

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

**ELAINE NOGUEIRA**

**Estudo da relação estrutura–atividade  
e de propriedades do Hb40-61a,  
uma hemocidina sintética**

São Paulo

2007

ELAINE NOGUEIRA

**Estudo da relação estrutura–atividade  
e de propriedades do Hb40-61a,  
uma hemocidina sintética**

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

*Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda*

São Paulo

2007

Elaine Nogueira

Estudo da relação estrutura–atividade e de propriedades do Hb40-61a, uma hemocidina sintética

*Dissertação apresentada ao Instituto  
de Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em*

.....

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*À minha família e amigos, com imenso carinho*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de oferecer os meus sinceros agradecimentos a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho. E à Deus, por tudo.

À minha orientadora Profª. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda pela orientação, apoio, amizade e por todo o aprendizado adquirido.

À nossa colaboradora Dra. Alessandra Machado pela amizade e auxílios inestimáveis durante o desenvolvimento do projeto.

À Profª. Dra. Sirlei Daffre pela colaboração na realização e interpretação dos bioensaios.

Ao Prof. Dr. Antônio de Miranda por possibilitar o uso do equipamento para obtenção dos espectros de dicroísmo circular e à Dra. Luciana Malavolta Quaglio pela assistência na coleta destes. Ao Dr. Alberto Spisni por alguns conselhos a respeito.

Ao Dr. Nílton Lincopan pela amizade, paciência e colaboração na realização de alguns ensaios biológicos.

À Profª. Dra. Iolanda M. Cuccovia e Dra. Kátia R. P. Daghasanli pelo estudo colaborativo da interação do Hb40-61a com lipossomos.

À Fernanda M. Prado pela ajuda durante as análises por espectrometria de massas.

Ao Dr. Cleber pelas análises de aminoácidos.

Aos amigos do laboratório do IQ, dos quais guardarei boas recordações: Carolina, Cleber, Dóris, Nicolas, Patrícia, Ivanilde, e em especial, a Carina e César, por todo estímulo, atenção, sugestão e carinho recebidos.

Aos amigos do laboratório do ICB: Aline, Carolina, Carlos, Diego, Eliane, Felipe, Fernanda, Rafael e Suzana pela ajuda durante a realização dos bioensaios e pela boa companhia.

Aos antigos amigos da faculdade, aos novos que fiz na pós-graduação e aos amigos do Coral Ana Néri, pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos meus familiares, dentre eles, meus pais Arisson e Midian e às minhas irmãs e amigas Gisele, Gislene, Ellen (pela imensa ajuda e paciência) e Deise pelo incentivo e amor sempre presentes.

À USP e ao IQ pela oportunidade.

Ao CNPq e a FAPESP pela bolsa e financiamento do projeto, respectivamente.

Muito obrigada.

## RESUMO

NOGUEIRA, E. **Estudo da relação estrutura-atividade e de propriedades do Hb40-61a, uma hemocidina sintética.** 2007. 108p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A hemoglobina (Hb) é uma fonte reconhecida de peptídeos com funções biológicas diversas. O fragmento 33-61 da cadeia  $\alpha$  da Hb, isolado do trato gastrointestinal do carrapato *Boophilus microplus*, foi o primeiro a ser descrito com ação antimicrobiana. O seu análogo sintético amidado, Hb33-61a, mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos [Fogaça et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25330-4]. O estudo de análogos do Hb33-61 nas formas amidada e com carboxila livre revelou que a amidação provoca aumento significativo da atividade frente a *Candida albicans*. Por apresentar propriedades biológicas e estruturais idênticas às do Hb33-61a, o Hb40-61a pareceu ser a sua porção mínima ativa [Sforça et al. (2005) *Biochemistry* 44, 6440-51; Machado et al. (2007) *Biopolymers* 88, 413-26]. Para comprovar tal sugestão, no presente trabalho, sintetizamos, purificamos e caracterizamos novos análogos do Hb33-61a, bem como os avaliamos quanto às suas atividades frente a *C. albicans* e *Micrococcus luteus*. Os resultados confirmaram a sugestão apenas para a ação antifúngica. O análogo Hb40-61a também se mostrou ativo frente a *C. albicans* resistente a fluconazol. A sua atividade antifúngica se mostrou fortemente dependente da força iônica do meio. A sua baixa atividade hemolítica foi confirmada mesmo em meio de baixa força iônica. O peptídeo Hb40-61a não apresentou sinergismo com o fluconazol frente a *C. albicans*. A cinética de morte celular mostrou que ele mata a levedura de forma rápida. Portanto, esta hemocidina sintética pode apresentar valor comercial se a via de administração for tópica ou se o seu uso envolver meios de baixa força iônica. Além disso, ela é um modelo valioso para o estudo do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos com características estruturais similares e pode servir de base para o desenho de novos agentes antibióticos.

**Palavras-chave:** peptídeo antimicrobiano, hemocidina sintética, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, relação estrutura-atividade.

## ABSTRACT

NOGUEIRA, E. **An investigation of the structure-activity relationship and the properties of Hb40-61a, a synthetic hemocidin.** 2007. 108p. Master Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

It is well known that hemoglobin (Hb) is a source of biologically active peptides. The fragment 33-61 of bovine hemoglobin  $\alpha$ -chain, isolated from the gut contents of the tick *Boophilus microplus*, was the first identified with antimicrobial activity. Its amidated analogue, Hb33-61a, showed to be active against Gram-positive bacteria and fungi strains [Fogaça et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 25330-4]. The study of a series of carboxyl-free and amidated synthetic analogues of Hb33-61 revealed that C-terminus amidation enhances the activity against *Candida albicans*. Since Hb33-61a and Hb40-61a presented identical biological and structural properties, it seemed that Hb40-61a was Hb33-61a minimal active motif [Sforça et al. (2005) *Biochemistry* 44, 6440-51; Machado et al. (2007) *Biopolymers* 88, 413-26]. To test this suggestion, in the present study we synthesized, purified and characterized Hb40-61a analogues and assayed them against *C. albicans* and *Micrococcus luteus*. The results confirmed the suggestion only for the antifungal activity. When tested against fluconazole-resistant *C. albicans*, Hb40-61a was also active. Its antifungal activity showed to be dependent on the ionic strength of the medium. Its low hemolytic activity was confirmed even under low ionic strength conditions. Hb40-61a had no synergic effect with fluconazole on *C. albicans*. *In vitro* time-kill assays demonstrated that Hb40-61a kills the yeast rapidly. Therefore, this synthetic hemocidin may be of commercial interest for topical application or other uses involving low ionic strength medium. Moreover, it can serve as a template for the study of the mechanism of action of structurally related antimicrobial peptides or for the design of novel antibiotic drugs.

**Keywords:** antimicrobial peptide, synthetic hemocidin, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, structure-activity relationship.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<b>ACN</b>	acetonitrila
<b>BOP</b>	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino) fosfônio
<b>CD</b>	1      dicroísmo circular
<b>CLSI</b>	2 <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DIC</b>	N,N-diisopropilcarbodiimida
<b>DIPEA</b>	N,N-diisopropiletilamina
<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>EDT</b>	1,2-etanoditiol
<b>FC</b>	fosfatidilcolina
<b>FDA</b>	3 <i>Food and Drug Administration</i>
<b>Fmoc</b>	fluorenilmetóxicarbonil
<b>GUVs</b>	vesículas unilamelares gigantes
<b>HF</b>	Ácido fluorídrico
<b>HOBt</b>	N-hidroxibenzotriazol
<b>IGP</b>	tampão de fosfato isotônico
<b>LC/ESI-MS</b>	Cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrômetro de massas (fonte de ionização por "electrospray")
<b>LPC</b>	lisofosfatidilcolina
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>LUVs</b>	vesículas unilamelares grandes
<b>MBHA</b>	4-metilbenzidrilamina
<b>MeOH</b>	metanol
<b>NMP</b>	N-metilpirrolidona
<b>PAM</b>	ácido 4-hidroximetilfenilacético
<b>PB</b>	bactopeptona
<b>PBS</b>	tampão fosfato de sódio
<b>PDB</b>	<i>potato dextrose broth</i> (caldo de dextrose de batata)
<b>Rink amida</b>	resina 4-(2', 4'-Dimetóxiifenilaminometil)-fenóximetil
<b>RP-HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
<b>SDS</b>	dodecil-sulfato de sódio
<b>SPFS</b>	Síntese de peptídeos em fase sólida
<b>t-Boc</b>	<i>terc</i> -butilóxicarbonil

<b>TBTU</b>	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio
<b>TEA</b>	triethylamina
<b>TEAP</b>	fosfato de triethylamina (mistura $H_3PO_4/TEA$ )
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>TIS</b>	triisopropilsilano
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colônias
<b>Wang</b>	resina álcool p-benziloxibenzil
<b>YNB</b>	<i>yeast nitrogen base</i>

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Peptídeos antibióticos .....	11
a) Potencialidade de uso .....	15
b) Dificuldades de uso .....	17
c) Vantagens de uso .....	19
1.2 Fragmento 33-61 da cadeia $\alpha$ da hemoglobina bovina .....	21
1.3 Métodos de síntese de peptídeos .....	24
2 OBJETIVOS .....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1 Materiais .....	30
3.2 Métodos preparativos .....	32
3.3 Métodos analíticos e de caracterização dos peptídeos .....	37
3.4 Bioensaios .....	38
a) Atividade antifúngica .....	38
b) Atividade antibacteriana .....	40
c) Efeito da força iônica do meio nas atividades do Hb40-61a frente a <i>C. albicans</i> e <i>M. luteus</i> .....	41
d) Efeito da associação do fluconazol e do Hb40-61a no crescimento celular .....	41
e) Ensaio Hemolítico .....	42
f) Cinética de morte celular .....	43
3.5 Análises por dicroísmo circular .....	43
4 RESULTADOS .....	46
4.1 Síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos .....	46
4.2 Bioensaios .....	67
a) Atividade antifúngica .....	67
b) Atividade antibacteriana .....	70
c) Efeito da força iônica do meio nas atividades dos peptídeos estudados frente a <i>C. albicans</i> e <i>M. luteus</i> .....	71
d) Efeito da associação de dois antimicrobianos no crescimento celular .....	72
e) Ensaio de hemólise com o Hb40-61a .....	72
f) Cinética de morte celular causada pelo Hb40-61a .....	72
4.3 Estudos preliminares por dicroísmo circular .....	73
5 DISCUSSÃO .....	75
5.1 Desenho dos peptídeos estudados .....	75
5.2 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos estudados .....	77
5.3 Ensaios biológicos .....	78
5.4 Análise por dicroísmo circular .....	89
6 CONCLUSÕES .....	90
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
CURRICULUM VITAE .....	106

