepas empregadas foram gentilmente cedidas ao nosso laboratório pela Prof^a Dra. Elsa Masae Mamizuka e pelo Prof Dr. Sandro Rogerio de Almeida, obtidas da Coleção Americana de Tipos de Cultura: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Eschechiria coli* (ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

Colunas para RP-HPLC

Para RP-HPLC, foram utilizadas as colunas C₁₈ analítica (0,46 cm x 25,0 cm x 5 µm e 300 Å) e semi-preparativa (1,1 cm x 25,0 cm x 5 µm e 300 Å) da Grace Vydac (EUA).

3.2 Métodos preparativos

3.2.1 Síntese de peptídeos (REMUZGO *et al.*, 2009)

Foram realizadas duas sínteses manuais do peptídeo Hb40-61a pelo método da fase sólida (SPPS) passo a passo utilizando as resinas Rink amida e CLEAR amida e uma síntese do análogo *ent* (*ent*-Hb40-61a) na CLEAR amida. As etapas de desproteções do grupo Fmoc ocorreram em 20% piperidina/DMF ou 20% piperidina/NMP (esta etapa foi repetida por 2-3 vezes de 7 min, quando se fez necessário). Após cada desproteção, foram feitas lavagens da peptidil-resina em crescimento com 20% DMSO/NMP ou DMF e MeOH ou 2-propanol e amostras delas

foram submetidas ao teste de ninidrina (positivo; KAISER *et al.*, 1970). Os Fmoc-aminoácidos (com excesso molar de 2,5) foram acoplados às peptidil-resinas em crescimento na presença de TBTU/DIPEA (quantidades equimolares aos Fmoc-aminoácidos) em DMF ou na presença de DIC/HOBt em 20% DMSO/NMP, sendo as reações feitas a 60°C usando aquecimento convencional. Após lavagens com DMF ou 20% DMSO/NMP e MeOH ou 2-propanol, amostras das peptidil-resinas foram submetidas ao teste de ninidrina (negativo; KAISER e col., 1970). Ao final do processo de alongamento da cadeia polipeptídica, as peptidil-resinas foram separadas dos meios reacionais por filtração, lavadas com DMF e DCM e secas a vácuo.

3.2.2 Marcação com FAM (REMUZGO, 2008)

Foram adicionados ao frasco de síntese contendo a peptidil-resina já desprotegida (TN positivo; KAISER *et al.*, 1970), o FAM, DIPEA, HOBt e BOP (todos em excesso de 5 vezes). A reação foi deixada a ocorrer a 60 °C por 2 h. Durante a mesma, foi feito o controle de pH do meio reacional pela adição de DIPEA para 8,0-9,0. Após 2 h, os reagentes foram eliminados por filtração e a FAM-peptidil-resina foi submetida ao teste de ninidrina (negativo; KAISER *et al.*, 1970).

3.2.3 Clivagem e desproteção total das peptidil-resinas (LOFFREDO *et al.*, 2009)

Para a clivagem do peptídeo da resina e simultânea desproteção total das cadeias laterais protegidas, foi feita primeiramente uma escala piloto, com vistas a acompanhar o aparecimento do produto em função do tempo através de análise do peptídeo livre por RP-HPLC. Para isso, foram pesados aproximadamente 10 mg de peptidil-resina e adicionaram-se 100 µL coquetel de clivagem (TFA 95%/2,5%TIS/2,5%água). A mistura foi agitada em shaker a temperatura de 37 °C. Alíquotas foram retiradas da reação e analisadas em RP-HPLC nos tempos 0, 2, 4, 6 h.

Finalizada a reação, o peptídeo livre foi precipitado com éter diisopropílico. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado. Tal procedimento foi repetido 3 vezes. Ao final, dissolveu-se o precipitado em solvente B (60%ACN/0,09%TFA/H₂O) e a solução resultante foi liofilizada. O peptídeo bruto seco foi pesado.

Com o peptídeo seco, foi preparada uma solução a 1 mg/mL que foi analisada por RP-HPLC (coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% em 30 min.) e por LC-ESI/MS (coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN /0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% em 30 min.).

A escala preparativa foi feita utilizando as condições ideais encontradas. As massas e volumes usados estão descritos na **Tabela 07**.

3.2.4 Purificação dos peptídeos brutos (KIYOTA *et al.*, 2003; REMUZGO *et al.*, 2009)

O esquema das etapas seguidas para purificação dos peptídeos encontra-se na **Figura 13**. Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos foram obtidos em dois sistemas de solventes: (a) solvente A: 0,1%TFA em água e solvente B: 60%ACN/0,09% TFA em água; (b) solvente A: TEAP e solvente B: 50%ACN/TEAP e dois tipos de gradientes lineares: rápido de 5 a 95% em 30 min (3% de B/min) e lento (1% de B/min).

As purificações foram feitas em duas etapas em cromatógrafo da Waters modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C₁₈) e fluxo de 9,0 mL/min (KIYOTA *et al.*, 2003).

Foram empregadas as seguintes condições: λ 210 nm, fluxo 9,0 mL/min gradiente linear 60% de B em 90 min, utilizando o TEAP como solvente A 50% ACN/TEAP como solvente B. Após esta primeira etapa, as frações contendo o peptídeo purificado foram liofilizadas. O material obtido foi dissolvido no solvente A e dessalinizado na segunda etapa, usando as mesmas condições anteriores, alterando-se os solventes para 0,1%TFA/ H₂O como solvente A e 60%ACN/0,09%TFA/ H₂O como solvente B e o gradiente linear para 30% de B em 90min (FAM-Hb40-61a) ou 60% de B em 90min (Hb40-61a e *ent*-Hb40-61a).

Figura 13. Etapas das purificações dos peptídeos sintéticos.

3.3 Métodos analíticos e de caracterização dos peptídeos

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de fase reversa (RP-HPLC; MACHADO *et al.*, 2007)

As análises dos peptídeos brutos e purificados por RP-HPLC foram realizadas utilizando-se cromatógrafo LDC Analytical composto por detector SpectroMonitor 3100, bombas ConstaMetric 3200 e 3500, um injetor manual Rheodyne 7125, um integrador DataJet e um detector UV (MILTON ROY, Spectromonitor 3100), utilizando a coluna (Vydac C₁₈, 10 µm, 300 Å, 2,2 x 25,0 cm), fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de detecção de 210 nm.

3.3.2 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)

Os peptídeos brutos e purificados foram caracterizados em equipamento composto por um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão, fluxo 0,2 mL/min), composto por um degaseificador modelo DGU-20A₃, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C₁₈ (5 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C₁₈ (150 x 2 mm, diâmetro da partícula = 4,6 µm e diâmetro do poro = 12 nm) Shim-pack VP-ODS acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Alemanha) com fonte de ionização do tipo eletrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo Íon Trap. As voltagens aplicadas foram 3500 V (capilar) e 37 kV (cone).

Para as análises dos espectros foi utilizado o software HyStar 3.2. Os solventes utilizados na cromatografia foram: solvente A 0,1%TFA/H₂O e B 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, gradiente linear de 5 a 95% de B em 30 min.

3.3.3 Hidrólise total e análise de aminoácidos (SMILLIE e NATTRIS, 1991; CLARKE *et al.*, 1999)

Os peptídeos purificados foram colocados em frascos específicos numa estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore) e expostos a vapor proveniente de 300 µL de ácido clorídrico 6 M a 110 °C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram secas a vácuo. Os hidrolisados secos foram dissolvidos em H₂O e analisados no *Dionex BioLC® Chromatography System* (Dionex, EUA) que emprega um método de separação dos aminoácidos por cromatografia de troca iônica, em uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm) da Dionex e detecção por amperometria integrada, usando o detector eletroquímico ED50. As análises foram feitas em triplicata.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Atividade Antifúngica (FEHLBAUM *et al.*, 1994)

A atividade antifúngica frente a *C. albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foi determinada pelo método da microdiluição em caldo (FEHLBAUM *et al.*, 1994). Para isso, em cada um dos 96 poços

de uma microplaca foram pipetados 10 μ L de uma série de diluições de peptídeo (1,0 mM – 1,95 μ M), 10 μ L de água e 80 μ L de inóculo, uma suspensão de leveduras ($Abs_{595nm} = 0,001$) de concentração final 10^4 células/mL em meio 1,2 % de PDB. Nos poços referentes ao controle positivo adicionou-se H₂O e inóculo, enquanto nos poços referentes ao controle negativo, apenas meio PDB. A placa foi mantida em estufa a 37 °C por 48 h, sem agitação e sob atmosfera úmida. As concentrações mínimas inibitórias de crescimento (MICs) foram determinadas visualmente e quantificadas em leitora de microplaca (TECAN, modelo Infinite 200) pelo incremento da absorbância a 595 nm no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Algas: Biotecnologia, Ambiental e Aplicações do Prof Dr. Pio Colepicolo Neto.

As MICs foram então expressas como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] eram as maiores concentrações testadas no qual o microrganismo crescia e [b] eram as mais baixas concentrações testadas que causaram total inibição do crescimento (EHRET-SABATIER *et al.*, 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata. A **Figura 14** mostra um esquema das microplacas.

3.4.2 Atividade antibacteriana

Para teste de atividade antibacteriana, os mesmos procedimentos descritos anteriormente (3.4.1 Atividade Antifúngica) foram seguidos, substituindo-se apenas o meio de cultura utilizado para crescimento pelo meio LB com NaCl 171 mM e meio LB sem adição de NaCl para o teste em microplaca.

3.4.3 Atividade Antifúngica em meio tamponado (KACPRZYK *et al.*, 2007)

As mesmas etapas descritas anteriormente para a realização do teste de atividade antifúngica foram seguidas, porém os tampões em meio PDB, acetato de sódio 10 mM (pH5,5) e tris 10 mM (pH7,4) foram preparados.

3.4.4 Atividade Fungicida (MACHADO *et al.*, 2007)

Para a determinação da atividade fungicida dos peptídeos, após o teste em microplaca para a determinação da MIC, os conteúdos dos poços correspondentes ao intervalo de concentrações [a]-[b] da MIC e às concentrações maiores que a mesma

Figura 14. Esquema do procedimento utilizado para a determinação das MICs.

foram plaqueados em Ágar Sabouraud e incubados sem agitação a 37°C por 24h. Como controle positivo, foi plaqueado o conteúdo do poço da diluição imediatamente inferior a MIC. A concentração fungicida foi estabelecida como aquela em que não houve formação de colônias após a incubação.

3.4.5 Ensaio Hemolítico (MACHADO *et al.*, 2007)

Amostras de sangue de doadores saudáveis do nosso laboratório (8 mL) foram coletadas em tubo a vácuo contendo EDTA como anticoagulante. Os eritrócitos foram separados por centrifugação (300 g por 5 minutos) e lavados com tampão fosfato de sódio (PBS: Na₂HPO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 1,8 mM, contendo NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). O concentrado de células foi suspenso em PBS e depois diluído para uma suspensão de eritrócitos em PBS 1,11% ou em tampão fosfato isotônico (IGP: tampão

fosfato de potássio 1 mM suplementado com glicose 287 mM; pH 7,4) (WEI e BOBEK, 2004).

Em microtubos, foram adicionados à suspensão de eritrócitos em PBS 1,11%, as soluções de concentrações variadas dos peptídeos em água (0,19-100 μ M). Controles positivos (SDS 0,1% em PBS) e negativos (PBS sem os peptídeos) também foram feitos. Nos outros poços foram colocados a suspensão de eritrócitos em IGP 1,11%, aos quais foram adicionadas soluções de concentrações variadas de peptídeo em IGP (0,19-100 μ M). Controles positivos (SDS 0,1% em IGP) e negativos (IGP) também foram feitos. Após incubação por 1 h e centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, lida em 405 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata (NOGUEIRA, 2007; REMUZGO, 2009). A **Figura 15** mostra um esquema das etapas seguidas para realização do teste.