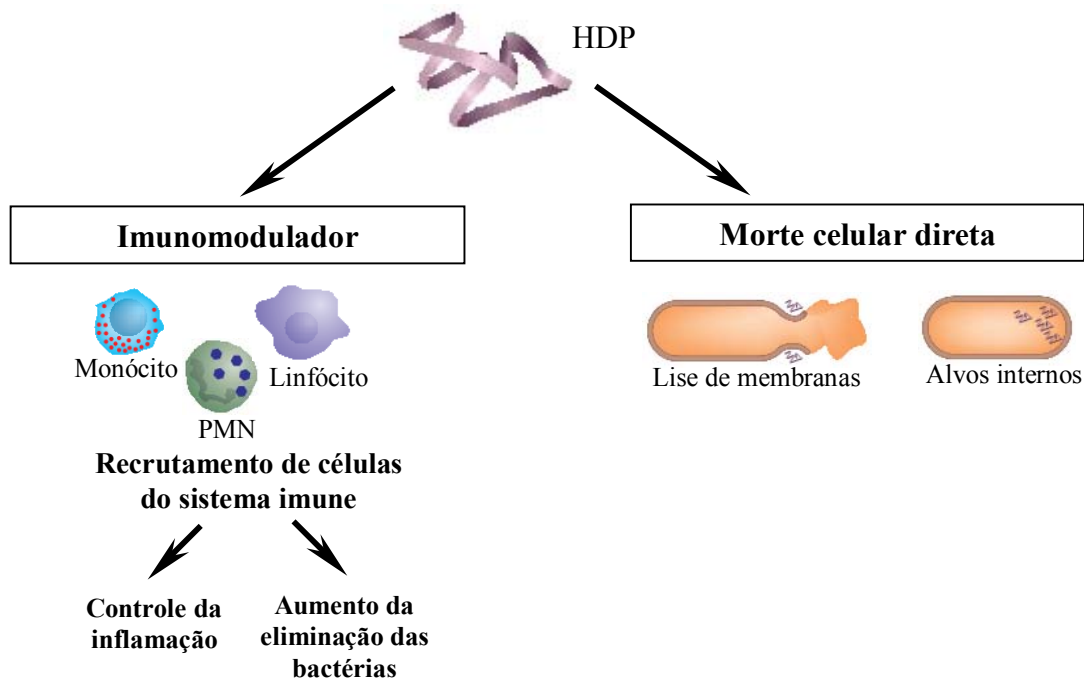
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Peptídeos antibióticos

Os peptídeos com ação antibiótica podem ser divididos em peptídeos não-ribossômicos e ribossômicos (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). Os não-ribossômicos (chamados de antibióticos) são produtos do metabolismo secundário sintetizados mediante catálise por um sistema multi-enzimas presente em certas bactérias e fungos, as sintetases de peptídeos não ribossômicos. Entre eles estão peptídeos utilizados atualmente na clínica como, por exemplo: a gramicidina S (peptídeo cíclico; GAUSE; BRAZHNIKOVA, 1944), a polimixina B (lipopeptídeo, STORM et al., 1977) e a vancomicina (glicopeptídeo; FAIRBROTHER; WILLIAMS, 1956, HANCOCK, 1997).

Os peptídeos ribossomais (chamados neste texto de peptídeos antimicrobianos) são encontrados em uma grande variedade de seres vivos, sendo reconhecidos como parte importante do sistema imune inato de vertebrados, invertebrados e plantas (TABER et al., 2002, BULET et al., 2004, NISSEN-MEYER; NES, 1997). A atividade antimicrobiana foi a primeira a ser atribuída a estes peptídeos, porém outras funções foram descritas, tais como a de participação no sistema adaptativo e a habilidade de modular a resposta imune em mamíferos (BOWDISH et al., 2005, HANCOCK; SAHL, 2006). Assim, cada peptídeo antimicrobiano poderia apresentar duas ações, ou seja, antimicrobiana e imunomoduladora, ou ter predomínio de uma delas. Por exemplo, além de as  $\alpha$ - e  $\beta$ -defensinas de mamíferos apresentarem atividade antimicrobiana, estas são capazes de atrair linfócitos T (CHERTOV et al., 1996, RAJ; DENTINO, 2002, YANG et al., 2002). Entretanto, quando os testes antimicrobianos *in vitro* são realizados em condições ditas fisiológicas (usando alta concentração salina), essas defensinas são pouco ativas, levando ao questionamento de se esta atividade seria a função mais importante *in vivo* (YANG et al., 2002). Por outro lado, as atividades antimicrobianas das defensinas poderiam ocorrer dentro de vacúolos de fagócitos e

na superfície da pele e mucosas, onde a força iônica é baixa (**Figura 1** abaixo; YANG et al., 2002). Estas razões explicam, portanto, o termo “peptídeos de defesa do hospedeiro” usado na literatura (SAHL et al., 2005).



**Figura 1. Funções biológicas dos peptídeos de defesa do hospedeiro (HPD) em mamíferos.** PMN: neutrófilos polimorfonucleares. Extraído de Hancock e Sahl (2006).

Os primeiros peptídeos antimicrobianos descritos são aqueles produzidos por bactérias (JENSSEN et al., 2006). Desde então, centenas deles foram isolados e caracterizados ou tiveram as suas seqüências preditas a partir das seqüências dos genes que os codificam (BULET et al., 2004, BECHINGER; LOHNER, 2006). Esses peptídeos podem ser produzidos constitutivamente, como as histatinas (VANDERSPEK et al., 1989) ou ser induzidos pelo contato com microorganismos, como a cecropina (BREY et al., 1993).

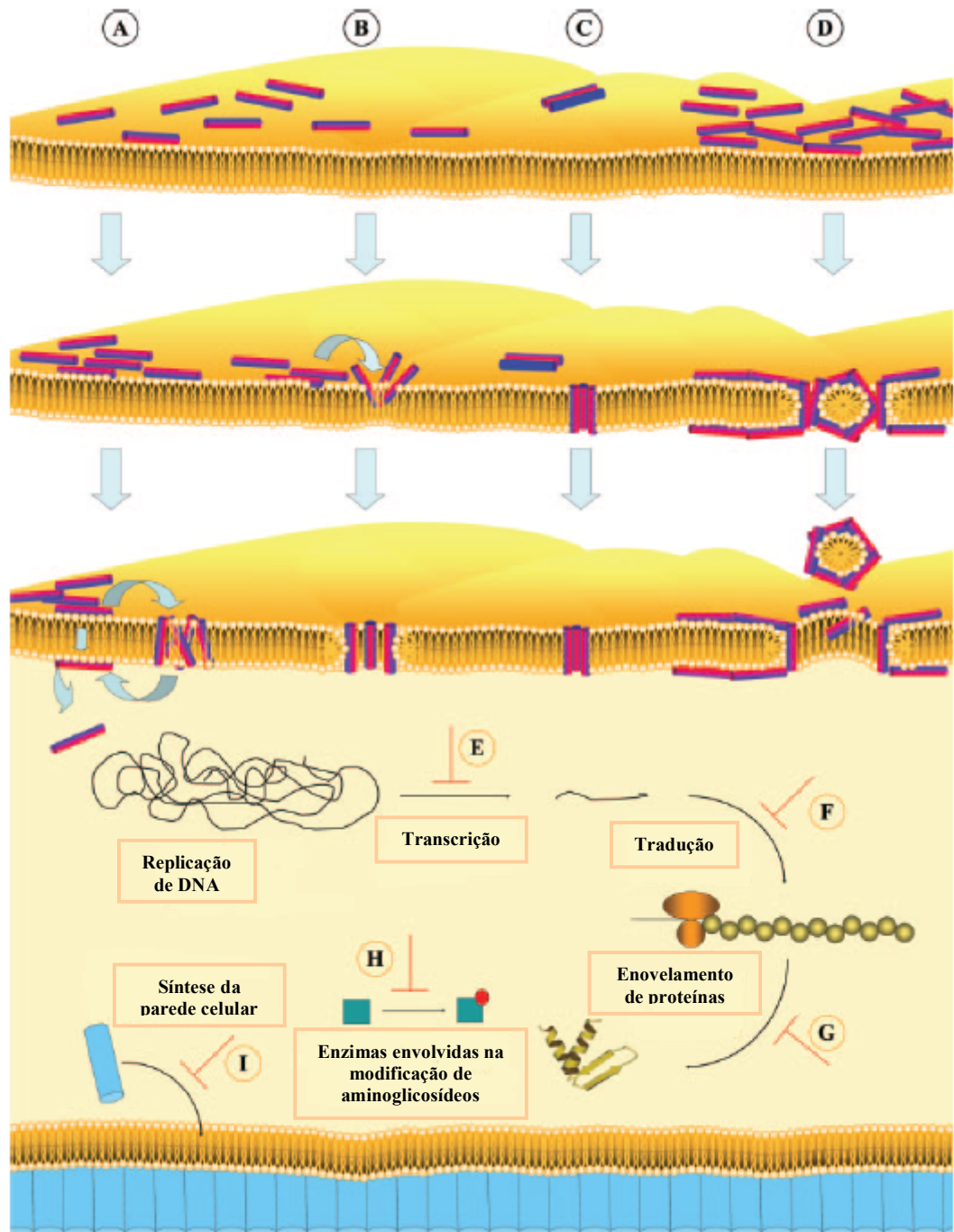
Apesar da baixa similaridade nas suas seqüências de aminoácidos, a maioria dos peptídeos antimicrobianos é catiônica (TABER, 2002). Em geral, eles contêm 12-50 resíduos de aminoácidos e são anfipáticos, com aproximadamente 50% dos resíduos sendo hidrofóbicos (HANCOCK, 1997). Quanto à atividade biológica, eles apresentam amplo espectro de ação contra bactérias, fungos e vírus (HANCOCK, 2001). Entretanto, é sabido

que os peptídeos antimicrobianos provenientes de eucariotos apresentam, em geral, espectro de ação mais amplo do que alguns produzidos por bactérias (DIEP; NES, 2002, JENSSEN et al., 2006). Por outro lado, os últimos são geralmente mais ativos (apresentam MICs em nanomolar).

Várias são as classificações feitas para os peptídeos antimicrobianos. Uma delas se baseia na estrutura primária e secundária (BROGDEN, 2005):

- 1) Aniônicos, como a maximina H5 de anfíbios (LAI et al., 2002);
- 2) Catiônicos lineares que formam  $\alpha$ -hélices, como por exemplo, as magaininas isoladas em pele de sapo (Zasloff, 1987);
- 3) Catiônicos ricos em determinados aminoácidos, como, por exemplo, a acantoscurreina, peptídeo rico em glicina presente na hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (LORENZINI et al., 2003) e as histatinas, peptídeos ricos em histidina presentes na saliva humana (RAJ et al., 1990);
- 4) Catiônicos ou aniônicos que contêm cisteína e formam pontes dissulfeto, como, por exemplo, as defensinas (RAJ; DENTINO, 2002);
- 5) Catiônicos ou aniônicos resultantes de proteólise de proteínas como, por exemplo, a lactoferricina (KIM et al., 2000) e o fragmento 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (FOGAÇA et al., 1999, SFORÇA et al., 2005, MACHADO et al., 2007).