3.4.6 Análises por microscopia confocal de varredura a laser

Foi empregado o equipamento Zeiss, modelo LSM 510 Meta, do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. A cultura das cepas foi crescida *overnight* em meio Sabouraud (3 mL) sob agitação a 37 °C. No dia seguinte, a amostra foi diluída no mesmo meio e a absorbância da mistura lida em 595 nm. As células foram deixadas crescer até a metade de sua fase logarítmica ($ABs_{595nm} = 0,400$; equivalente a 10^7 células/mL), quando foram lavadas com meio PDB e incubadas com os peptídeos. Em seguida, a cultura foi lavada com meio PDB e fixada com solução de formaldeído 3,7% em PBS. Após lavagens do *pellet* com PBS, a amostra foi resuspendida no mesmo.

Na montagem das lâminas, foram utilizadas lamínulas cobertas com poli-L-lisina, às quais adicionou-se amostra celular e Vecta Shield (Vector Laboratories, Inglaterra).

3.4.7 Análises por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)

Foi empregado um citômetro de fluxo Cytomics FC500 da Beckman Coulter do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. A cultura das cepas foi crescida *overnight* em meio Sabouraud (3 mL) sob agitação a 37°C. No dia seguinte, a amostra foi diluída no mesmo meio e a absorbância da mistura lida em 595nm. As células foram deixadas

Figura 15. Esquema para realização do ensaio hemolítico para os peptídeos estudados. Ensaio feito nos tampões IGP e PBS em triplicata.

crescer até a metade de sua fase logarítmica ($ABs_{595nm} = 0,400$; equivalente a 10^7 células/mL), quando foram lavadas com meio PDB e incubadas com os peptídeos na ausência ou presença de NaN_3 0,05% ou 0°C. Em seguida, a cultura foi lavada com meio PDB e fixada com 0,37 % de formaldeído em PBS. Após lavagens com PBS, a

amostra foi dissolvida nele. A fluorescência do marcador foi monitorada no canal FL1-H e os resultados analisados utilizando o software WinMDI 2.9.

3.4.8 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* por Hb40-61a

Foi utilizado o Kit *Live/Dead FungaLight* (Molecular Probes, OR, USA) que mede a viabilidade celular. Este kit baseia-se na utilização do *Syto 09* (fluorescência verde) e o iodeto de propídeo (fluorescência vermelha). Para o teste do peptídeo, células de *C. albicans* ATCC90028 foram crescidas até a metade da sua fase exponencial, quando, foram centrifugadas e ressuspensas em meio PDB. As células suspensas foram expostas a diferentes concentrações de peptídeo durante 1 h a 37°C. Posteriormente, foram lavadas com meio PDB e ressuspensas no mesmo meio. Às suspensões foram adicionadas solução contendo os dois fluorescentes (concentração final 0,3%). Após incubação em temperatura ambiente, as células foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE300) multiusuário do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Para a preparação das lâminas, foram utilizadas lamínulas recobertas de poli-L-lisina (REMUZGO, 2008).

3.4.9 Análise por FACS para potencial de membrana plasmática de *C. albicans* (LIAO *et al.*, 1999).

Para a análise da integridade do potencial da membrana após o tratamento com o peptídeo, células na fase logarítmica de *C. albicans* ATCC90028, cultivadas em meio Sabouraud, foram centrifugadas (10000 g por 5 min.), lavadas e ressuspensas em meio PDB, contendo o peptídeo (6,25; 12,5; 25; 62,5 e 125 µM) ou o controle positivo DNP (4 mM) e incubadas por 1 h ou 20 min a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas com meio PDB. Para detectar a despolarização da membrana celular, 1,8 µM de DiBAC₄ (5), foi adicionado e as amostras incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente no escuro. A análise de citometria de fluxo foi realizada através de um citômetro de fluxo Cytomics FC500 da Beckman Coulter do Departamento de Bioquímica do IQ-USP.

3.4.10 Medida da fluorescência da membrana plasmática de *C. albicans* (LEE *et al.*, 2002)

A fluorescência da membrana plasmática de células de *C. albicans* marcadas com DPH foi detectada para investigar mudanças na dinâmica da membrana. As células fúngicas (2×10^6 células) foram tratadas com concentrações variadas de peptídeo (6,25; 12,5; 25; 62,5 e 125 μM) e incubadas por 1 h a 37 °C. As amostras de *C. albicans* foram fixadas de 0,37% de formaldeído, recolhidas e lavadas com PBS (pH 7,4). A suspensão foi incubada com DPH por 45 min a 37 °C. A fluorescência foi mensurada por um espectrofluorímetro da Hitachi (F-7000) em 350 nm de excitação e 450 nm de emissão. Este experimento foi realizado com o auxílio da Profa Dra Kátia Perez no Laboratório de Sistemas Biomiméticos da Profa Dra. Iolanda Midea Cuccovia.

3.4.11 Análise por microscopia de força atômica (AFM)

Células de *C. albicans* ATCC90028 em fase logarítmica foram tratadas com 62,5 μM de Hb40-61a por 1 h à 37 °C, lavadas com meio PDB e centrifugadas. O *pellet* resultante foi aplicado e deixado secar por 5 min em mica recém clivada. Foi utilizado o aparelho de AFM do Laboratório de Filmes Finos (LFF, IF-USP) da Prof^a Maria Cecília Salvadori, da marca Veeco com varredura máxima de 10 x 10 microns. Todas as imagens foram obtidas com uma velocidade de varredura de 1,0 Hz e resolução de 512 x 512 pixels.

3.5 Ensaios com recobrimento de nanopartículas aniônicas de PSS com o AMP catiônico Hb40-58a

3.5.1 Preparação das dispersões de PSS e do arranjo PSS-Hb40-58a

As nanopartículas de PSS (**Tabela 06**) foram suspensas numa relação de $6,73 \times 10^9$ partículas/mL. A partir desta suspensão foram preparadas outras contendo o peptídeo Hb40-58a em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$), que interagiram com as nanopartículas por 1 h a temperatura ambiente. Desse modo, a quantidade de partículas se manteve constante e a concentração de Hb40-58a foi variada.

Tabela 06. Propriedades das nanopartículas de PSS em água (informações fornecidas pelo fabricante).

Látex	Diâmetro médio (nm)	Densidade de carga superficial ($\mu\text{C}/\text{cm}^2$)	Área por grupo carregado (nm^2)	Área superficial específica (cm^2g^{-1})	Concentração de partículas (partículas/mL)
PSS	$137,0 \pm 3,0$	0,79	20,10	415,12	$5,97 \times 10^{13}$

3.5.2 Determinação da distribuição de tamanho, diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PSS livres e do arranjo PSS-Hb40-58a

Todas as determinações foram feitas no equipamento ZetaPlus Zeta-Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, EUA), no Laboratório de Biocolóides da Profa. Dra. Ana Maria Carmona Ribeiro. Este equipamento opera com um laser de 570 nm e espalhamento de luz dinâmico a 90° para determinação do diâmetro médio das partículas.

O espalhamento de diferentes radiações permite investigar a estrutura e dinâmica de materiais dispersos em meio líquido, pois com a incidência de luz sobre uma dispersão coloidal, a radiação pode ser absorvida, espalhada ou transmitida sem alteração. Para partículas esféricas em uma dispersão diluída, utiliza-se a equação de Stokes-Einstein: $D = k_B \cdot T / (6\pi\eta R)$, onde D é o coeficiente de difusão translacional, R é o raio hidrodinâmico da partícula, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η é a viscosidade do meio. Esta equação relaciona termos para determinação de seu diâmetro através de experimentos de *dynamic light-scattering* (técnica utilizada para medir tamanhos de partículas ou distribuição de tamanho). Neste trabalho, assumimos o diâmetro médio como o diâmetro hidrodinâmico médio (D_z) (ROSA, 2008).

Os potenciais-zeta (ζ) foram determinados pela mobilidade eletroforética (μ) e equação de Smoluchowski: $\zeta = \mu\eta / \epsilon$, onde η e ϵ são viscosidade do meio e constante dielétrica, respectivamente (MANUAL DE INSTRUÇÕES BROOKHAVEN, 1997). A determinação do potencial-zeta das partículas é baseada no fato de que quando se aplica um campo elétrico em partículas carregadas, elas migram para o polo positivo ou negativo. Seu sentido indica a carga e a sua velocidade é proporcional ao valor dessa carga (MELO, 2010).

3.5.3 Atividade antifúngica do PSS-Hb40-58a

Na melhor proporção PSS/Hb40-58a encontrada na análise de potencial zeta (30 µg/mL), foram preparadas suspensões de concentração seriada que mantiveram esta proporção. Os arranjos PSS-Hb40-58a foram centrifugados e seus sobrenadantes descartados, de modo a se testar apenas o conteúdo adsorvido nas partículas. Seguiram-se os procedimentos para atividade antifúngica descritos anteriormente.

3.5.4 Ensaio hemolítico do PSS-Hb40-58a

As suspensões de concentração seriadas na melhor proporção PSS:Hb40-58a encontradas para o potencial zeta (30 µg/mL) foram centrifugadas, tiveram seus sobrenadantes descartados e foram ressuspensas em água para o ensaio hemolítico, realizado segundo os procedimentos descritos anteriormente.

3.5.5 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* por Hb40-58a e PSS-Hb40-58a

Foi preparada uma suspensão 1 mM de Hb40-58a na melhor proporção encontrada para PSS-Hb40-58a (30 µg/mL). Esta foi centrifugada, teve seu sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspendido em água para o teste. Este foi incubado com células de *C. albicans* por 2 h a 37°C: 50 µM de Hb40-58a (MIC), 100 µM de PSS-Hb40-58a (MIC). Também foram testadas apenas as partículas de PSS e preparados os controles negativo (células não tratadas) e positivo (células incubadas com 70% de 2-propanol). Segundo os procedimentos relatados anteriormente.

3.5.6 Medida preliminar do diâmetro médio de *C. albicans* antes e após tratamento com AMPs

Células de *C. albicans* em fase logarítmica tardia foram centrifugadas (10000 g por 5 min.), lavadas com meio PDB e incubadas com os peptídeos Hb40-61a, Hb40-58a, o arranjo PSS-Hb40-58a e melitina por 1 h a 37°C em suas respectivas MICs (12,5; 50,0; 100,0 e 3,1 µM). Após o tratamento, as células foram lavadas com meio PDB e submetidas ao aparelho ZetaPlus Zeta-Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, EUA) para medição de seus diâmetros médios.

4. Resultados e Discussão

4.1. Síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos

4.1.1 Considerações gerais

O processo de alongamento das sequências peptídicas nas resinas a 60°C ocorreu sem grandes dificuldades. A síntese do Hb40-61a, na Rink-amida apresentou reações de acoplamentos incompletos. Dada a complexidade de síntese desta sequência, optamos pela troca da resina Rink-amida pela CLEAR amida, que, como mencionado na Introdução, apresenta vantagens em relação à primeira. A síntese na CLEAR-amida foi mais eficiente. Para a clivagem do peptídeo da resina e sua desproteção total, observamos que o coquetel contendo triisopropilsilano foi melhor do que o reagente R, uma vez que forneceu um produto bruto contendo menos contaminantes. A primeira tentativa de purificação do Hb40-61a bruto foi feita utilizando-se apenas o sistema de solventes TFA para fracionamento. O perfil cromatográfico do purificado se mostrou praticamente idêntico ao do bruto, o que tornou necessária a utilização prévia do sistema de solventes TEAP. Assim, as purificações passaram a ser realizadas em duas etapas: primeiramente em sistema TEAP e, posteriormente, em sistema TFA. Elas forneceram o peptídeo purificado com alto grau de pureza, porém com baixo rendimento.