Vários são os mecanismos propostos para explicar a ação destes peptídeos. Eles se baseiam na permeabilização da membrana plasmática ou na interação com um alvo intracelular (JENSSEN et al., 2006). No que se refere à atividade antibacteriana, que é a mais estudada, a permeabilização pode ocorrer pelos modelos mecânicos denominados agregação, formação de poro toroidal, ripas de barril e carpete e os alvos intracelulares podem ser o DNA, enzimas e processos intracelulares (**Figura 2**; BROGDEN, 2005). Quanto à



**Figura 2. Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos frente a bactérias.** Amarelo: bicamada lipídica bacteriana. Cilindros bicolores: peptídeos, com representação da porção hidrofílica (rosa) e hidrofóbica (azul). Cilindros azuis: peptideoglicanos. (A)-(D): modelos de permeabilização da membrana. (A): agregação; (B): formação de poro toroidal; (C): ripas de barril e (D): tapete; (E) a (I): modelos de ação para peptídeos com alvos internos. (E): inibição da síntese de DNA, RNA; (F): inibição da síntese de proteínas; (G): inibição de enzimas envolvidas no enovelamento de proteínas; (H): inibição de enzimas envolvidas na modificação de aminoglicosídeos que levam à resistência dessa classe de antibióticos; (I): inibição da síntese da parede celular. (Extraído de JENSSEN et al., 2006).

atividade antifúngica, alguns mecanismos já foram propostos (DE LUCCA; WALSH, 1999, JENSSEN et al., 2006), tais como permeabilização da membrana do fungo (LEE et al., 2001, JANG et al., 2006), ação sobre mitocôndria com liberação de ATP que culminaria na morte da célula (KAVANAGH; DOWD, 2004), lise da membrana causada pela interação do peptídeo com os esteróis (por exemplo, o ergosterol) nela presentes (DE LUCCA et al., 1998) e formação de espécies reativas e diminuição do nível de tióis (LUPETTI et al., 2002). Em relação à atividade antiviral, foram sugeridos (JENSSEN et al., 2006): ação direta no envelope viral (ROBINSON et al., 1998), influência nas etapas intracelulares da infecção celular (ALBIOL MATANIC; CASTILHA, 2004), prevenção da entrada do vírus na célula pela interação do peptídeo com heparan sulfato (ANDERSEN et al., 2004) ou com receptores virais (que estão presentes nas células do hospedeiro; MURAKAMI et al., 1997) ou com glicoproteínas presentes no envelope viral (YASIN et al., 2004).

Seguem abaixo algumas considerações adicionais em relação aos peptídeos com ação antibiótica:

#### **a) Potencialidades de uso**

Um uso evidente destes peptídeos é na terapêutica como agentes antimicrobianos alternativos aos de natureza orgânica não peptídica, já que eles exibem um amplo espectro de ação, apresentam uma capacidade menor do que a dos antibióticos não peptídicos de induzir resistência e causam a morte rápida dos microorganismos (HANCOCK, 1997, HANCOCK; SAHL, 2006). Esses peptídeos poderiam ser utilizados sozinhos (monoterapias) ou em combinação com outros antibióticos; neste último caso, se buscaria o efeito sinérgico entre eles (GORDON et al., 2005).

Nas duas últimas décadas, vários peptídeos com ação antibiótica ou seus derivados foram estudados extensamente até a fase de testes clínicos (relativamente poucos em relação ao grande número já descoberto) (GORDON et al., 2005). Entretanto, até agora, apenas dois



se mostraram suficientemente eficazes (HANCOCK; SAHL, 2006): 1) o Pexiganan (Geniera Plymouth Meeting, EUA), que é um derivado da magainina 2 (peptídeo isolado da pele do sapo africano *Xenopus laevis*); entretanto, não foi aprovado pelo FDA por não ser superior à ofloxacina para o tratamento do pé diabético; 2) o Omiganan (Microbiologix Biotech Vancouver, BC, Canadá), que é um derivado da indolicidina (peptídeo obtido de grânulos de neutrófilos bovinos) capaz de reduzir a colonização de microorganismos em cateteres e está na fase IIIb de testes (GORDON et al., 2005, HANCOCK; SAHL, 2006). Outros como o XMP.629 [XOMA US, Berkeley, EUA, derivado da proteína bactericida/aumentadora de permeabilidade (BPI), encontrada em grânulos de leucócitos humanos] e Iseganan [derivado da protegrina que está presente em leucócitos de porcos (Intrabiotics Pharmaceuticals, Inc. Mountainview, EUA)] também foram estudados, mas não se mostraram eficientes nas fases II e III dos testes clínicos, respectivamente (GORDON et al., 2005, HANCOCK; SAHL, 2006). A grande maioria dos estudos já realizados envolve monoterapia e visa à aplicação tópica (HANCOCK; SAHL, 2006). Um fator limitante para a administração sistêmica é que em estudos com animais certos peptídeos, como a magainina, apresentaram doses eficazes altas e geralmente próximas às doses tóxicas (Zasloff, 2002).

Os peptídeos com ação antibiótica também poderiam ser empregados como agentes imunomoduladores, tais como:

i) neutralizadores de produtos ou componentes bacterianos tóxicos na prevenção do choque séptico. Já foi demonstrado que várias proteínas (como a proteína bactericida/aumentadora de permeabilidade; BPI; GAZZANO-SANTORO et al., 1992) e peptídeos (como o MBI-27 e o MBI-28) se ligam ao LPS *in vitro* (PIERS et al., 1994) e protegem espécies animais da sepse em modelos experimentais (GOUGH et al., 1996);

ii) compostos recrutadores de células do sistema imune (tais como neutrófilos, monócitos, mastócitos e linfócitos T auxiliares), estimuladores de degranulação de mastócitos, promotores de angiogênese e cicatrização (FINLAY; HANCOCK, 2004).

O uso mais freqüente destes compostos tem sido o científico, já que o conhecimento das propriedades químicas, biológicas e estruturais de um peptídeo com ação antibiótica é extremamente valioso. Além disso, a exploração da relação estrutura-atividade e o entendimento dos seus mecanismos de ação podem levar a análogos e compostos novos com propriedades mais interessantes do que os compostos de partida (KIM et al., 2002) ou à descoberta de outras ações, tais a como inibição de enzimas, promoção de absorção cutânea para administração tópica de fármacos, imobilização de células com diferentes afinidades sobre superfícies sólidas ou, ainda, incorporação à embalagem de alimentos (GREGORY; MELLO, 2005, MILTZ et al., 2006, KIM et al., 2007).

#### **b) Dificuldades de uso**

Assim como outras classes de compostos, os peptídeos antimicrobianos apresentam vários entraves em sua utilização como fármacos (GOOTZ, 1990). Estes entraves estão descritos a seguir juntamente com as possíveis soluções.

#### Influência da força iônica do meio na atividade antimicrobiana de um peptídeo

Independentemente do mecanismo de ação proposto é, em geral, aceito que ocorra uma interação eletrostática inicial entre o peptídeo catiônico e as estruturas carregadas negativamente do microorganismo. Deste modo, é esperado que a força iônica do meio (cátions) afete a sua atividade e que este efeito seja dependente do meio, do microorganismo e do peptídeo (LEE et al., 1997a). Neste contexto, deduz-se que os peptídeos isolados de animais marinhos, como as clavulinas, sejam geralmente ativos em soluções de altas

concentrações salinas (LEE et al., 1997b). Dedução idêntica não pode ser feita para aqueles isolados de animais não marinhos.

Algumas definições de peptídeos antimicrobianos só abrangem aqueles que são ativos em condições fisiológicas (HANCOCK; SAHL, 2006). Entretanto, esta abordagem é muito rígida, já que para exibir a sua ação eles podem: 1) se envolver em outras interações *in vivo*, não previsíveis facilmente, como uma ação sinérgica com outros compostos (VAN'T HOF et al., 2001); 2) exercer ação compartimentalizada ou em tecidos específicos como, por exemplo, fazem as defensinas dentro de vacúolos de fagócitos, na superfície da pele e em mucosas, onde a força iônica é baixa (YANG et al., 2002).

Por outro lado, também é necessário lembrar que análogos de ação menos suscetível à presença de sais podem ser concebidos a partir de resultados de estudos da relação estrutural-atividade dos peptídeos antibióticos (TAM et al., 2000, SHIN et al., 2002).

#### Susceptibilidade dos peptídeos antimicrobianos à proteólise

Os peptídeos são bastante susceptíveis à degradação enzimática. Para contornar esse problema, têm sido propostas: 1) modificações químicas que levam a análogos alquilados no nitrogênio da ligação peptídica (OSTRESH et al., 1996), amidados no C-terminal, ciclizados (MONROC et al., 2006), D-isômeros, peptídeos retroinvertidos e miméticos de peptídeos (BESSALLE et al., 1990); 2) mudanças na formulação, como a seu encapsulamento em lipossomos (HANCOCK; SAHL, 2006).

#### Custo alto

Este é o principal entrave para a introdução dos peptídeos como fármacos, pois a sua produção custa de cinco a vinte vezes mais do que a dos antibióticos usuais (LEE et al., 1998; VAN'T HOF et al., 2001, HANCOCK; SAHL, 2006). As metodologias mais utilizadas para síntese de peptídeos antimicrobianos são a síntese química e a tecnologia do DNA

recombinante (ver ítem 1.2). A síntese química é mais trabalhosa e versátil, pois permite o uso de aminoácidos não usuais ou D-aminoácidos e a introdução de modificações químicas na molécula (HANCOCK, 1997, MACHADO et al., 2004). Apesar de mais barata, a síntese via tecnologia do DNA recombinante apresenta alguns inconvenientes, como a possibilidade de morte do microorganismo durante a expressão de alguns peptídeos antimicrobianos (VAN'T HOF et al., 2001), a impossibilidade de incorporação de aminoácidos não usuais ou D-aminoácidos, a maior dificuldade para a obtenção de peptídeos modificados (MACHADO et al., 2004).

### Toxicidade moderada

Muitos peptídeos com ação antibiótica apresentam certo grau de toxicidade a células de mamíferos, tais como a melitina (OREN; SHAI, 1997), a protegrina I (STORICI; ZANETTI, 1993), a indolicidina (SELSTED et al., 1992) e a gomesina (FÁZIO et al., 2006). Esta toxicidade, na maioria das vezes, é avaliada por meio do ensaio hemolítico. Por outro lado, alguns estudos da relação estrutura-atividade de peptídeos permitiram a dissociação das atividades antimicrobiana e tóxica ou que a última fosse reduzida (OREN; SHAI, 2000, FRECER et al., 2004, FÁZIO et al., 2007). Esses e outros estudos permitiram algumas generalizações como, por exemplo, a de que em peptídeos com estrutura em  $\alpha$ -hélice anfipática, o aumento da hidrofobicidade leva a um aumento da atividade hemolítica (DATHE et al., 1997).