Não houve dificuldade no acoplamento da 5-(6)-carboxifluoresceína na peptidil resina Hb40-61a -Rink-amida. O seu rendimento de purificação foi baixo, possivelmente devido a presença de contaminantes de comportamentos cromatográficos similares ao peptídeo desejado e à dificuldade de síntese na Rink-amida.

A síntese, purificação e caracterização do análogo D também ocorreu adequadamente na resina CLEAR-amida com o melhor rendimento (23%) entre todas as purificações realizadas. Os dados de síntese e caracterização obtidos de todos os peptídeos estudados estão descritos nas **Tabelas 07 e 08**.

4.1.2 Peptídeo KTYFPHFDSLHGS AQVKGHGAK-NH₂ (Hb40-61a)

O peptídeo bruto, o produto da purificação em TEAP e as frações do peptídeo purificado obtidos das sínteses nas resinas Rink amida e CLEAR Amida, respectivamente foram analisados por RP-HPLC no sistema TFA (**Figura 16 e 17**). Para

Tabela 07. Dados de síntese e purificação dos peptídeos estudados.

Peptídeo	Síntese		Clivagem do peptídeo da resina/ Desproteção total		Purificação		Caracterização	
	Resina (grau de substituição)	Peptidil- resina (g)	Peptidil- resina (mg)	Bruto obtido ¹ (mg)	Fração principal (mg)	Fração secundária (mg)	% Pureza	
							Sistema TEAP	Sistema TFA
Hb40-61a	1,00085g (0,4mmol/g) Rink amida	1,794	302,13	131,26	5,02	4,27 (Fr. 2A) e 2,89 (Fr.2B)	90	98 (principal) 97,2 (Fr.2B) 97,2 (Fr.2A)
	1,00733g (0,4mmol/g) CLEAR amida	1,900	502,3	155,50	18,1	3,59 (Fr.2A) e 0,5 (Fr.2B)	86	100 (principal) 96,7 (Fr.2A) 96,5 (Fr.2B)
FAM- Hb40-61a	1,00085g (0,4mmol/g) Rink amida	1,794	299,01	101,0	3,05	0,97 (Fr.A) e 2,3 (Fr.B)	91	99 (principal) 97,6 (Fr.2A) 99,3 (Fr.2B)
			352,95	89,46	3,02	-	96	100 (principal)
D- Hb40-61a	0,51000g (0,4mmol/g) CLEAR amida	1,203	502,2	215,3	50,86	5,78 (Fr.2A) e 4,73 (Fr.2B)	86	99 (principal) 98 (Fr.2A) 98 (Fr.2B)
Hb40-58a²	500mg (0,225 mmol/g) Rink amida	0,703	295,2	147,3	1,16	17,1	94	100 (Fr.2A)

¹ A massa indicada foi usada na etapa de purificação. ² O peptídeo Hb40-58a purificado foi obtido no estoque do laboratório.

Tabela 08. Caracterização dos peptídeos purificados.

Peptídeo	Caracterização				
	% Pureza		ESI-MS (m/z) obtido (teórico)	Análise de Aminoácidos (teórico)	Conteúdo Peptídico* (%)
	Sistema TEAP	Sistema TFA			
Hb40-61a	90 ^a	97,6^d (principal) 97,2 (Fr.2B) 97,2 (Fr.2A)	804,7 (m/3) (803,91) 603,8 (m/4) (602,75)	K:2,65(3);A:2,13(2);T:1,02(1);G:2,93(3);V:1,03(1);S:1,89(2);P:1,11(1);L:1,05(1);H:1,99(3); F:1,98(2);Q:0,99(1);D:0,87(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO PRINCIPAL K:2,49(3);A:2,08(2);T:0,99(1);G:2,75(3);V:0,95(1);S:1,93(2);P:1,10(1);L:1,06(1);H:1,97(3); F:1,97(2);Q:1,03(1);D:0,88(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO 2A	68,0 (principal) 78,9 (Fr.2A)
	86 ^a	100^d (principal) 96,7 (Fr.2A) 96,5 (fr.2B)	1206,6 (m/2) (1205) 804,8 (m/3) (803) 603,8 (m/4) (602,75)	K:2,59(3);A:2,00(2);T:0,97(1);G:2,90(3);V:1,00(1);S:1,61(2);P:0,94(1);L:0,96(1);H:2,4(3); F:2,10(2);Q:1,10(1);D:0,98(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO PRINCIPAL	70,75 (principal)
ent-Hb40-61a	86 ^a	99^d (principal) 98 (Fr.2A) e 98 (Fr.2B)	804,8 (m/3) (803) 603,9 (m/4) (602,75)	K:2,58(3);A:1,97(2);T:0,94(1);G:2,84(3);V:1,0(1);S:2,0(2);P:0,99(1);L:0,93(1);H:2,45(3); F:2,08(2);Q:1,08(1);D:0,98(1);Y:0,98(1) – FRAÇÃO PRINCIPAL	66,7 (principal)
FAMHb40-61a	91 ^b	98,8^e (principal) 97,6 (Fr.2A) 99,3 (Fr.2B)	693,6 (m/4) (692,5) 555,3 (m/5) (554,0)	K:2,79(3);A:2,14(2);T:0,97(1);G:2,83(3);V:1,0(1);S:1,89(2);P:1,08(1);L:1,03(1);H:2,12(3); F:1,96(2);Q:1,1(1);D:0,97(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO PRINCIPAL K:2,86(3);A:2,17(2);T:0,99(1);G:2,94(3);V:1,09(1);S:1,92(2);P:1,22(1);L:1,06(1);H:2,06(3); F:1,94(2);Q:1,09(1);D:0,96(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO 2A K:2,76(3);A:2,12(2);T:0,9(1);G:2,8(3);V:0,93(1);S:1,79(2);P:1,04(1);L:1,06(1);H:2,34(3); F:1,94(2);Q:1,09(1);D:0,93(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO 2B	60,0 (principal) 57,6 (Fr2A) 49,2 (Fr2B)
	96 ^b	99,85^e (principal)	924,2(m/3) (923,34) 693,4 (m/4) (692,5) 555,0 (m/5) (554,0)	K:2,84(3);A:2,10(2);T:0,99(1);G:2,93(3);V:1,0(1);S:1,77(2);P:1,10(1);L:1,02(1);H:2,59(3); F:1,98(2);Q:1,1(1);D:0,98(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO PRINCIPAL	70,6 (principal)
Hb40-58a	94 ^c	99,81 ^f	2156,08 (m/1) (2155,42)	K:1,83(2);A:1,05(1);T:0,98(1);G:1,97(2);V:1,02(1);S:1,88(2);P:1,10(1);L:1,05(1);H:2,12(3); F:1,97(2);Q:1,03(1);D:0,91(1);Y:1,00(1) – FRAÇÃO 2A	72,5 (Fr.2A)

Condições de análise por RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, λ: 210nm, fluxo: 1mL/min. ^a: solvente A: TEAP, B: 50%ACN/TEAP e gradiente linear: 2 a 62% de B em 30min, ^b: solventes A: TEAP, B: 50%ACN/TEAP e gradiente linear: 12 a 72% de B em 30min, ^c: solvente A: TEAP, B: 40%ACN/TEAP e gradiente linear: 30 a 60% de B em 30min, ^d: solvente A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O e gradiente linear: 12 a 72% de B em 30min, ^e: solvente A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O e gradiente linear: 35 a 65% de B em 30min, ^f: solvente A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O e gradiente linear: 20 a 50% de B em 30min. *Cálculo baseado nos valores encontrados para tirosina.

Figura 16. Perfil de RP-HPLC do Hb40-61a bruto, purificado em TEAP e frações purificadas principal, secundária A e secundária B da síntese em Rink Amida. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. **A:** Hb40-61a Bruto, **B:** Hb40-61a purificado em TEAP, **C:** Hb40-61a fração principal final, **D:** Hb40-61a fração secundária A final, **E:** Hb40-61a fração secundária B final.

Figura 17. Perfil de RP-HPLC da primeira clivagem de Hb40-61a bruto sintetizado na CLEAR-amida, purificado em TEAP e frações purificadas principal, secundária A e secundária B. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. **A:** Hb40-61a Bruto, **B:** Hb40-61a purificado em TEAP, **C:** Hb40-61a fração principal final, **D:** Hb40-61a fração secundária A final, **E:** Hb40-61a fração secundária B final.

comprovação da presença do peptídeo desejado e análise da qualidade do produto, as frações purificadas (principal, secundária A e secundária B) foram analisadas por (LC-ESI/MS) (**Figura 18 e 19**).

4.1.3 Peptídeo FAM-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH₂ (FAM-Hb40-61a)

Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos, purificado em TEAP e das frações obtidas após repurificação/ dessalinização no sistema TFA da primeira e segunda clivagem, respectivamente estão nas **Figuras 20 e 21**. Os dados da caracterização química mostrados nas **Figuras 22 e 23** confirmam a identidade dos purificados e revelam as suas porcentagens de pureza e conteúdo peptídicos.

4.1.4 Peptídeo D- KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH₂ (*ent*-Hb40-61a)

Os perfis cromatográficos obtidos do peptídeo bruto, dessalinizado no sistema TFA e das frações secundárias estão disponíveis na **Figura 24**. A caracterização do produto final obtido foi feita em LC-ESI/MS e é mostrada na **Figura 25**.

4.2 Bioensaios

4.2.1 Atividade Antibacteriana

O Hb40-61a foi testado frente às cepas bacterianas disponíveis em nosso laboratório e de grande importância clínica: *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). No entanto, nas concentrações testadas, o peptídeo não se mostrou ativo (**Tabela 09**), confirmando nossa observação anterior para *E. coli* D31 (FOGAÇA *et al.*, 1999) e revelando uma nova para *S. aureus*.

Tabela 09. Resultados da atividade antibacteriana frente à *E. coli* e *S. aureus*.

Peptídeo	MIC (μM)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Hb40-61a	>100,0	>100,0

Figura 18. Cromatograma (A) e Espectro de Massas do componente principal do Hb40-61a purificado, fração principal (B) da síntese em Rink Amida. Condições de LC-ESI/MS: solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 0,2mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, capilar: 3kV, cone: 37kV, modo de ionização: ES⁺. Com Z=+4 e +3 respectivamente.

Figura 19. Cromatograma (A) e Espectro de Massas do componente principal do Hb40-61a sintetizado na CLEAR-amida purificado, fração principal (B). Condições de LC-ESI/MS: solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 0,2mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, capilar: 3kV, cone: 37kV, modo de ionização: ES⁺. Com Z=+4, +3 e +2 respectivamente.

Figura 20. Perfil de RP-HPLC da primeira clivagem de FAM-Hb40-61a bruto, purificado em TEAP e frações purificadas principal, secundária A e secundária B. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. **A:** FAM-Hb40-61a Bruto, **B:** FAM-Hb40-61a purificado em TEAP, **C:** FAM-Hb40-61a fração principal final, **D:** FAM-Hb40-61a fração secundária A final, **E:** FAM-Hb40-61a fração secundária B final.

Figura 21. Perfil de RP-HPLC da segunda clivagem de FAM-Hb40-61a bruto, purificado em TEAP e frações purificadas principal, secundária A e secundária B. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. **A:** FAM-Hb40-61a Bruto, **B:** FAM-Hb40-61a purificado em TEAP, **C:** FAM-Hb40-61a fração principal final.

Figura 22. Cromatograma (A) e Espectro de Massas do pico principal do FAMHb40-61a purificado (B), fração principal (primeira clivagem). Condições de LC-ESI/MS: solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 0,2mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, capilar: 3kV, cone: 37kV, modo de ionização: ES⁺. Com Z=+5, +4 e +3 respectivamente.

Figura 23. Cromatograma (A) e Espectro de Massas do pico principal do FAMHb40-61a purificado (B), fração principal (segunda clivagem). Condições de LC-ESI/MS: solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 0,2mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, capilar: 3kV, cone: 37kV, modo de ionização: ES⁺. Com Z=+5, +4 e +3 respectivamente.

Figura 24. Perfil de RP-HPLC da primeira clivagem de *ent*-Hb40-61a bruto, purificado em TEAP e frações purificadas principal, secundária A e secundária B. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min. **A:** *ent*-Hb40-61a Bruto, **B:** *ent*-Hb40-61a purificado em TEAP, **C:** *ent*-Hb40-61a fração principal final, **D:** *ent*-Hb40-61a fração secundária A final, **E:** *ent*-Hb40-61a fração secundária B final.

Figura 25. Cromatograma (A) e Espectro de Massas do pico principal do *ent*-Hb40-61a purificado (B), fração principal (primeira clivagem). Condições de LC-ESI/MS: solventes A: 0,1%TFA/H₂O e B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 0,2 mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Com Z= +4 e +3 respectivamente.

4.2.2 Atividade Antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica do Hb40-61a, FAM-Hb40-61a e *ent*-Hb40-61a foram feitos frente às novas cepas de *Candida* agora disponíveis em nosso laboratório: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. As MICs obtidas se encontram listadas na **Tabela 10**, sendo que todas elas foram corrigidas pelos conteúdos peptídicos dos purificados testados.

A redução na atividade do FAM-Hb40-61a em relação ao Hb40-61a possivelmente se deu devido à inserção de um grupamento carboxifluoresceína no peptídeo, que além de acrescentar um elemento hidrofóbico à molécula anfipática, ainda elimina a carga positiva do grupo amino terminal, diminuindo assim a sua afinidade pela membrana celular carregada negativamente. A mesma diferença foi observada para os peptídeos de leucina (KLGKKLG)₃ e (KLAKKLA)₃, que quando testados frente a *Escherichia coli* apresentaram MIC igual a 4 μ M, mas quando marcados com carboxifluoresceína esse valor aumentou para 6 μ M (JAVADPOUR e BARKLEY, 1997).

Tabela 10. MICs dos Hb40-61a, FAMHb40-61a, *ent*-Hb40-61a e Hb40-58a frente à *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* disponíveis.

Peptídeo	Sequência	MIC (µM)		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	6,25-12,5	25,0-50,0	6,25-12,5
FAM-Hb40-61a	FAM-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	12,5-25,0	50,0-100,0	25,0-50,0
D-Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	6,25-12,5	25,0-50,0	6,25-12,5
Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGH-NH ₂	25,0-50,0	50,0-100,0	25,0-50,0

O Hb40-58a já era disponível em nosso laboratório, obtido em trabalho anterior (NOGUEIRA, 2007). A redução da sua atividade em relação ao Hb40-61a pode estar associada a uma desestruturação da porção C-terminal do primeiro. De fato, o hidrogênio do grupo amida terminal (Lys⁶¹) no Hb40-61a faz uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio do resíduo de Gly⁵⁷, restringindo a liberdade conformacional desta porção (MACHADO *et al.*, 2007).

O fato das MICs dos três peptídeos testados serem maiores para *C. krusei* do que para *C. albicans* e *C. parapsilosis* e as duas últimas apresentarem resultados semelhantes entre si, corrobora com dados de Joly e colaboradores, que determinaram a atividade antimicrobiana da β -defensina humana 2 (HBD-2) contra diversos microrganismos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. O resultado foi uma MIC de 9,4 µg/mL, 9,3 µg/mL e 12,2 µg/mL respectivamente. Por outro lado, os mesmos autores verificaram que a β -defensina humana 3 (HBD-3) foi mais eficaz contra *C. krusei* do que contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* (MICs: 2,0 µg/mL, 3,2 µg/mL e 3,0 µg/mL respectivamente) (JOLY *et al.*, 2004). De qualquer forma, parece evidente que as interações de um AMP com a parede celular ou membrana plasmática de *C. albicans* e *C. parapsilosis* são parecidas entre si e que elas divergem daquelas estabelecidas com as de *C. krusei*.

Em relação ao *ent*-Hb40-61a, espera-se que ele assuma conformação equivalente, mas imagem especular à do L-Hb40-61a. Assim, se para esta hemocidina exercer sua atividade antifúngica for necessário um contato quiral com algum

componente da parede celular ou membrana plasmática da levedura, o análogo D deve ser inativo. Por outro lado, se a interação do peptídeo com a parede celular ou membrana plasmática envolver apenas componentes aquirais ou interações hidrofóbicas ou eletrostáticas, o isômero D é ser ativo contra as células testadas (WADE *et al.*, 1990). O *ent*-Hb40-61a mostrou-se tão ativo quanto seu análogo L, indicando que a sua ação não depende de interações com centros quirais. Este resultado: (i) corrobora estudos feitos com outros peptídeos antimicrobianos, como a cecropina e magainina 2 cujos análogos foram equipotentes a eles (OREN e SHAI *et al.*, 1998); (ii) exclui a possibilidade de mecanismo de ação via receptor estereoespecífico da célula.

4.2.3 Atividade Antifúngica em meio tamponado (KACPRZYK *et al.*, 2007)

Foram escolhidos os pHs 5,5 e 7,4 por se tratarem de pH fisiológicos. Além disso, dependendo da atividade apresentada pelo peptídeo, seria possível revelar algumas características necessárias à sua ação antifúngica. De fato, o Hb40-61a deve apresentar carga líquida +6 em pH 5,5 (3 His, 3 Lys, 1 Glu, cujos pKas das cadeias laterais são 6,04, 10,54 e 3,90, respectivamente, além do grupamento amino terminal), enquanto em pH 7,4 esta carga líquida diminui para +3 devido à desprotonação das cadeias laterais da histidinas. Assim, o peptídeo, adquire caráter menos catiônico e tem sua atividade prejudicada pelo aumento do pH, como mostra a **Tabela 11**. Em meio tamponado em pH 5,5, o Hb40-61a manteve sua atividade apresentada em meio PDB (pH 5,6 $\pm$ 0,2), revelando que a pequena alteração na força iônica do meio não foi capaz de afetá-la.

Tabela 11. MICs do Hb40-61a frente à diferentes cepas de *Candida* em pH 5,5 e 7,4.

Cepas	MIC (μ M) em pH 5,5	MIC (μ M) em pH 7,4
<i>C. albicans</i>	6,25-12,5	12,5-25,00
<i>C. krusei</i>	25,0-50,0	50,0-100,0
<i>C. parapsilosis</i>	6,25-12,5	12,5-25,0

Estes resultados revelam a importância da protonação das três histidinas no mecanismo de ação do Hb40-61a, já que quanto maior sua carga líquida positiva, maior a sua atividade. Tal fato corrobora a proposta de interação eletrostática dos AMPs

catiônicos com as paredes e membrana celulares de *Candida* e com estudos de AMPs ricos em histidina que descrevem o mesmo comportamento: queda de atividade em pH 7,4 e restauração do efeito em pH 5,5 (LEE *et al.*, 1997; KACPRZYK *et al.*, 2007).

4.2.4 Atividade Fungicida

Os resultados descritos na **Tabela 12** mostram que as mínimas concentrações fungicidas (MCF) dos peptídeos em estudo são idênticas às concentrações em que os mesmos inibem o crescimento. A ação fungicida rápida já havia sido relatada para o Hb40-61a (MACHADO *et al.*, 2007) e é condizente com o observado para outros AMPs (HANCOCK *et al.*, 2001), sugerindo morte via permeabilização de membranas celulares (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2001).

4.2.5 Efeito da força iônica do meio na atividade dos peptídeos estudados

É consolidado na literatura que os AMPs tem sua atividade altamente afetada pela força iônica do meio (KANDASAMY e LARSON, 2006). Assim, os peptídeos Hb40-61a, FAM-Hb40-61a, *ent*-Hb40-61a e Hb40-58a foram ensaiados em presença de 0,9% de NaCl (condição próxima a fisiológica). Em todos os casos eles se mostraram inativos até 100 µM (**Tabela 13**).

Tabela 12. Mínimas concentrações fungicidas dos Hb40-61a, FAM-Hb40-61a, *ent*-Hb40-61a e Hb40-58a purificados frente à *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* disponíveis.

Peptídeo	Sequência	MCF (µM)		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	12,5	50,0	12,5
FAM-Hb40-61a	FAM-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	25,0	100,0	50,0
D-Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH ₂	12,5	50,0	12,5
Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGH-NH ₂	50,0	100,0	50,0

Tabela 13. MICs dos Hb40-61a, FAMHb40-61a, *ent*-Hb40-61a e Hb40-58a purificados frente a *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* em presença de 0,9% de NaCl.

Peptídeo	MIC (μM) ^a		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Hb40-61a	>100	>100	>100
FAM-Hb40-61a	>100	>100	>100
<i>ent</i> -Hb40-61a	>100	>100	>100
Hb40-58a	>100	>100	>100

^a Mínima concentração inibitória. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de diluição em caldo segundo Fehlbauer *et al.* (1994), em meio PDB com adição de 0,9% de NaCl.

4.2.6 Ensaio Hemolítico

Além de apresentar ação antifúngica e fungicida potentes, é importante que o peptídeo não seja prejudicial ao organismo infectado. Dessa forma, a atividade hemolítica é um ensaio comumente utilizado para avaliar a toxicidade de compostos com potencial de uso terapêutico. O índice terapêutico (TI) de AMPs é dado pela razão MHC/MIC, sendo MHC a mínima concentração que causa hemólise em dada porcentagem e MIC a mínima concentração inibitória. Assim, infere-se que existem três maneiras de aumentar o TI: aumentar a atividade antimicrobiana (diminuindo a MIC), diminuir a hemólise (aumentando a MHC) ou a combinação das duas (diminuir MIC e aumentar MHC) (CHEN *et al.*, 2005).

Neste contexto, os peptídeos Hb40-61a, *ent*-Hb40-61a, FAM-Hb40-61a e Hb40-58a tiveram suas atividades hemolíticas avaliadas em duas condições distintas: (1) a normalmente utilizada alta força iônica com tampão PBS (simulando condições isotônicas) e que pode mascarar a toxicidade, já que AMPs tem sua atividade influenciada pela força iônica do meio; (2) a de baixa força iônica com osmolaridade corrigida com glicose (tampão IGP), necessária para indicar a verdadeira toxicidade do composto (VELDHUIZEN *et al.*, 2008). Em ambos os casos, os peptídeos se mostraram pouco tóxicos aos eritrócitos humanos mesmo em altas concentrações (para 100 μM , menor que 25% em IGP e próximo de 0% em PBS) como mostra a **Figura 26**. O FAM-Hb40-6a apresenta a maior porcentagem de hemólise (menos de 27% em 100 μM), o que pode ser devido à inserção do grupamento carboxifluoresceína, que além de eliminar uma carga positiva (N-terminal), torna a moléculas mais hidrofóbica. Isso

favorece a interação do peptídeo com células mamíferas zwitteriônicas. Assim, foi possível concluir que tais hemocidinas sintéticas são capazes de exercer sua ação sem causar grandes danos às células sanguíneas de um potencial usuário.