### c) Vantagens do uso

Pelas razões descritas no ítem 1b, a maioria dos peptídeos antimicrobianos simples conhecidos não tem sido aprovada em testes clínicos (HANCOCK; SAHL, 2006). Por outro lado, a busca por novos peptídeos antimicrobianos e o seu estudo continuam sendo relevantes devido, principalmente, às seguintes razões:

1. em geral, os peptídeos são facilmente metabolizáveis e, relativamente, menos tóxicos para animais e plantas do que outros antibióticos não peptídicos (VAN'T HOF et al., 2001);
2. como por milhares de anos eles foram e continuam sendo ativos, eles poderiam se tornar uma nova classe de antibióticos utilizados na terapêutica contra microorganismos que apresentam resistência aos antibióticos convencionais, ou ainda, ser empregados por vias alternativas à via oral (como, por exemplo, enxágüe bucal ou para o tratamento tópico da candidíase; CHAN et al., 2006, PATRZYKAT; DOUGLAS., 2003). De fato, apesar de o aparecimento de resistência dos microorganismos aos antibióticos utilizados ser um problema mundial, somente três novas classes (oxazolidinonas, lipopeptídeos cíclicos e estreptograminas) foram introduzidas nos últimos 40 anos (PARISIEN et al., 2008). Além disso, os novos antibióticos comercializados são, na sua maioria, análogos de outros que já estavam no mercado, como por exemplo, novas gerações de fluoroquinolonas, ou novas associações deles (CHRISTOFFERSEN, 2006; SILVEIRA et al., 2006);
3. os estudos da relação estrutura-atividade de peptídeos antimicrobianos são de fundamental importância, pois estes podem apresentar determinadas características que limita o seu uso e que podem ser melhoradas como, por exemplo, o seu espectro de ação, a sua potência, os seus parâmetros farmacocinéticos, incluindo estabilidade *in vivo* e índice terapêutico. No caso de peptídeos, como já citado acima, esses estudos podem levar a análogos menos sensíveis à força iônica do meio (PARK et al., 2004) e/ou proteólise e de menor toxicidade (SHIN et al., 1999) e também à elucidação das suas porções e/ou aminoácidos responsáveis pela atividade (SHIN et al., 1999). Essas informações podem, ainda, gerar dados para o desenho de novas drogas não peptídicas;
4. os estudos de mecanismo de ação dos peptídeos antibióticos podem levar a um melhor entendimento da permeabilização de membranas biológicas e descobrimento de novos alvos para serem usados contra os microorganismos patogênicos;

5. vários estudos relatam peptídeos que apresentam sinergismo com outras drogas (PARK et al., 2006, BARBOSA et al., 2007) ou que podem translocar membranas celulares servindo de carregadores de compostos polares biologicamente ativos como ácidos nucleicos, peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e DNA (TEMSAMANI; VIDAL, 2004).

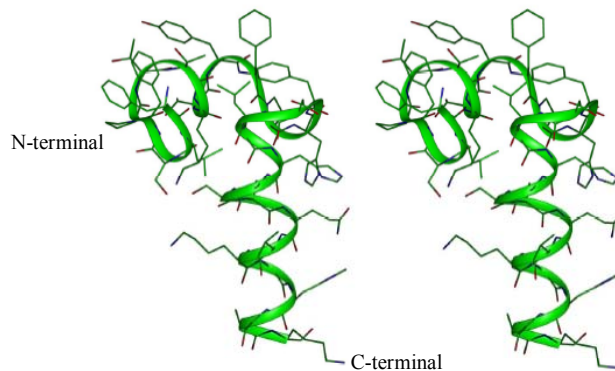
## 1.2 Fragmento 33-61 da cadeia $\alpha$ da hemoglobina bovina

Desde que, com a colaboração de nosso grupo de pesquisa, um peptídeo com atividade antimicrobiana foi isolado do conteúdo intestinal do carrapato *Boophilus microplus* e sua seqüência mostrou 100% de identidade com a seqüência 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (Hb33-61; FOGAÇA et al., 1999), outros grupos relataram a geração de fragmentos da hemoglobina *in vivo* (NAKAJIMA et al., 2003, MAK et al., 2004, SONENSHINE, 2005, NEDJAR-ARROUME et al., 2006) e *in vitro* (FROIDEVAUX et al., 2001, PARISH et al., 2001; LIEPKE et al., 2003; DAOUD et al., 2005). Anteriormente, já era bem estabelecido que fragmentos desta proteína apresentam funções biológicas variadas, tais como: ação opióide, imunomodulação e atividade liberadora de hormônios (IVANOV et al., 1997). Entretanto, o peptídeo Hb33-61 foi o primeiro relatado a exibir ação antimicrobiana (FOGAÇA et al., 1999).

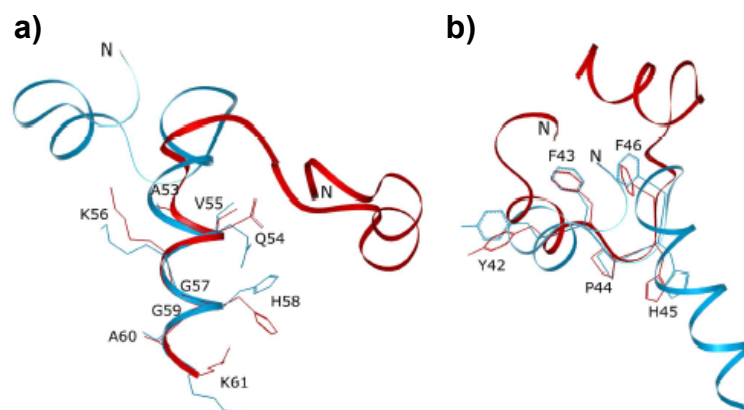
Sabendo que a amidação no C-terminal de um peptídeo pode levar a uma maior resistência a proteases (ANDREU; RIVAS, 1998) e a uma potencialização de sua atividade (CHRISTENSEN et al., 1979), foi sintetizado o análogo amidado do Hb33-61, o Hb33-61a. Este análogo mostrou-se ativo em concentrações micromolares contra algumas bactérias Gram-positivas (*Micrococcus luteus* A270, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis*) e contra alguns fungos (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*; FOGAÇA et al., 1999).

Estudos estruturais por CD e  $^1\text{H}$ -RMN do peptídeo Hb33-61a (SFORÇA et al., 2005) mostraram posteriormente que: 1. assim como outros peptídeos de baixa massa molar como a

cecropina (HOLAK et al., 1988), este também apresenta conformação randômica em solução aquosa pH 5,1 contendo 20  $\mu\text{M}$  de peptídeo; 2. apesar de não interagir com micelas zwitteriônicas de LPC, em presença de micelas de SDS, o peptídeo Hb33-61a exibe uma conformação definida e caracterizada pela presença de uma dobra  $\beta$  na porção N-terminal (Lys<sup>40</sup>-Phe<sup>43</sup>) e por uma dobra  $\beta$  (Ser<sup>49</sup>-Ser<sup>52</sup>) seguida de uma  $\alpha$ -hélice no C-terminal (Ala<sup>53</sup>-Ala<sup>60</sup>), sendo as duas dobras conectadas por uma alça flexível espacialmente organizada (Pro<sup>44</sup>-Leu<sup>48</sup>; **Figura 3**). Este tipo de estruturação da cadeia carbônica é bastante semelhante àquela adquirida pela porção 33-61 na cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina; mas com alguns grupos pertencentes a cadeias laterais em diferente orientação (**Figura 4**).



**Figura 3.** Visão estereoespacial do modelo de mínima energia do Hb33-61a obtida por RMN em presença de micelas de SDS, pH 4,0 a 37°C. Extraído de Sforça et al. (2005).



**Figura 4.** Sobreposição das porções Ala<sup>53</sup>-Lys<sup>61</sup> (a) e de Tyr<sup>42</sup>-Phe<sup>46</sup> (b). Hb33-61a (azul), com a região correspondente na estrutura cristalina da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (vermelho). Extraído de Sforça et al. (2005).

Assim, fragmentos truncados do Hb33-61a nas formas acetiladas, amidadas ou com carboxilas livres foram desenhados, sintetizados, purificados e testados por nós frente a *C. albicans* MDM8. Esta levedura foi escolhida pela sua relevância clínica (GUPTE et al., 2002). Os resultados obtidos nesta etapa inicial do estudo da relação estrutura-atividade antifúngica do peptídeo Hb33-61a (**Tabela 1**; MACHADO et al., 2007) mostraram que: 1) os análogos amidados tinham maior atividade antifúngica em relação aos com carboxila livre, o que corrobora dados anteriores obtidos para outros peptídeos antimicrobianos (WU; HANCOCK, 1999, CAO et al., 2005, ROTEM et al., 2006); 2) a deleção da porção 53-61 (correspondente à  $\alpha$ -hélice da porção C-terminal) ou 33-47 (contendo a dobra  $\beta$  na porção N-terminal e parte da alça flexível terminal espacialmente organizada) levou à redução significativa da atividade; 3) o fragmento Hb40-61a apresentou a mesma atividade antifúngica do Hb33-61a, mas a acetilação dos seu grupo N-terminal causou a redução dessa atividade (MACHADO et al., 2003, MACHADO et al., 2007 e dados não publicados).

**Tabela 1.** Atividade dos análogos do Hb33-61a frente a *C.albicans* MDM8 (MACHADO et al., 2007; dados não publicados)

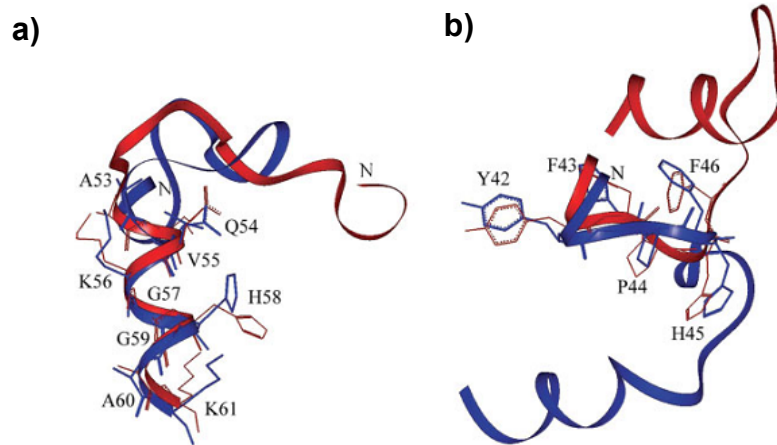
Peptídeo	Seqüência	MIC ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
Hb33-61a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	3,12-6,25
Hb33-61	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	12,5-25,0
Hb33-52a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGS- NH <sub>2</sub>	50,0-100,0
Hb48-61a	LSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	>200,0
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	3,12-6,25
Hb40-61	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	12,5-25,0
Ac-Hb40-61	Ac-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	100,0-200,0
Ac-Hb40-61a	Ac-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	12,5-25,0

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada no qual o microorganismo cresceu e [b] é a mais baixa concentração que causou total inibição do crescimento (EHRET-SABATIER et al., 1996).