Figura 26. Eritrócitos humanos submetidos a tratamento com diluições seriadas de peptídeos por 1h à 37°C. (A) Hb40-61a; (B) *ent*-Hb40-61a; (C) FAM-Hb40-61a e (D) Hb40-58a.

O cálculo do TI, neste caso, foi definindo o MHC como a concentração de peptídeo que causa 10% de hemólise, como já feito em nossos trabalhos anteriores com gomesina (TI= 0,61; FÁZIO *et al.*, 2006). Os valores que se encontram na **Tabela 14**, revelam que o Hb40-61a e *ent*-Hb40-61a apresentaram o mesmo TI (0,5) e tem maior potencial terapêutico que os FAM-Hb40-61a e Hb40-58a, também com o mesmo índice (0,25).

4.2.7 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* por Hb40-61a

Com o objetivo de determinar a viabilidade celular na presença do Hb40-61a, foi utilizado o kit *Live/Dead Funga Light*® da Invitrogen, que emprega dois marcadores de ácido nucleico: *Syto 09*, capaz de permeabilizar membranas plasmáticas intactas ou danificadas, corando-as de verde; iodeto de propídio (IP), capaz de internalizar apenas as danificadas, corando-as de vermelho (JIN *et al.*, 2005).

Tabela 14. Valores de índice terapêutico dos peptídeos estudados para *C. albicans*.

Peptídeo	Índice Terapêutico ^a
Hb40-61a	0,5
ent-Hb40-61a	0,5
FAM-Hb40-61a	0,25
Hb40-58a	0,25

^aValores definidos como concentração de peptídeo que causa 10% de hemólise (FAZIO *et al.*, 2006).

Os resultados mostraram que, em apenas 1 h de incubação e já na metade da MIC, algumas células têm a integridade da membrana plasmática comprometida e que o número delas aumenta gradativamente com o aumento da concentração do peptídeo, como pode ser visualizado na **Figura 27**. No controle positivo (2-propanol), ambos os marcadores penetraram a célula e marcaram seu DNA, já no controle negativo (meio PDB), o IP não foi capaz de permeabilizar as células. Estes dados indicam que o peptídeo, de fato, exerce sua ação fungicida via permeabilização/ danos na membrana plasmática da *C. albicans*.

4.2.8 Ação antifúngica do FAM-Hb40-61a monitorada por microscopia confocal de varredura a laser

Prosseguindo os estudos do modo de ação do Hb40-61a, seu análogo marcado com 5 (6) carboxifluoresceína, FAM-Hb40-61a, foi utilizado para investigar o comportamento deste peptídeo frente às células de *Candida*: se o seu alvo primário seria a membrana plasmática ou intracelular. O tratamento de células de *C. albicans* por 15 minutos com o peptídeo fluorescente mostrou que, de fato, em ½ MIC (12,5 µM) o peptídeo deposita-se ao redor da célula, aparentemente na membrana plasmática e, na

Figura 27. Análise em Microscópio de Fluorescência de células de *C. albicans* (10^6 células) incubadas com diferentes concentrações de peptídeo a 37°C por 1h e depois com o kit Live/Dead Funga Light por 30 minutos.

MIC (25 μM), como mostra a **Figura 28**, todo ele foi internalizado. Resultados similares têm sido descritos para os AMPs ou hemocidinas similares, sugerindo que eles exercem a sua função antimicrobiana via permeabilização/ dano na membrana plasmática.

Figura 28. Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células de *C. albicans* tratadas por 15 min com (A) 25 μM e (B) 12,5 μM de FAM-Hb40-61a a 37°C.

4.2.9 Análise por *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) da ação do FAM-Hb40-61a

Tais análises de células de *C. albicans* tratadas com o análogo fluorescente foram feitas na tentativa de quantificar o efeito acima descrito. Os resultados são mostrados na **Figura 29**. A sua análise estatística revelou que na metade da MIC o peptídeo marcado está presente em cerca de 75% das células e que na MIC tal valor é de 97%. Assim sendo, foi possível concluir que para inibir totalmente o crescimento celular ou matar as células de *C. albicans*, o peptídeo precisa estar distribuído na célula.

Quando investigada a influência da temperatura (4°C) no processo de permeabilização de membrana, já que a mesma é capaz de influenciar a sua fluidez, verificou-se que não há alteração de atividade antifúngica, pois 97% das células ainda são marcadas, como no controle positivo. Tal fato também foi observado para o peptídeo buforina quando testado nas mesmas condições (TAKESHIMA *et al.*, 2003).

Em relação ao uso de azida (NaN_3), também foi testada a possibilidade da ação do FAM-Hb40-61a ser dependente do metabolismo energético (via transporte ativo), uma vez que esta substância é um inibidor do Complexo IV da cadeia transportadora de elétrons e assim inibiria a síntese de ATP. Entretanto, vale salientar que as leveduras

Figura 29. Análise por FACS de células de *C. albicans* tratadas com FAM-Hb40-61a. *C. albicans* na fase log tardia foram lavadas com tampão PBS, ressuspensas no mesmo tampão e incubadas a 37°C por 15 min. em meio PDB (A) como controle, (B) 12,5 μ M, (C) 25 μ M de peptídeo, (D) 25 μ M de peptídeo a 4°C, (E) 25 μ M de peptídeo em presença de 0,05% de azida sódica e (F) 25 μ M de peptídeo em presença de 0,09% de NaCl.

do gênero *Candida* são facultativas, então ainda haveria uma pequena produção de ATP via fermentação.

A atividade do peptídeo foi parcialmente afetada (86% de células marcadas contra 97% do controle positivo), resultado que pode ser associado à rigidificação da membrana de *C. albicans* provocada pela azida e como já relatado AMPs como a Histatina 5. Neste caso, os autores especularam que o citoesqueleto de actina (que requer suprimento contínuo e substancial de ATP) seja o responsável por isso, uma vez que o uso do inibidor de citoesqueleto jasplakinolida (que promove a polimerização de actina) também induz resistência à Histatina 5. Desse modo, não a depleção de ATP, mas a alteração no estado físico da membrana plasmática, como demonstrado pelo aumento de fluorescência do DPH, pode ter causado resistência ao AMP (VEERMAN *et al.*, 2007).

Uma vez que nos ensaios antifúngicos os peptídeos tiveram suas atividades prejudicadas em meio de alta força iônica, também investigamos a influência de 0,9% de NaCl na ação antifúngica do FAM-Hb40-61a. Os resultados estão de acordo com os dados de atividade antifúngica obtidos com o Hb40-61a, uma vez que sua ação mostrou-se afetada pela alta força iônica do meio, sendo internalizado apenas 37% do peptídeo. Observações similares foram feitas para diversos AMPs catiônicos (KANDASAMY e LARSON, 2006).

4.2.10 Capacidade do Hb40-61a de alterar o potencial de membrana plasmática de *C. albicans*

O ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico), DiBAC₄ (5) é um fluoróforo que pertence à classe de corantes aniônicos, possui sensibilidade em alta voltagem e internaliza apenas células despolarizadas e, por isso vem sendo utilizado para estimar a viabilidade ou dano de membranas em leveduras e bactérias de maneira rápida por citometria de fluxo (SAAR *et al.*, 2005; ATTFIELD, *et al.*, 2000).

Diante dos resultados obtidos com o Hb40-61a, realizamos experimentos com o DiBAC₄ (5). Os resultados apresentados na **Figura 30** mostram que, comparado ao controle (sem peptídeo), o Hb40-61a modifica as funções celulares de *C. albicans*.

Figura 30. Análise por FACS de *C. albicans* tratadas com Hb40-61a e DiBAC₄ (5). As células (10^6 células) foram incubadas a 37°C por 1 ou 2 h com diferentes concentrações de peptídeo ou por 20 min com 2,4-dinitrofenol (DNP) como controle positivo e todas elas foram tratadas por 5 min com DiBAC₄ (5) em meio PDB.

Observa-se que ele apresenta comportamento semelhante a melitina, um AMP que exerce a sua função via formação de poros na membrana celular (MATSUZAKI *et al.*, 1997) e ao 2,4-dinitrofenol (DNP), capaz de associar-se aos H^+ externos a membrana mitocondrial e, por ser uma molécula hidrofóbica, internalizar a mitocôndria liberando os prótons, dissipando assim o potencial transmembrana (MARZZOCO E TORRES, 2007). Dessa forma, foi possível concluir que o Hb40-61a, de alguma maneira, talvez pela formação de poros, altera o potencial da membrana plasmática de *C. albicans* e leva à sua morte. Tal conclusão encontra suporte nos resultados obtidos em trabalho feito em colaboração com o nosso grupo de pesquisa no qual vesículas gigantes formadas a por fosfolipídeos de lecitina e fosfatidil glicerol (PC:PG; 7:3 p/p) tratadas com Hb40-61a.

4.2.11 Medida da fluorescência da membrana plasmática de *C. albicans* tratadas com Hb40-61a

Na tentativa de confirmar a alteração da fluidez da membrana plasmática da célula fúngica, portanto, a sua dinâmica pelo tratamento com Hb40-61a, foi realizado experimento usando a sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, **Figura 31**). Esta tem sido muito utilizada em estudos de membranas celulares devido a sua estrutura alongada e propriedades apolares, que tornam possível o alinhamento da molécula paralelamente às cadeias fosfolipídicas, associando-se à cauda de hidrocarboneto dos fosfolipídeos sem perturbar a estrutura da bicamada lipídica (VINCENT *et al.*, 2004). Caso o peptídeo causasse alguma alteração na membrana, o DPH não seria capaz de inserir-se na bicamada (SUNG *et al.*, 2008).

Figura 31. Estrutura do 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).

Os resultados obtidos por espectrofluorimetria (**Figura 32**) mostraram que o aumento da concentração de peptídeo causou uma queda significativa da fluorescência. Possivelmente por supressão da mesma devido a alteração do ambiente

da sonda. Caso o peptídeo tenha formado poros na membrana e permitido a livre passagem de íons e moléculas, a água pode ter ocasionado a atenuação da fluorescência.

Figura 32. Fluorescência do DPH após adição de melitina ou Hb40-61a à células de *C. albicans* (2×10^6) com concentrações crescentes de Hb40-61a, incubadas por 1 h a 37°C seguido de DPH por 45 minutos na mesma temperatura.

O mesmo ocorreu com o controle positivo de melitina, um AMP conhecido por amplo espectro de ação e formação de poros em membranas plasmáticas (MATSUZAKI *et al.*, 1997), sugerindo que o Hb40-61a exerce sua atividade antifúngica pela formação de poros na membrana plasmática, causando a liberação ou lise dos constituintes celulares que acarreta a morte celular.

Nossas observações são similares àsquelas descritas por Park e Lee, que estudaram o efeito fungicida da arecina-1, um AMP em estrutura de folha b-pregueada isolado de organismo marinho de carga líquida +6, mas contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como é o caso do Hb40-61a.

4.2.12 Análise topográfica das células de *C. albicans* expostas ao Hb40-61a

Os dados até aqui relatados e trabalhos da literatura (MEINCKEN *et al.*, 2005) nos estimularam a tentar visualizar o efeito da hemocidina em estudo na superfície da célula de levedura. O método de análise escolhido foi a AFM. Os resultados descritos a seguir ainda são preliminares e precisam ser confirmados.