Análises por CD e <sup>1</sup>H-RMN dos peptídeos Hb40-61a, Hb40-61, Hb33-52a, Hb48-61a sintéticos mostraram que, em presença de micelas SDS, o fragmento Hb40-61a apresenta uma estrutura muito similar à encontrada para o Hb33-61a e que, assim como este último, ele



preserva os elementos principais de estrutura secundária e terciária presentes na porção 33-61 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (**Figura 5**; MACHADO et al., 2007).



**Figura 5. Sobreposição dos resíduos Ala<sup>53</sup>-Lys<sup>61</sup> (a) e de Tyr<sup>42</sup>-Phe<sup>46</sup> (b).** Hb40-61a (azul), com a região correspondente na estrutura cristalina da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina (vermelho). Extraído de Machado et al. (2007).

Além disso, ensaios adicionais com os peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a mostraram que na faixa 1-50  $\mu\text{M}$  ambos hemolisam apenas 15% do total de células testadas, que ambos apresentam atividades fungicidas em 6,25  $\mu\text{M}$  e permeabilizam a membrana plasmática de *C. albicans* MDM8 em 62,5  $\mu\text{M}$  (MACHADO et al., 2007). Assim, o fragmento Hb40-61a pareceu representar a porção mínima ativa do Hb33-61a e apresentar potencial de uso terapêutico [por ter baixa atividade hemolítica e ser ativo contra *C. albicans*, um organismo oportunista causador de várias doenças, entre elas a candidíase (GUPTE et al., 2002)] o que justificava a sua dissecação e busca de informações adicionais sobre as suas propriedades.

### 1.3 Métodos de síntese de peptídeos

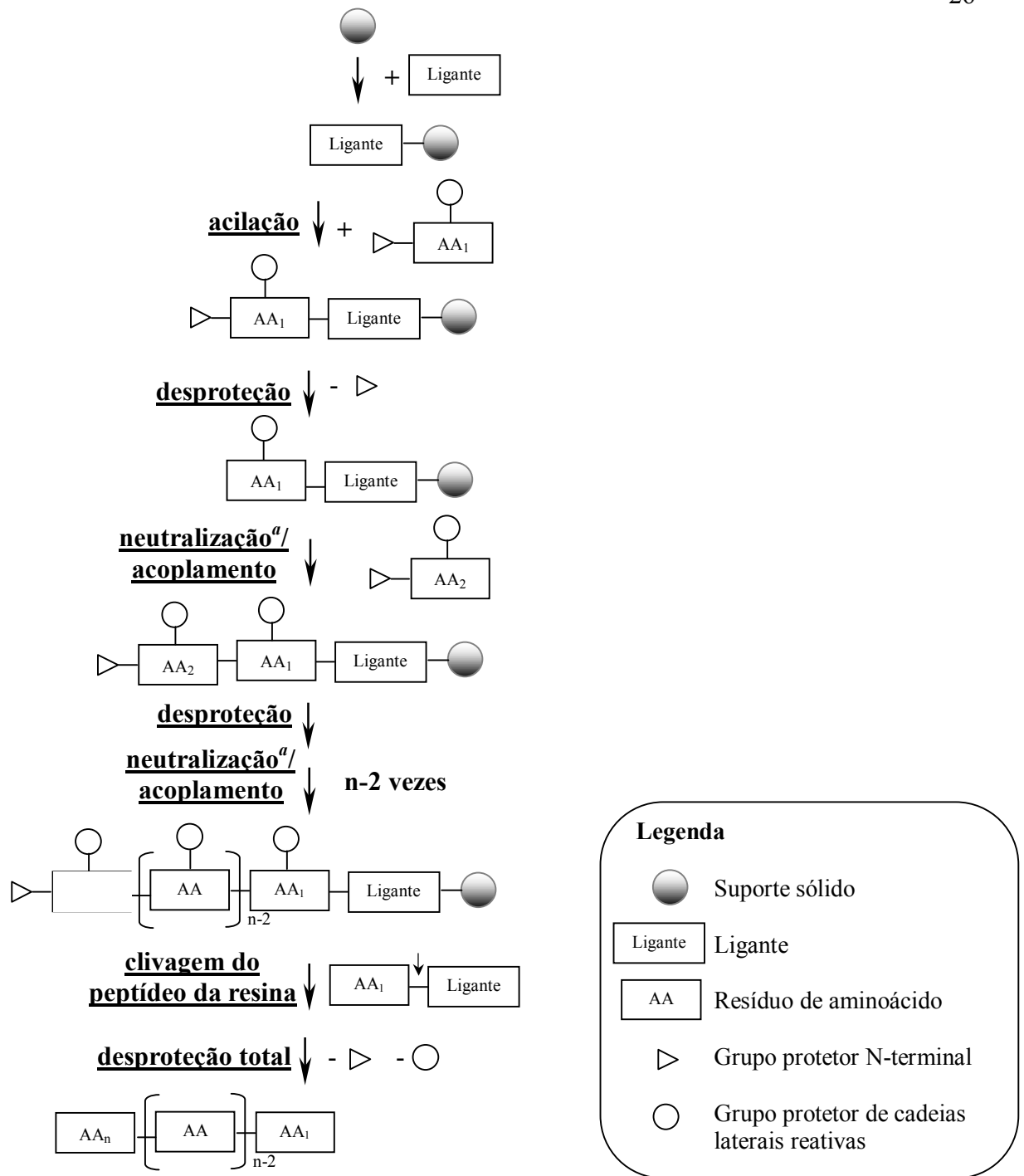
Há três metodologias para sintetizar peptídeos: 1. Síntese química, que pode ser em solução (ou clássica) ou em fase sólida; 2. Síntese enzimática ou biocatalisada, que pode ser cineticamente ou termodinamicamente controlada; 3. Síntese via tecnologia do DNA recombinante.

Apesar de muito diferentes, todas as três requerem a ativação do grupo carboxila do aminoácido que funcionará como doador de acila na reação de formação de ligação peptídica. Na síntese química (em solução e em fase sólida), um reagente químico (chamado reagente ativador ou acoplador) ativa este grupo, possibilitando um ataque nucleofílico do aminoácido acceptor de acila. Na síntese enzimática, a enzima ativa o doador de acila, formando um intermediário acil-enzima altamente reativo. Na síntese que utiliza a maquinaria ribossomal, o tRNA faz esse papel ligando-se no grupo carboxila do aminoácido e posteriormente a porção C-terminal da cadeia polipeptídica nascente.

Cada uma dessas metodologias apresenta vantagens e desvantagens e, portanto, a escolha deve levar em consideração a quantidade requerida e a natureza do peptídeo [tamanho, seqüência, presença de aminoácidos não usuais, amidação, sulfatação, fosforilação, ciclização (LLOYD-WILLIAMS,1997, MACHADO et al., 2004)]. Apesar de ainda apresentar problemas não resolvidos, a SPFS é dominante na área de síntese de peptídeos; de fato, atualmente, a maioria dos peptídeos é sintetizada por este método (LLOYD-WILLIAMS, 1997).

A síntese de peptídeos em fase sólida, que rendeu a Bruce Merrifield o Prêmio Nobel de Química em 1984 por sua concepção e desdobramentos (MERRIFIELD, 1963), utiliza um suporte polimérico (resina) que é funcionalizado por um ligante no qual o grupo carboxila do aminoácido que corresponde ao resíduo C-terminal da cadeia peptídica desejada (protegido no grupo  $\alpha$ -amino e na cadeia lateral reativa) se liga por meio de uma função amida ou éster. A síntese é continuada com ciclos sucessivos de desproteção do grupo  $\alpha$ -amino protetor da aminoacil- ou peptidil-resina e acoplamento do próximo aminoácido devidamente protegido (**Esquema 1**).

De acordo com os tipos de protetores empregados, a estratégia de síntese química de peptídeos em solução ou em fase sólida, pode ser dividida em dois tipos: *t*-Boc (que emprega



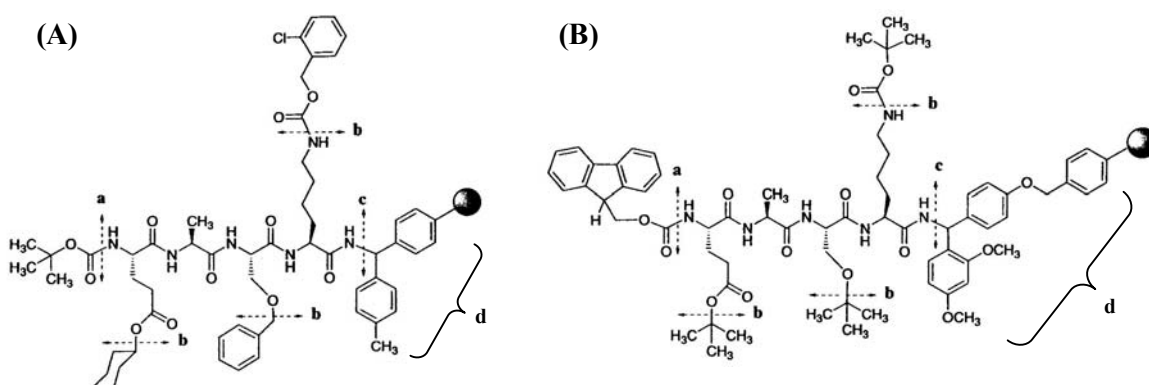
**Esquema 1: Síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo.** O esquema representa a síntese de um peptídeo com  $n$  resíduos de aminoácidos (adaptado de ANDREU; RIVAS, 2002). <sup>a</sup>: refere-se apenas à estratégia *t*-Boc.

o grupamento *t*-butiloxicarbonila para proteger o grupo  $\alpha$ -amino dos aminoácidos e derivados benzílicos para bloquear as cadeias laterais reativas, **Figura 6A**) e a Fmoc (que emprega a 9-fluorenilmtoxycarbonila e derivados *t*-butílicos para os mesmos fins, **Figura 6B**). Na estratégia *t*-Boc, todos os protetores são lábeis a ácidos inorgânicos fortes. Na estratégia

Fmoc, o grupo Fmoc é lábil a bases orgânicas, especialmente as secundárias e os protetores de cadeias laterais são lábeis a TFA.