As imagens das células não tratadas (**Figura 33A e 33B**) revelaram uma morfologia esférica com superfície lisa, glabra, sem poros ou rupturas e tamanho médio de $4,0 \times 6,0 \mu\text{m}$, tal como é esperado para *C. albicans* crescidas em meio Sabouraud (THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2012). As células tratadas com $62,5 \mu\text{M}$ de Hb40-61a (**Figura 33C**), apresentaram tamanho médio inferior em relação as não tratadas e uma morfologia irregular, característica de lesão na parede celular ou membrana plasmática. Além disso, é possível observar claramente uma grande quantidade de vesículas liberadas por possível extravazamento de conteúdo intracelular ou peptídeos agregados, com uma faixa de tamanho entre $70,0 - 190,0 \text{ nm}$. Curiosamente, tais vesículas ou peptídeos agregados parecem estar concentrados nas extremidades apicais da célula, tal como já observado para outros peptídeos catiônicos por AFM (MEINCKEN *et al.*, 2005).

4.3 Ensaios com recobrimento de nanopartículas aniônicas de PSS com o AMP catiônico Hb40-58a

4.3.1 Determinação da distribuição de tamanho, diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas de PSS livres e do arranjo PSS-Hb40-58a

É possível observar na **Figura 34** que a partícula livre apresenta diâmetro 150 nm e potencial zeta negativo (-24 mV) bem como os arranjos com concentração crescentes do Hb40-58a apresentam diâmetros iniciais relativamente grandes e instáveis (893 e 841 nm), mas que se estabilizam após a adição de $30 \mu\text{g/mL}$ de Hb40-58a (por volta de 150 nm) e potenciais zeta iniciais positivos baixos ($0,6$ e 1 mV), mas estáveis após a adição de $30 \mu\text{g/mL}$ do peptídeo (em torno de 16 mV). Estes parâmetros são indicativos da adsorção do Hb40-58a catiônico (carga líquida $+5$) na nanopartícula aniônica. É importante salientar que valores de potencial zeta próximos de $\pm 30 \text{ mV}$ caracterizam soluções coloidais com estabilidade moderada. A observação de que o arranjo PSS-Hb40-58a passam a ser estáveis e homodispersos após a adição de $30 \mu\text{g/mL}$ de Hb40-58a nos levou a eleger esta concentração como a que produz melhor proporção entre ele e as nanopartículas.

A **Figura 35** apresenta o efeito da concentração de Hb40-58a sobre o diâmetro médio, potencial zeta e polidispersidade para os arranjos PSS-Hb40-58a. Observa-se que por volta de 15 $\mu\text{g/mL}$ de Hb40-58a ocorre a máxima agregação das nanopartículas

Figura 33. Imagens topográficas de células de *C. albicans* (A) não tratadas (tamanho de varredura de 30 μm); (B) não tratadas (tamanho de varredura 9 μm e (C) tratadas com 62,5 mM de Hb40-61a por 1 h à 37°C (tamanho de varredura de 9 μm).

Figura 34. Distribuição de tamanho para nanopartículas de PSS com (A) 0 (B) 10 (C) 20 (D) 30 (E) 40 (F) 50 (G) 60 e (H) 80 $\mu\text{g/mL}$ de Hb40-58a.

Figura 35. Diâmetro médio (Dz), potencial zeta (ζ) e polidispersidade de PSS-Hb40-58a em diferentes concentrações.

evidenciada pelo aumento máximo do diâmetro médio e polidispersidade da dispersão. Além disso, a neutralização de cargas foi verificada através de um potencial-zeta igual a zero na mesma concentração de peptídeo. Isso ocorre porque os arranjos passam a ter carga líquida igual a zero, portanto, não há repulsão entre as mesmas, favorecendo a

agregação. Quando as partículas têm cargas, atuam forças de repulsão entre as mesmas, repelindo-as e espalhando-as. Por isso, depois da neutralização, o diâmetro médio das partículas retornou ao valor próximo dos valores iniciais com reversão do potencial zeta, agora positivo, indicando o recobrimento das nanopartículas aniônicas pelo Hb40-58a.

Em suma, confirmamos por duas maneiras a adsorção do Hb40-58a às nanopartículas de PSS: aumento do Dz das nanopartículas e inversão de sua carga líquida. Seria ainda interessante construir uma isoterma de adsorção, o que está sendo feito.

4.3.2 Atividade antifúngica do PSS-Hb40-58a

O PSS-Hb40-58a obtido teve a sua atividade antifúngica determinada para comparação com o peptídeo livre frente à *C. albicans*, tem sido observado o aumento de sua MIC de 50 μ M para 100 μ M. As nanopartículas de PSS não apresentaram atividade antimicrobiana.

Ainda assim, pode-se considerar que este seja um resultado positivo em termos da disponibilidade do peptídeo em relação ao meio, pois ligado à nanopartícula de PSS o peptídeo está mais concentrado e disponível para exercer sua atividade.

4.3.3 Ensaio hemolítico para PSS-Hb40-58a

Para apresentar potencial de uso como veículo de transporte do Hb40-58a, as nanopartículas de PSS contendo o peptídeo adsorvido não podem ser tóxicas ao hospedeiro. Por isso, foi feito o ensaio hemolítico em alta e baixa força iônica para o PSS-Hb40-58a (**Figura 36**). Estes dados, junto à atividade antimicrobiana tornou possível o cálculo do índice terapêutico (**Tabela 15**). As nanopartículas não apresentaram atividade hemolítica.

Figura 36. Eritrócitos humanos submetidos a tratamento com diluições seriadas do arranjo PSS-Hb40-58a por 1 h à 37°C.

Tabela 15. Índice terapêutico para PSS-Hb40-58.

Composto	Índice terapêutico
PSS-Hb40-58a	0,25

Observa-se que, apesar da porcentagem de hemólise para PSS-Hb40-58a (em torno de 16% em 100 μM) ser menor do que para o Hb40-58a livre (em torno de 20% em 100 μM), a MIC do primeiro (100 μM) é o dobro do que o livre (50 μM), igualando assim o índice terapêutico de ambos (TI= 0,25).

4.3.4 Ensaio de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* por PSS-Hb40-58a

Como meio de investigar seu mecanismo de ação e o efeito da ligação às nanopartículas de poliestireno, foi realizado o ensaio de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans*. O resultado foi a comprovação de dano à membrana celular da levedura causado tanto por Hb40-58a livre quanto por PSS-Hb40-58a nas suas respectivas MICs após 2 h (**Figura 37**). Este é um indicativo que a ligação do peptídeo ao PSS não alterou o mecanismo de ação do Hb40-58a livre e nem depletou seu efeito.

Figura 37. Análise em Microscópio de Fluorescência de células de *C. albicans* (10^6 células) incubadas com Hb40-58a (50 μ M) ou PSS-Hb40-58a (100 μ M) a 37°C por 1h e depois com o kit Live/Dead Funga Light por 30 minutos.

4.3.5 Medida preliminar do diâmetro médio de *C. albicans* após tratamento com AMPs

Foram realizadas medidas do diâmetro médio das células de *C. albicans* antes e após o tratamento por 1 h a 37°C com os peptídeos Hb40-61a, Hb40-58a, PSS-Hb40-58a e melitina nas suas respectivas MICs (12,5; 50,0; 100,0 e 3,1 µM). Os valores estão na **Tabela 16**.

Tabela 16. Diâmetros médios das células de *C. albicans* tratadas com diferentes AMPs.

Peptídeo	Diâmetro médio (µm)
Sem tratamento	5,71 ± 0,4
Hb40-61a	1,68 ± 0,1
Hb40-58a	1,49 ± 0,2
PSS-Hb40-58a	1,56 ± 0,09
Melitina	2,52 ± 0,1

O valor encontrado para as células sem tratamento (5,71 µm) corrobora os valores citados na literatura para a dimensão de células de *C. albicans* crescidas em meio Sabouraud (4,0 x 6,0 µm; THE UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2012). A diminuição do diâmetro das mesmas após o tratamento com os AMPs pode ser associada ao possível extravasamento do conteúdo intracelular provocado pela formação de poros na membrana plasmática e consequente murchamento celular. Estes resultados precisam ser confirmados, porém essa é sabido que o AMP pleurocidina, encontrado na secreção da mucosa do peixe *Pleuronectes americanus*, causou a diminuição/contração das células de *C. albicans*, o que se especulou ser indício de apoptose (CHO e LEE, 2011). Outros AMPs também estão sendo estudados quanto à sua capacidade de induzir apoptose ao invés de necrose em células de *C. albicans*, como é o caso da melitina (PARK e LEE, 2010). Assim, a cinética de morte rápida do Hb40-61a, junto à diminuição do diâmetro das células provocada por ele, nos leva a hipotetizar um possível mecanismo de ação via apoptose, que poderá ser estudado futuramente.

5. Conclusões

As infecções geradas pelo gênero *Candida*, são a quarta causa mais comum de infecção sanguínea nosocomial (ZILBERBERG *et al.*, 2008; PFALLER *et al.*, 2012) e podem levar a óbito cerca de 50% de suas vítimas (COLOMBO *et al.*, 2007). O aumento no número de infecções causadas por fungos em pacientes imunocomprometidos (pelo vírus HIV, por transplantes de órgãos ou recém-nascidos), somado a crescente emergência de cepas resistentes aos antimicóticos presentes no mercado, revelam a necessidade de novas drogas com ação antifúngica/fungicida (LUPETTI *et al.*, 2002).

Os AMPs são candidatos promissores para o tratamento de infecções fúngicas ou para servir de referência para a concepção de novos antibióticos (PETERS, 2010). De fato, eles apresentam mecanismos de ação distintos aos dos agentes hoje utilizados, induzem pouca resistência em microrganismos, possuem amplo espectro de ação, requerem pouco tempo para exercer atividade fungicida e tem a habilidade de regular o sistema imune do hospedeiro (LUPETTI *et al.*, 2002). Por outro lado, os AMPs apresentam alguns entraves para sua utilização, tais como dificuldade de uso em alta força iônica, a possibilidade de degradação por enzimas e o alto custo para sua produção.

Este trabalho enfocou o peptídeo antifúngico Hb40-61a, derivado da cadeia α da hemoglobina bovina, desenvolvido e estudado por nós. Foi concluído que: 1) o Hb40-61a é ativo frente às cepas ATCC de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*; 2) apresenta baixa atividade hemolítica frente à eritrócitos humanos; 3) o *ent*-Hb40-61a é tão ativo frente à *Candida* quanto seu análogo L, excluindo a necessidade de interação quiral para a exibição de atividade; 4) a utilização do FAM-Hb40-61a e técnicas de microscopia confocal e citometria de fluxo foram valiosas para mostrar que em $\frac{1}{2}$ MIC, o peptídeo deposita-se na membrana plasmática e na MIC ele é completamente internalizado; 5) os AMPs em estudo, tem sua função afetada pela alta força iônica do meio; 6) o inibidor metabólico NaN_3 afeta a atividade do Hb40-61a contra *C. albicans*; 7) a baixa temperatura não faz o mesmo; 8) o uso de Syto 09 e iodeto de propídeo revelaram dano progressivo à membrana plasmática das células de *C. albicans* com o aumento da concentração de Hb40-61a; 9) o uso do DiBAC₄ (5) mostrou que o Hb40-61a altera o potencial da membrana plasmática de *C. albicans*; 10) o uso do DPH

evidenciou que o Hb40-61a altera a fluidez da membrana plasmática de *C. albicans*; 11) as células *C. albicans* tem o seu tamanho reduzido após o tratamento com o Hb40-61a sugerindo dano a membrana plasmática por formação de poros e extravasamento do conteúdo intracelular; 12) as imagens das células tratadas e não tratadas com o Hb40-61a por AFM revelaram alterações nas células de *C. albicans*. Esses resultados corroboram os outros obtidos; 13) o arranjo PSS-Hb40-58a apresenta atividade antifúngica e é menos hemolítico.