A escolha da resina a ser utilizada leva em consideração: 1. a estratégia a ser utilizada, ou seja, a ligação peptídeo-resina deve ser estável às condições de remoção do protetor do grupo  $\alpha$ -amino, 2. se o grupo C-terminal será obtido após a clivagem do peptídeo da resina na forma amidada ou carboxila livre.

Há vários procedimentos para se realizar a clivagem do peptídeo da resina e a desproteção total. Na maioria das vezes, esta etapa envolve acidólise (JUBILUT et al., 1999). Na estratégia *t*-Boc, as peptidil-resinas são expostas a ácidos inorgânicos como o HF condensado, altamente tóxico que necessita de um aparato próprio para a sua utilização (STEWART; YOUNG, 1997). Na estratégia Fmoc, entretanto, as peptidil-resinas são submetidas a tratamento com o TFA (Esquema 1, FIELDS; NOBLE, 1990).



**Figura 6. Exemplos de peptidil-resinas obtidas pelas estratégias *t*-Boc (A) e Fmoc (B).** (a) protetor do grupo  $\alpha$ -amino lábil a TFA, Boc, (A) ou a bases orgânicas, Fmoc, (B); (b) bloqueadores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos lábeis a HF (A) ou TFA (B); (c) ligação da cadeia peptídica com a resina lábil a HF (A) ou TFA (B); (d).ligante. O círculo negro se refere ao suporte polimérico. Extraído de Andreu e Rivas (2002).

A utilização de captadores de espécies reativas (em inglês, *scavengers*) é de fundamental importância nesta etapa, já 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 1,2-etanoditiol (EDT) (LLYOD- WILLIAMS, 1997), embora derivados de silano, como o

TIS, possam também ser utilizados (SOLEÉ et al., 1992). A escolha depende da natureza dos grupos protetores e das cadeias laterais não protegidas. O Reagente R [TFA (90%), tioanisol (5%), EDT (3%) e anisol (2%) (ALBERICIO et al., 1990)], por conter o EDT, um dos *scavengers* mais eficientes para seqüências que possuem aminoácidos sensíveis (por exemplo, His, Gln, Ser, Asn, Thr, Tyr e Cys), é indicado para todas as seqüências (LLYOD-WILLIAMS, 1997).

A SPFS tem como vantagens a simplicidade, rapidez de execução e possibilidades de automação e de obtenção de múltiplas seqüências: isto porque os reagentes são eliminados por filtração, evitando as etapas de isolamento, purificação e caracterização dos produtos intermediários do processo sintético. Uma vez que as etapas da SPFS não são quantitativas e que um grande número de reações secundárias pode ocorrer simultaneamente, invariavelmente é necessário purificar os peptídeos sintéticos brutos obtidos. Para isso, podem ser empregadas: HPLC de troca-iônica e a de fase inversa (MANT; HODGES, 1991, MIRANDA et al., 1993a, KIYOTA et al. e 2003).

Os produtos purificados devem ser analisados por uma das diferentes modalidades de espectrometria de massas, de preferência aquelas que podem ser acopladas ao equipamento de HPLC, e submetidos à hidrólise total seguida de análise de aminoácidos. Além da identificação, esta última permite a elucidação do conteúdo peptídico, ou seja, a porcentagem em massa do peptídeo na amostra seca, uma vez que, mesmo após liofilização, esta contém contra-íons e moléculas de água no seu retículo cristalino. Esse dado é imprescindível quando os produtos purificados se destinam a ensaios biológicos ou que envolvam análises quantitativas. O seqüenciamento via degradação de Edman ou por espectrometria de massas com fragmentação é opcional, porém obrigatório para seqüências longas (acima de 25-30 resíduos). A ressonância magnética nuclear é outra técnica analítica para a caracterização dos peptídeos sintéticos curtos (MACHADO et al., 2004).

## 2 OBJETIVOS

1. Determinar se o fragmento Hb40-61a é a porção mínima do Hb33-61a capaz de expressar a sua atividades total frente a *C. albicans* e *M. luteus*, o que seria verificado pelo (a):

- a. desenho de novos análogos do Hb40-61a e do Hb33-61a com base nas informações geradas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e grupos colaboradores;
- b. síntese, purificação e caracterização química dos novos análogos;
- c. determinação da ação antifúngica e antibacteriana dos novos análogos purificados;
- d. análise por CD em água e na presença de 200 mM de SDS dos novos análogos purificados.

2. Avaliar o potencial de uso da hemocidina sintética Hb40-61a através da determinação do(a):

- a. atividade antimicrobiana frente a outras cepas de *C. albicans*, incluindo uma resistente a fluconazol;
- b. efeito da força iônica do meio na atividade antimicrobiana;
- c. toxicidade do peptídeo frente a células de mamíferos, medida por ensaio hemolítico;
- d. efeito da associação com outro antifúngico não peptídico utilizado na terapêutica;
- e. cinética de morte celular de *C albicans* causada pelo peptídeo.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

##### **Resinas**

A peptidil-resina Hb40-61-MBHA (MACHADO et al., 2007) e os peptídeos Hb33-61a, Hb33-52a, Hb48-61a foram sintetizados anteriormente em nosso laboratório. As seguintes resinas foram adquiridas: Boc-Lys (2-Cl-Z)-PAM [200-400 mesh, grau de substituição 0,4-0,7 mmol/g (Bachem Califórnia Inc., EUA)], Fmoc-Ala-Wang [100-200 mesh, grau de substituição 0,45 mmol/g (Bachem Califórnia Inc., EUA)] e Rink amida [100-200 mesh, de graus de substituição 0,3-0,6 mmol/g (Calbiochem-Novabiochem Corp., EUA) e 0,35 mmol/g (Bachem Califórnia Inc., EUA)].

##### **Derivados de aminoácidos e reagentes acopladores**

Com exceção da Fmoc-Gly-OH, os Boc-aminoácidos e os Fmoc-aminoácidos utilizados foram adquiridos da Bachem Califórnia Inc., EUA. O Fmoc-Gly-OH foi adquirido da Advanced Chemtech, EUA. Os reagentes acopladores utilizados foram: DIC (Sigma Chemical Co., EUA), HOBt (Protein Research Foundation, Japão), TBTU (Advanced ChemTech, EUA) e BOP (Advanced ChemTech, EUA).

##### **Solventes, ácidos, bases e detergentes**

Os solventes DCM, DMF, MeOH e 2-propanol (isopropanol), o DMSO, o EDT, a TEA, o TFA, o ácido ortofosfórico e o SDS vieram da Merck KGaA (Alemanha). O anisol e o tioanisol foram provenientes da Sigma Chemical Co. (EUA). O triisopropilsilano era da Aldrich Chemical Co. (EUA). A ACN era da Vetec Química Fina Ltda. (Brasil). O anidrido acético, a piperidina, a DIPEA, NMP e as soluções fenol/etanol 76% (m/m), cianeto de

potássio/piridina 0,0002 M e ninidrina/etanol 0,28 M utilizados eram da Applied Biosystems (EUA). O HF utilizado era de procedência da Quírios Produtos Químicos Ltda.

Todos eles eram de grau analítico ou para síntese, com exceção da ACN e TFA empregados nas análises por RP-HPLC, que eram de grau cromatográfico.

### **Meios de cultura**

Para os ensaios biológicos foram utilizados: meio PDB (pH  $5,1 \pm 0,2$ ) da Sigma-Aldrich (EUA), peptona (Merk AG, Alemanha), ágar bacteriológico (GIBCO BRL, EUA), cloreto de sódio (Synth, Brasil), D-glicose (Gibco BRL, EUA) e meio YNB (pH  $5,4 \pm 0,2$ ; contém os seguintes sais: fosfato de magnésio monobásico 1,0 g/L, sulfato de magnésio 0,5 g/L, cloreto de sódio 0,1 g/L e cloreto de cálcio 0,1 g/L) da Difco, EUA.

### **Microorganismos**

As cepas de *C. albicans* foram obtidas da Coleção Americana de Tipos de Cultura (ATCC 90028), da coleção do Instituto Adolfo Lutz, Brasil (IAL2151) e da Coleção do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, Brasil (MDM8). As duas primeiras nos foram doadas pela Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP e pelo Dr. Nilton Lincopan, atualmente no nosso Departamento e Instituto.

A cepa *Micrococcus luteus* A270 foi obtida da coleção do Instituto Pasteur, França.

### **Colunas para HPLC**

Para RP-HPLC, foram utilizadas as colunas Vydac C<sub>18</sub> analítica [0,46 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å] e semi-preparativa (1,1 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å).



Para HPLC de troca iônica, foram utilizadas uma coluna de troca aniônica AminoPac PA10 da Dionex (2,0 x 25,0 cm, 8,5  $\mu\text{m}$ , <10 Å) e uma coluna de troca catiônica da Beckman do tipo poliestireno sulfonada (0,4 x 12,0 cm).

### 3.2 Métodos preparativos

#### Síntese das peptidil-resinas

A síntese das peptidil-resinas foi realizada manualmente pelo método da fase sólida convencional utilizando a estratégia *t*-Boc ou Fmoc (STEWART; YOUNG, 1984, ATHERTON; SHEPPARD, 1989, VARANDA; MIRANDA, 1997; **Esquema 1 do item 1.3**).

A etapa inicial, que consiste de lavagem e filtração da resina com solventes de diferentes polaridades, e as etapas posteriores de desproteção, lavagem/filtração e de acoplamento, lavagem/filtração foram realizadas de acordo com os protocolos descritos nas **Tabelas 2 e 3** adaptados (VARANDA; MIRANDA, 1997, PROTI et al., 2007). Para o monitoramento das etapas de desproteção e acoplamento foi realizado o teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). Novas desproteções ou reacoplamentos foram feitos quando os testes de ninidrina não foram aceitáveis.

**Tabela 2: Protocolo de síntese convencional de peptídeos pela estratégia t-Boc** (adaptado de Varanda; Miranda, 1997)

<b>Etapa I: Lavagem Inicial</b>	<b>Etapa III: Acoplamento/Reacoplamento</b>
DCM	
10% TEA/DCM	2,5 eq. Boc-aa + [(2,5 eq. HOBt + 2,5 eq. DIC em DCM)] ou [2,5 eq. TBTU + 2,5 eq. DIPEA (pH 9-10) em DMF] por 60 min.
MeOH	
DCM	
Teste de ninidrina* (negativo)	
<b>Etapa II: Desproteção</b>	
50% TFA/DCM + 1% de anisol por 20 min)	DCM
DCM	MeOH
DCM	DCM
1% anisol/isopropanol	Teste de ninidrina* (negativo)
DCM	
10% TEA/DCM	
MeOH	
DCM	
Teste de ninidrina* (positivo)	<b>Repetição das Etapas II e III</b> até introduzir o último resíduo de aminoácido e retirar o Boc.