A busca por formulações alternativas para novos fármacos ou aqueles já disponíveis no mercado é fundamental para torná-los ainda mais eficazes e, por vezes, para reduzir as suas toxicidades, como foi o caso da formulação lipídica coloidal feita para a anfotericina B, um antifúngico muito potente, mas de elevada toxicidade para o hospedeiro.

Tendo em vista os aspectos apresentados, o estudo de peptídeos com atividade biológica é importante não apenas pelo próprio conhecimento científico e potencialidade, como também no auxílio ao desenvolvimento de novas drogas derivatizadas que possuam baixa toxicidade, não tornem os microrganismos resistentes e tenham grande potencial terapêutico.

6. Referências

- ADJE, E. Y.; BALTI, R.; KOUACH, M.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, vol.49, p. 143-153.
- AMBLARD, M. FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols os modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology*. 2006, vol. 33, p. 239-254.
- ATTFIELD, P. V.; KLETSAS, S.; VEAL, D. A.; ROOIJEN, R.; BELL, P. J. L. Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermatation activity of dried yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, vol. 89, p. 207-214.
- BECHINGER, B. LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, vol.1758, p.1529–1539.
- BOZELLI, J. C.; SASAHARA, E. T.; PINTO, M. R. S.; NAKAIE, C. R.; SCHREIER, S. Effect of the head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrticin to lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2012, vol.165, p. 365-373.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005, vol. 2005, p. 238-250.
- BROWN, A. G.; LEITE, R. S.; ENGLER, A. J.; DISCHER, D. E.; STRAUSS III, J. F. A hemoglobin fragment found in cervicovaginal fluid from women in labor potentiates the action of agents that promote contraction of smooth muscle cells. *Peptides*. 2006, vol 27, p. 1794-1800.
- CABRERA, M. P. S.; COSTA, S. T. B.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; RUGGIERO, J. R.; NETO, J. R. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *European Biophysical Journal*. 2008, vol. 37, p. 879-891.

- CALDERON, L. A.; SILVA, A. A. E.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, G. Antimicrobial peptides from *Phyllomedusa* frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino acids*. 2011, vol. 40, p. 29-49.
- CARMONA-REIBEIRO, A. M. Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*. 2010, vol. 5, p. 249-259.
- CATIAU, L. TRAISNEL, J.; CHIHIB, N.-E.; FLEM, G. L.; BLANPAIN, A.; MELNYL, O.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. RYH: a minimal peptidic sequence obtained from β -chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides*. 2011, vol. 32, p. 1463-1468.
- CEDERLUND, A.; GUDMUNDSSON, G. H.; AGERBERTH, B. Antimicrobial peptides important in innate immunity. *FEBS Journal*. 2011, vol. 278, p. 3942-3947.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. Fmoc solid phase peptide synthesis, University Press, Oxford, 2000.
- CHEN, Y.; MANT, C. T.; FARMER, S. W.; HANCOCK, R. E. W.; VASIL, M. L.; HODGES, R. S. Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/ therapeutic index. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, vol. 280, p. 12316-12329.
- CHO, J.; LEE, D. G. Oxidative stress by antimicrobial peptide pleurocidin triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochimie*. 2011, vol. 93, p. 1873-1879.
- CLARKE, A. P.; JANDIK, P.; ROCKLIN, R. D.; LIU, Y.; AVDALOVIC, N. An integrated amperometry waveform for the direct, sensitive detection of amino acids and amino sugars following anion-exchange chromatography. *Analytical Chemistry*. 1999, vol. 71, p. 2774-2781.
- COIN I., BEYERMANN M., BIENERT M. Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Natural Protocols*. 2007, vol. 12, p. 3247-3256.

- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology and predictors of mortality. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2007, vol. 28, p. 570-576.
- CRUSCA JR, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. Influence of N-Terminus Modifications on the Biological Activity, Membrane Interaction, and Secondary Structure of the Antimicrobial Peptide Hylin-a1. *Biopolymers*. 2010, vol. 86, p. 41-48.
- CRUZ, C. E.; FOGAÇA, A. C.; NAKAYASU, E. S.; ANGELI, C.B.; BELMONTE, R.; ALMEIDA, I. C.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M. T. M.; TANAKA, A. S.; BRAZ, G. R.; CRAIK, C. S.; SCHNEIDER, E.; CAFFREY, C. R.; DAFFRE, S. Characterization of proteinaese from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. *Parasites & Vectors*. **2010**, 3, 63.
- CRUZ, C. E.; DAFFRE, S. Imunidade inata no intestino de carrapatos: hemocidinas e outros agentes antimicrobianos. *Revista da Biologia*. 2011, vol. 6, p. 17-21.
- DAOUD, R.; DUBOIS, V.; BORS-DODITA, L.; NEDJAR-ARROUME, N.; KRIER, F.; CHIHIB, N.E.; MARY, P.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 2005, vol. 26, p. 713-9.
- DENG, L.; PAN, X.; WANG, Y.; WANG, L.; ZHOU, X. E.; LI, M.; FENG, Y.; WU, Q.; WANG, B.; HUANG, N. Hemoglobin and its derived peptides may play a role in the antibacterial mechanism of the vagina. *Human Reproduction*. 2009, vol.24, p.211-218.
- DIAMOND, G.; BECJLOFF, N.; WEINBERG, A.; KISICH, K. O. The roles of antimicrobial peptides in innate host defence. *Current Pharmacological Disease*. 2009, vol.15, p.2377-2392.
- EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J.A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-rich

antimicrobial peptides from scorpion blood. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, p. 29537-44.

FÁZIO, M.A.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; MIRANDA, M.T.M.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Biological and Structural Characterization of New Linear Gomesin Analogues with Improved Therapeutic Indices. *Biopolymers*. 2006, vol. 88, p.386-400.

FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W.F.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, vol. 269, p. 33159-63.

FERNANDEZ-LOPEZ, S.; KIM, H.; CHOI, E.C.; DELGADO, M.; GRANJA, J.R.; KHASANOV, L.; KRAEHENBUEHL, K.; LONG, G.; WEINBERGER, D.A.; WILCOXEN, K.M.; GHADIRI, M. R. Antibacterial agents based on the cyclic D,L- α -peptide architecture. *Nature*. 2001, vol. 142, p. 452-455.

FIELDS, G. B. Methods in enzymology. Volume 289. London: Academic press, 1997.

FISCHER, R.; MADER, O.; JUNG, G.; BROCK, R. Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis. *Bioconjugate Chemistry*. 2003, vol. 14, p. 653-660.

FOGAÇA, A.C.; SILVA, P.I. Jr; MIRANDA, M.T.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, p. 25330-25334.

FROIDEVAUX, R.; KRIER, F.; NEDJAR-ARROUME, N.; VERCAIGNE-MARKO, D.; KOSCIARZ, E.; RUCKEBUSCH, C.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters*. 2001, vol. 491, p. 159-63.

GAZIT, E.; LEE, W.J.; BREY, P.T.; SHAI, Y. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry*. 1994, vol. 33, p.10681-10692.

- GOW, N. A. R.; VEERDONK, F. L.; BROWN, A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature*. 2012, vol. 10, p. 112-122.
- GUPTA, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. *Applied Microbiological Biotechnology*., 2002, vol. 58, p. 46-57.
- HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infectious Disease*. 2001, vol. 1, p. 156-164.
- HANCOCK, R. E. W. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infectious Disease*. 2005, vol. 5, p. 209-218.
- HANCOCK, R. E. W.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiological Letters*. 2002, vol. 206, p. 143-149.
- HARRIS, M.; MORA-MONTES, H. M.; GOW, N. A. R.; COOTE, P. J. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology*. 2009, vol. 155, p. 1058-1070.
- HITCHCOCK, C. A.; PYE, G. W.; TROKE, P. F.; JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993, vol. 37, p. 1962-1965.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, vol. 1778, p. 357-375.
- HU, J.; XU, M.; HANG, B.; WANG, L.; WANG, Q.; CHEN, J.; SONG, T.; FU, D.; WANG, Z.; WANG, S.; LIU, X. Isolation and characterization of an antimicrobial peptide from bovine hemoglobin α -subunit. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, vol. 27, p. 767-771.
- HUANG, H.W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*. 2000, vol. 39, p.8347-8352.

- HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*. 1980, vol. 106, p. 7-16.
- JAVADPOUR, M. M.; BARKLEY, M. D. Self-assembly of designed antimicrobial peptides in solution and micelles. *Biochemistry*. 1997, vol. 36, p. 9540-9549.
- JIN, Y.; ZHANG, T.; SAMARANAYAKE, Y. H.; FANG, H. H. P.; YIP, H. K.; SAMARANAYAKE, L. P. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilm. *Mycopathologia*. 2005, vol. 159, p.353-360.
- JOLY, S.; MAZE, C.; MCGRAY, P. B.; GUTHMILLER, J. M. Human β -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, p. 1024-1029.
- KACPRZYK, L.; RYDENGÅRD, V. MÖRGELIN, M.; DAVOUDI, M. PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, vol. 1768, p. 2667-2680.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, 1970, vol. 34, p. 595-8.
- KANAFANI, Z.A., PERFECT, J.R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious diseases*. 2008, vol.46, p. 120-128.
- KANDASAMY, K. S.; LARSON, R. G. Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006, vol. 1758, p. 1274-1284.
- KEMPE, M.; BARANY, G. CLEAR: a novel family of highly cross-linked polymeric supports for solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1996, vol. 118, p. 7083-7093.

- KIM, D.H.; LEE, D.G.; KIM, K.L.; LEE, Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *European Journal of Biochemistry*. 2001, vol. 268, p. 4449-4458.
- KIYOTA, S.; FRANZONI, L.; NICASTRO, G.; BENEDETTI, A.; OYAMA, S.JR.; VIVIANI, W.; GAMBARINI, A.G.; SPISNI, A.; MIRANDA, M.T. Introduction of a chemical constraint in a short peptide derived from human acidic fibroblast growth factor elicits mitogenic structural determinants. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003, vol. 46, p. 2325-2333.
- KLIS, F. M.; GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medicinal Mycology*. 2001, vol. 39, p.1-9.
- LAI, Y.; GALLO, R.L. AMPedup immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*. 2009, vol.30, p. 131-141.
- LEE, D. G.; PARK, Y.; KIM, H.N.; KIM, H. K.; KIM, P. I.; CHOI, B. H.; HAHM, K.S. Antifungal mechanism of an antimicrobial peptide, HP (2-20), derived from n-terminus of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1 against *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002, vol. 291, p. 1006-1013.
- LEE, I. H.; CHO, Y.; LEHRER, R. I. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*. 1997, vol. 65, p. 2898-2903.
- LI, Q.; MAHENDRA, S.; LYON, D. Y.; BRUNET, L. LIGA, M. V.; LI, D. ALVAREZ, P. J. J. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Research*. 2008, vol. 42, p. 4591-4602.
- LIAO, R.S.; RENNIE, R.P.; TALBOT, J.A. Assessment of the Effect of Amphotericin B on the Vitality of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, vol. 43, p. 1034-1041.
- LIEPKE, C.; BAXMANN, S.; HEINE, C.; BREITHAUPT, N.; STÄNDKER, L.; FORSSMANN, W. G. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial

activity: a class of host defense peptides. *Journal of Chromatography B*. 2003, vol. 791, p.345-356.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERÍCIO, F.; GIRALT, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Boca Raton: CRC Press. 1997, p. 278.

LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N. A.; MIRANDA, M. T. M. Further studies on peptide synthesis on high temperature. *Peptides for Youth. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009, vol. 611, p.165-166.