\* Kaiser et al. (1970).

**Tabela 3: Protocolo de síntese convencional de peptídeos pela estratégia Fmoc** (adaptado de Varanda; Miranda, 1997)

<b>Etapa I: Lavagem Inicial</b>	<b>Etapa III: Acoplamento/Reacoplamento</b>
DCM	2,5 eq. Fmoc-aa + [(2,5 eq. HOBt + 2,5 eq. DIC em DCM)] ou [2,5 eq. TBTU + 2,5 eq. DIPEA (pH 9-10) ou 2,5 eq. BOP+ 1 eq. HOBt + 7,5 eq. DIPEA em DMF] por 60 min.
MeOH	DMF
DCM	MeOH
Teste de ninidrina* (negativo)	DCM
	MeOH
	DCM
	Teste de ninidrina* (negativo)
<b>Etapa II: Desproteção</b>	
20% piperidina/DMF (10 min)	Repetição das <b>etapas II e III</b> até introduzir o último resíduo de aminoácido e retirar o Fmoc.
DMF	
MeOH	
DCM	
MeOH	
Teste de ninidrina* (positivo)	

\* Kaiser et al. (1970).

Nas peptidil-resinas Hb40-61a-MBHA e Hb40-61-PAM foram introduzidos grupos acetil em seus N-terminais, após remoção do Boc do último resíduo de aminoácido, através do tratamento com 10% de anidrido acético em DCM por 10 min. Após lavagens com DCM e MeOH, as peptidil-resinas foram submetidas ao teste de ninidrina (negativo; KAISER et al., 1970).

Ao final das sínteses, as peptidil-resinas foram secas a vácuo e estocadas a 4°C.

#### **Estratégia Boc: clivagem do peptídeo da resina e desproteção total**

As peptidil-PAM ou Ac-Hb40-61-MBHA foram tratadas com a mistura de 10 mL de HF condensado e anisol (10%) por 120 min a 0°C. Após remoção total do HF, o peptídeo livre foi precipitado com éter diisopropílico e extraído com aproximadamente 50 mL de solução de 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O e 50 mL de solução de 60% ACN/TFA 0,09%/H<sub>2</sub>O. As soluções resultantes foram misturadas e liofilizadas. O peptídeo bruto seco foi pesado, analisado e purificado por RP-HPLC.

#### **Estratégia Fmoc: clivagem do peptídeo da resina e desproteção total**

Testes preliminares em escala piloto foram feitos para a escolha da melhor mistura contendo TFA a ser utilizada em escala semi-preparativa. Nestes testes, a peptidil-resina Hb40-58-Rink amida foi empregada como modelo.

As seguintes misturas reacionais foram testadas: a) TFA (95%)/H<sub>2</sub>O (GUY; FIELDS, 1997); b) Reagente R = TFA (90%), tioanisol (5%), EDT (3%) e anisol (2%) (ALBERICIO et al., 1990); c) TFA (94%), anisol (5%) e EDT (1%) (GUY; FIELDS, 1997). Resumidamente, 10 mg de peptidil-resina foram incubadas em 100 µL de cada mistura a 37°C. Aliquotas da solução reacional foram retiradas e analisadas por RP-HPLC nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 24 h, após os quais, o peptídeo livre em solução foi precipitado pela adição de éter diisopropílico. Após centrifugação, o sobrenadante foi decantado. Esta operação foi repetida por mais duas vezes e o resíduo sólido foi seco por passagem de nitrogênio gasoso. O peptídeo foi então dissolvido pela adição de 1 mL de solvente A ao sólido, a solução foi filtrada e analisada por RP-HPLC (equipamento descrito no **item 3.3**, solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL min e gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min) e por LC-ESI/MS (Condições LC: solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60% ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, λ: 210nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5 a 95% de A em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>).

As reações em escala preparativa foram realizadas utilizando as melhores condições encontradas na escala piloto (em alguns casos, o EDT foi substituído pelo TIS):

Peptidil-resina /massa (mg)	Mistura reacional	Volume (mL)	Tempo (h)
Hb40-61-Rink amida/ 298	95% TFA/2,5%TIS/2,5% H <sub>2</sub> O	3,0	6
Hb40-56-Rink amida/ 262	Reagente R	2,6	5
Hb35-56-Rink amida/ 243	Reagente R	2,4	5
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58-Rink amida/ 255	95 %TFA/2,5% TIS/2,5% H <sub>2</sub> O	2,6	6
Hb40-63-Wang/ 149	95 %TFA/2,5% TIS/2,5% H <sub>2</sub> O	1,5	6

Nestes casos, os peptídeos brutos foram solubilizados em aproximadamente 50 mL de solução de 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O e 50 mL de solução 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O. As soluções

resultantes foram liofilizadas e os peptídeos secos foram pesados, analisados e purificados por RP-HPLC.

### **Purificação dos peptídeos brutos por RP-HPLC (KIYOTA et al., 2003)**

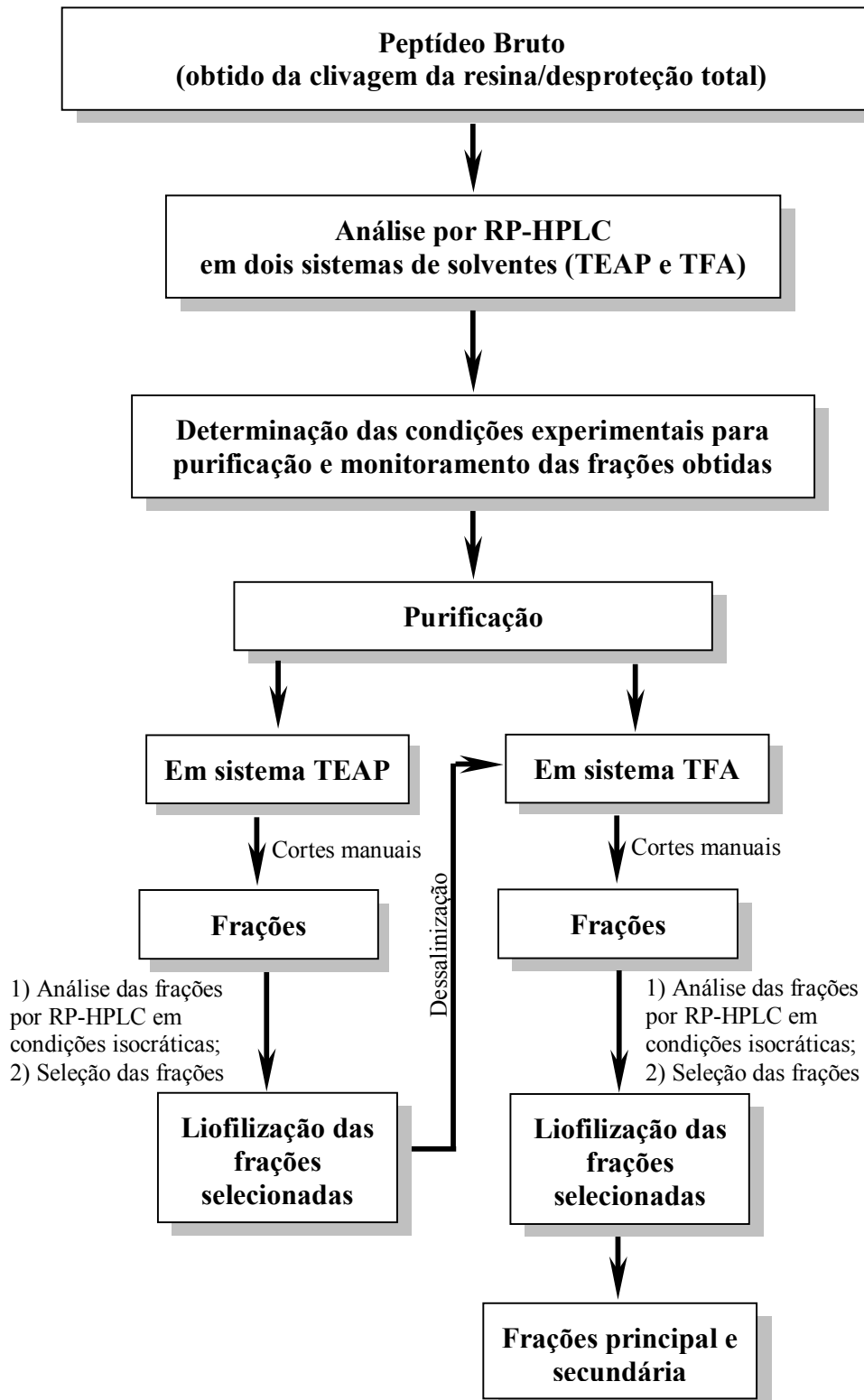
As purificações foram feitas por RP-HPLC em uma etapa (para os peptídeos Hb40-58a e [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a) ou em duas etapas (para os peptídeos AcHb40-61a, AcHb40-61, Hb40-61a, Hb40-56a, Hb35-56a e Hb40-63) conforme o **Esquema 2**.

Para os peptídeos purificados em duas etapas, a primeira empregou as seguintes condições:  $\lambda$ : 220 nm, fluxo: 10,0 mL/min e gradiente linear com variação de 30 % de B em 90 min utilizando a mistura H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TEA (TEAP) em pH 2,2-2,4 como solvente A e 40% ACN/TEAP (AcHb40-61a e AcHb40-61) ou 45% ACN/TEAP (Hb40-56a e Hb35-56a) ou 60% ACN/TEAP (Hb40-61a) como solvente B. Após esta etapa, as melhores frações (analisadas em condições isocráticas previamente determinadas) foram juntadas e liofilizadas. O sólido obtido foi dissolvido na solução de 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O e dessalinizado na segunda etapa da purificação que empregou o mesmo gradiente da etapa anterior e 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O como solvente A e 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O como solvente B.

Nas purificações em uma única etapa, foi empregado o sistema que contém TFA.

Os seguintes instrumentos foram utilizados: a) Waters 600E composto de bomba 600E, controlador 600, injetor manual Rheodyne 7725i, detector 2487 e registrador Servogor 124 da LEM Norma GmbH; b) Beckman Instruments, modelo System Gold composto de bombas module 126 e detector module 166, controlador NEC PC-8300, registrador de 2 canais KBL 2210.

Esquema 2. Rotina para as purificações dos peptídeos sintéticos por RP-HPLC.