LUDTKE, S. J.; HELLER, W. T.; HARROUN, T. A.; YANG, L.; HUANG, H. W. Membranes pores induced by magainin. *Biochemistry*. 1996, vol. 35, p. 13723-13728.

LUPETTI, A.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; SENESI, S.; CAMPA, M. DISSEL, J. T. D.; NIBBERING, P. H. Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by na N-terminal peptide of human lactoferrin. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 2002, vol. 46, p.1634-1639.

MACHADO, A.; FÁZIO, M. A.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MACHINI, M. T. Synthesis and properties of cyclic gomesin and analogues. *Journal of Peptide Science*. 2012, vol. 18, p.588-598.

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

MACHADO, A.; SFORÇA, M.L.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A.; MIRANDA, M.T.M. Structure-activity relationship study of the fragment 33-61 of α -chain bovine hemoglobin. In: CHOREV, M., SAWYER, T.K (eds.) *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*. San Diego: American Peptide Society, 2003.

MACHADO, A.; SFORÇA, M.L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T.A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M.T.M. Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine

- alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolymers*, 2007, vol. 88, p. 413-26.
- MAK, P.; WÓJCIK, K.; SILBERRING, J.; DUBIN, A. Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, vol. 77, p. 197-207.
- MAK, P.; WÓJCIK, K.; WICHEREK, L.; SUDER, P.; DUBIN, A. Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 2004, vol. 25, p. 1839-47.
- MARR, A.K.; GOODERHAM, W.J.; HANCOCK, R.E.W. Antibacterial peptides for the therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006, vol. 6, p. 468-472.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.
- MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, vol. 1788, p. 1687-1692.
- MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1997, vol. 1327, p.119-130.
- MCGROWAN, J.E. Economic Impact of Antimicrobial resistance. *Emerging Infectious diseases*. 2001, vol. 7, p.286-292.
- MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Eschechiria coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, vol. 49, p. 4085-4092.
- MELO, L. D. Partículas e filmes híbridos de polímeros e compostos de amônio quaternário com atividade antimicrobiana. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2010.

- MENZIN, J.; MEYERS, J. L.; FRIEDMAN, M.; KORN, J. R.; PERFECT, J. R.; LANGSTON, A. A.; DANNA, R. P.; PAPADOPOULOS, G. The economic costs to United States hospitals of invasive fungal infections in transplant patients. *American Journal of Infection Control*. 2011, vol. 39, p. 15-20.
- MOGI, T.; KITA, K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cellular and Molecular Life Science*. 2009, vol. 66, p. 3821-3826.
- NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, 2003, vol. 40, p. 78-81.
- NEDJAR-ARROUME, N.; DUBOIS-DELVAL, V.; ADJE, E.Y.; TRAISNEL, J.; KRIER, F.; MARY, P.; KOUCAH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*. 2008, vol. 29, p. 969-977.
- NEDJAR-ARROUME, N.; DUBOIS-DELVAL, V.; MILOUDI, K.; DAOUD, R.; KRIER, F.; KOUACH, M.; BRIAND, G.; GUILLOCHON, D. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 2006, vol. 27, p. 2082-2089.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. 4^a ed. New York: Freeman, 2005.
- NIJNIK, A.; HANCOCK, R.E.W. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging Health Threats Journal*. 2009, vol. 2, p. 1-7.
- NOGUEIRA, E. Estudo da relação estrutura-atividade e de propriedades do Hb40-61a, uma hemocidina sintética. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2007. 107p.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of Action of linear Amphipathic α -helical Antimicrobial Peptide. *Biopolymers*. 1998, vol.47, p. 451-463.

- PANDEY, B. K.; AHMAD, A.; ASTHANA, N.; AZMI, S.; SRIVASTAVA, R. M.; SRIVASTAVA S.; VERMA, R.; VISHWAKARMA, A. L.; GHOSH, J. K. Cell-selective lysis by novel analogues of melittin against human red blood cells and *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 2010, vol. 49, p. 7920-7929.
- PAPON, N.; NOEL, T.; FLORENT, M.; GIBOT-LECLERC, S.; JEAN, D.; CHASTIN, C.; VILLARD, J.; CHAPELAND-LECLERC, F. Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the *FCY2*, *FCY1*, and *FUR1* genes to 5-fluorouracil and fluconazole crossresistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2007, vol. 51, p. 369-371.
- PARK, C.; LEE, D. G. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, vol. 394, p. 170-172.
- PARISH, C. A.; JIANG, H.; TOKIWA, Y.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; MCCABE, D. ZUCKERMAN, W.; XIA, M; GABAY, J.E. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. 2001, vol. 9, p. 377-382.
- PATTERSON-DELAFIELD, J.; SZKLAREK, D.; MARTINEZ, R. J.; LEHRER, R. I. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. *Infection and Immunity*. 1981, vol. 31, p. 723-731.
- PEREIRA, L. S.; SILVA JR.; P. I.; MIRANDA, M. T. M.; ALMEIDA, I. C.; NAOKI, H.; KONNO, K.; DAFFRE, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochemical and Biophysical research Communications*. 2007, vol. 352, p. 953-959.
- PERLIN, D.S. Antimicrobial Resistance in Developing Countries. 1ed. New York: Springer, 2010.
- PESCHEL, A.; OTTO, M.; JACK, R. W.; KALBACHER, H.; JUNG, G.; GOTZ, F. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to

- defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, vol. 274, p. 8405-8410.
- PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *Plos Pathogens*. 2010, vol. 6, p. 1-4.
- PFALLER, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 2012, vol. 125, p.S3-S13.
- REACT, Action on Antibiotic Resistance. Economic aspects of antibiotic resistance, 2008. Disponível em: <www.reactgroup.org/uploads/publications/react-publications/economic-aspects-of-antibiotic-resistance> Acesso em: 10/08/2012.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004, vol. 24, p. 536-547.
- REMUZGO, C. Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2008. 196 p.
- REMUZGO, C.; ANDRADE, G. F. S.; TEMPERINI, M. L. A.; MIRANDA, M. T. M. Aconthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60°C of a novel difficult sequence. *Biopolymers*. 2009, vol. 92, p. 65-75.
- ROSA, H. Interações entre DNA de bacteriófagos e partículas biomiméticas catiônicas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2008.
- ROSSI, F. The Challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*. 2011, vol. 52, p. 1138-1143.
- ROTEM, S.; MOR, A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, vol. 1788, p. 1582-1592.
- SAAR, K.; LINDGREN, M.; HANSEN, M.; EIRIKSDOTTIR, E.; JIANG, Y.; ROSENTHAL-AIZMAN, K.; SASSIAN, M.; LANGE, U. Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study. *Analytical Biochemistry*. 2005, vol. 345, p. 55-65.

- SFORÇA, M.L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R.C.; OYAMA, S., SILVA JR, F.D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M.T.M.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T.A. The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, p. 6440-51.
- SHAI, Y. Mode of Action of membrane Active Antimicrobial Peptide. *Biopolymers*. 2002, vol. 66, p. 236-248.
- SILVA, P. I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, ab 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptide of the *Tachyplesin* Family. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol. 275, p. 33464-33470.
- SMILLIE, L.B.; NATTRIS, M. Amino acid analyses of proteins and peptides: an overview. In: Mant, C.T.; Hodges, R.S. (eds). *High Performace Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation* Boca Raton: CRC Press, 1991, p. 847-863.
- SOLÉ, N.A.; BARANY, G.J. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala⁸]-dynorphin A. *Journal of Organic Chemistry*. 1992, vol. 57, p. 5399-5403.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001, vol. 70, p. 1-20.
- STEINBERG, D. A.; HURST, M. A.; FUJII, C. A.; KUNG, A. H.; HO, J. F.; CHENG, F. C.; LOURY, D. J.; FIDDES, J. C. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with *in vivo* activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997, vol. 41, p. 1738-1742.
- STEWART, J.M Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis. In: Fields, G.B (ed.), *Methods in Enzymology*. San Diego: Academic Press, 1997, vol. 289, p. 29-44.

- SUNG, W.S.; LEE, J.; LEE, D.G. Fungicidal effect and mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass. *Biochemical and Biophysical research Communications*. 2008, vol. 371, p.551-555.
- TAKESHIMA, K.; CHIKUSHI, A.; LEE, K. K.; YONEHARA, S.; MATSUZAKI, K. Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, vol. 278, p. 1310-1315.
- TAYLOR, B. N.; RAJESHWARI, R. M.; YAMADA, T.; LEKMINE, F.; CHISTOV, K.; CHAKRABATY, A. M.; GREEN, A.; BRATESCU, L.; SHILKAITIS, A.; BEATTIE, C. W.; GUPTA, T. K. Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer research*. 2009, vol. 2, p. 546-573.
- TAKENAGA, M.; SERIZAWA, Y.; AZECHI, Y.; OCHIAI, A.; KOSAKA, Y.; IGARASHI, R. MIZUSHIMA, Y. Microparticle resins as a potential nasal drug delivery system for insulin. *Journal of Controlled Release*. 1998, vol. 52, p. 81-87.
- THARP, S. M. S.; ACKERMANN, M. R.; GALLUP, J. M.; BROGDEN, K. A. An ovine hemoglobin fragment inhibits *Prophyromonas gingivalis* and *Micromonas micros*. In: The IADR/AADR/CADR 85th General Session and Exhibition. New Orleans, L.A. 2007.
- TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*. 2005, vol. 80, p. 717-735.
- VAN DER REST, M. E.; KAMMINAGA, A. H.; NAKANO, A.; ANRAKU, Y.; POOLMAN, B.; KONINGS, W. N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiological reviews*. 1995, vol. 59, p. 304-322.
- VEERMAN, E. C. I.; VALENTIJN-BENZ, M.; NAZMI, K.; RUISSSEN, A. L. A.; WALGREEN-WETERINGS, E.; MARLE, J.; DOUST, A. B.; HOF, W.; BOLSCHER, J. G. M.; AMERONGEN, A. V. N. Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, vol. 282, p. 18831-18841.

- VELDHUIZEN, E. J. A.; RIJNDERS, M.; CLAASSEN, E. A.; DIJK, A.; HAAGSMAN, H. P. Porcine b-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Molecular Immunology*. 2008, vol. 45, p. 386-394.
- VERLY, R. M.; RODRIGUES, M. A.; DAGHASTANLI, K. R. P.; DENADAI, A. M. L.; CUCCOVIA, I. M.; BLOCH JR, C.; FRÉZARD, F.; SANTORO, M. M.; PILO-VELOSO, D.; BEMQUERER, M. P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. *Peptides*. 2008, vol. 29, p. 15-24.
- VINCENT, M.; ENGLAND, L. S.; TREVORS, J. T. Cytoplasmic membrane polarization in Gram-positive and Gram-negative bacteria grown in the absence and presence of tetracycline. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, vol. 1672, p. 131-134.
- WADE, D.; BOMAN, A.; WAHLIN, B.; DRAIN, C. M.; ANDREU, D. BOMAN, H. G.; MERRIFIELD, R. B. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990, vol. 87, p. 4761-4765.
- WEI, G.X.; BOBEK, L.A. In vitro synergic antifungal effect of MUC7 12-mer with histatin 5 12-mer or miconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, vol. 53, p. 750-8.
- WELLINGS, D. A.; ATHERTON, E. Standard Fmoc protocols. In: *Methods in Enzymology* (Fields, G. B., ed.); Academic Press, San Diego, 1997, vol. 289, p. 44-67.
- WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 2010, vol. 1, p.440-464.
- ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A.F.; KOLLEF M.H. Secular trends in candidiasis related hospitalization in the United States. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008, vol. 29, p. 978-980.