### **3.3 Métodos analíticos e de caracterização dos peptídeos**

#### **Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC)**

As análises dos peptídeos brutos e purificados por RP-HPLC foram feitas em um cromatógrafo LDC Analytical composto por um detector SpectroMonitor 3100, bombas ConstaMetric 3200 e 3500, um injetor manual Rheodyne 7125, um integrador DataJet e um detector UV (MILTON ROY, Spectromonitor 3100). Estas análises foram feitas em dois sistemas de solventes: o primeiro que utiliza 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O como solvente A e 60% ACN/0,09% TFA/H<sub>2</sub>O como solvente B e outro que utiliza TEAP em pH 2,2-2,4 como solvente A e 45-60% ACN/TEAP como solvente B. Foram empregados dois tipos de gradientes lineares: rápido= 5 a 95% em 30 min (3% de B/min); lento= 1% de B/min em 30 min.

#### **RP-HPLC acoplada à espectrometria de massas (LC-ESI/MS)**

Os peptídeos brutos e purificados obtidos também foram analisados e caracterizados num equipamento multi-usuário do nosso Departamento do tipo triplo quadrupolo da Micromass, modelo Quattro II, com fonte de ionização por electrospray (ESI-MS), que é acoplado a um sistema de HPLC da Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-10AD, um detetor Shimadzu SDP-10AV e injetor Rheodyne 7125.

Os peptídeos Hb40-61a e Hb40-56a purificados também foram analisados por ESI-MS na Central Analítica do IQ-USP no equipamento Esquire 3000 Plus com separador de íons do tipo íon-trap.

#### **Hidrólise total e análise de aminoácidos**

As hidrólises totais dos peptídeos purificados foram realizadas em uma estação de trabalho PicoTag da Waters. Para isso, 10 µL de uma solução 1 mmol/L do peptídeo purificado foram submetidos à hidrólise ácida gasosa em presença de HCl 6 mol/L e cristais

de fenol, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, a 110°C por 24 h. As composições molares dos aminoácidos nos hidrolisados obtidos foram determinadas nos seguintes analisadores automáticos:

- a) Beckman Instruments Inc., modelo 7300, acoplado a um computador que utiliza o programa System Gold 406 para controle e aquisição de dados. Este equipamento emprega o método de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos são separados por HPLC de troca catiônica e detectados a 440 a 570 nm como produtos da reação com ninidrina (SMILLIE; NATTRISS, 1991);
- b) Dionex BioLC<sup>®</sup> Chromatography System, que é composto por bombas GS50, detector eletroquímico ED50 e forno cromatográfico LC25 e é acoplado a um computador que utiliza a plataforma “Chromeleon” para controle e aquisição dos dados. Este equipamento faz a detecção direta dos aminoácidos por amperometria pulsada (IPAD - Integrated Pulsed Amperometric Detection), após separação por HPLC de troca iônica.

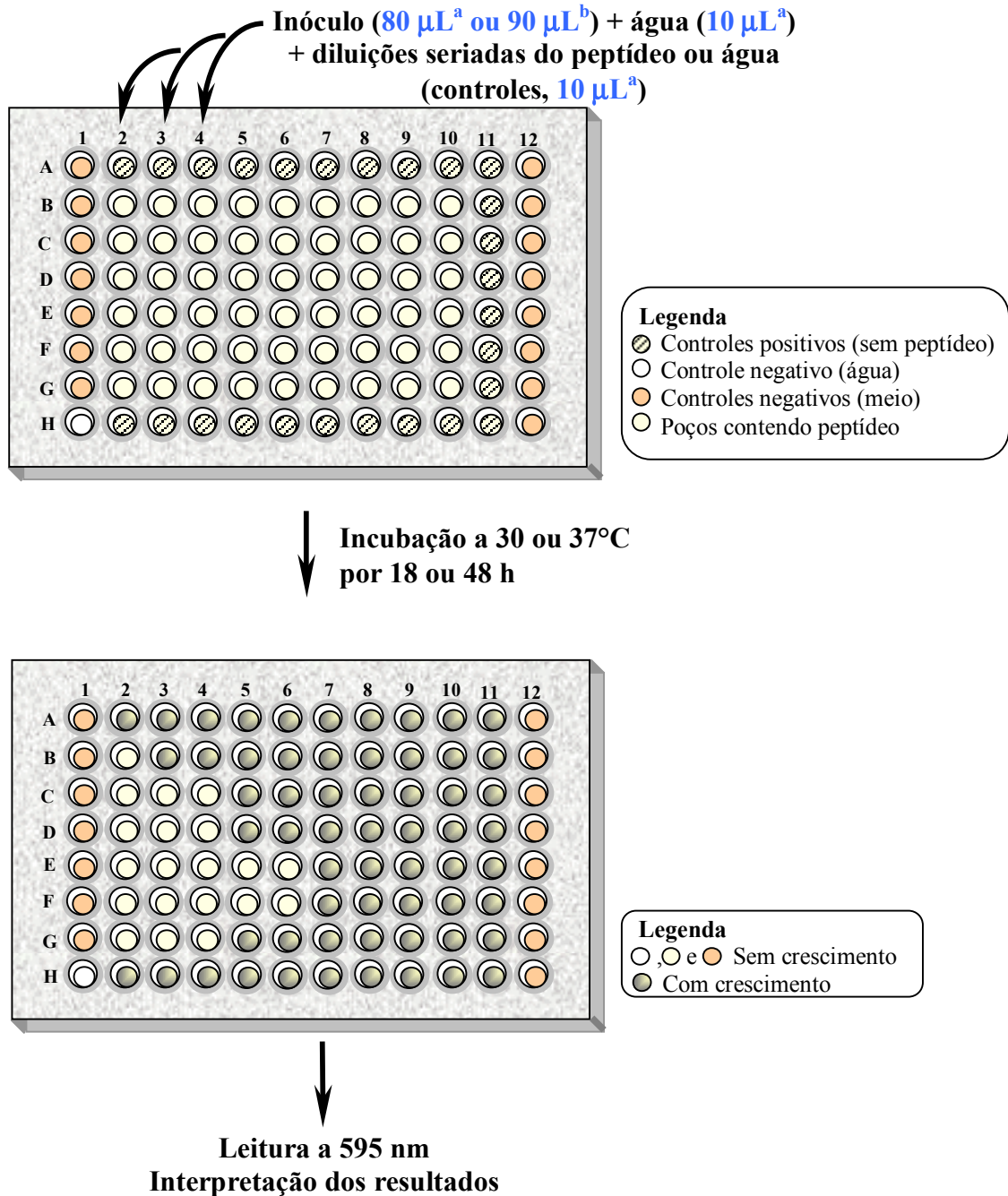
A proporção molar dos aminoácidos foi determinada utilizando soluções-padrão

Os dados obtidos permitiram estimar os conteúdos peptídicos dos materiais purificados e esses foram considerados ao preparar as soluções de concentrações definidas que foram empregadas nos bioensaios e análises conformacionais.

### 3.4 Bioensaios

#### a) Atividade antifúngica

Esta foi medida frente a *C. albicans* pelo método da microdiluição em caldo descrito por Fehlbaum et al., 1994 (**Figura 7**). Resumidamente, em cada um dos 96 poços de uma microplaca foram colocados 10 µL de cada solução de uma série de diluições do peptídeo em água (0,78-200 µM) e 80 µL de uma suspensão de células de *C. albicans* MDM8 (concentração final  $1 \times 10^4$  células/mL de 1,2% de PDB). A cada poço foi adicionada água



**Figura 7.** Esquema do procedimento utilizado para a determinação das MICs frente a *C. albicans* e *M. luteus*. <sup>a</sup> Refere-se à atividade antifúngica; <sup>b</sup> Refere-se à atividade antibacteriana

para um volume final de  $100 \mu\text{L}$ . Depois de 18 h de incubação a  $30^\circ\text{C}$ , as concentrações inibitórias mínimas do crescimento (MICs) dos peptídeos sintéticos foram determinadas em leitor de microplaca IEMS (LABSYSTEM™) a 595 nm pela diminuição dos valores de



absorbância representativos de 50% de crescimento em relação aos controles (sem peptídeo). A MIC foi expressa como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] era a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] era a menor concentração testada na qual ocorreu inibição do crescimento de *C. albicans* (Segundo EHRET-SABATIER et al., 1996). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade do peptídeo Hb40-61a frente a *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e outras cepas de *C. albicans* (ATCC 90028, cepa sensível ao fluconazol, e IAL 2151, resistente a fluconazol) foi também determinada utilizando o método de referência de microdiluição em caldo segundo documento M27-A2 do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute* Available from: <[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_publicacoes\\_terapia\\_antifung.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_terapia_antifung.pdf)>, acesso em 01/10/07) com substituições para os seguintes meios de cultura: o PDB 1,2% sem adição de sal e YNB. Resumidamente, 50 µL de cada solução de uma série de diluições do peptídeo em água (0,78-200 µM) foram adicionados a 50 µL de uma suspensão de levedura de concentração final na faixa  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Após incubação por 48 h a 37°C, as MICs foram determinadas como descrito acima. Estes ensaios foram realizados uma única vez.

#### **b) Atividade antibacteriana**

A atividade frente a *M. luteus* foi realizada pelo método da microdiluição em caldo descrito por Bulet et al., 1993 (**Figura 7**). Resumidamente em cada um dos 96 poços de uma microplaca foram colocados 10 µL de cada solução de uma série de diluições do peptídeo (0,78-100 µM) e 90 µL de uma suspensão de *M. luteus* A270 (concentração final de  $1 \times 10^4$  células/mL de meio pobre em nutrientes [PB: 1% Peptona contendo 34,2 mM de NaCl; pH 7,4]. Aos poços sem peptídeo foi adicionada água para um volume final de 100 µL. Depois de

18 h de incubação a 30°C, a MIC foi determinada como descrito acima. Os ensaios foram realizados em triplicata. A determinação da atividade do peptídeo Hb40-61a frente a *S. epidermidis*, *B. megaterium* e *S. marcescens* foi realizada pelo método descrito acima em meio PB contendo 86 mM de NaCl. Estes ensaios foram realizados uma única vez.

**c) Efeito da força iônica do meio nas atividades do peptídeo Hb40-61a frente a *C. albicans* e a *M. luteus***

As atividades foram medidas pelo método da microdiluição em caldo segundo Fehlbauer et al. (1994), conforme descrito acima, na presença de diferentes concentrações de NaCl para o peptídeo Hb40-61a (0,0; 34,2; 68,5 e 137,0 mM).

**d) Efeito da associação do fluconazol e do peptídeo Hb40-61a no crescimento celular**

Em uma dimensão de uma microplaca de 96 poços foram colocados em cada poço 10 µL de cada solução de uma série de diluições do peptídeo Hb40-61a em água (0,78-25 µM). Em uma segunda dimensão, foram colocados em cada poço 10 µL de uma série de diluições de fluconazol em água (0,06-8 µg/mL). Cada poço foi inoculado com 80 µL de uma suspensão de células de *C. albicans* ATCC 90028 (concentração final  $1 \times 10^4$  células/mL). A cada um foi adicionada água para um volume final de 100 µL. A placa foi incubada por 18 h a 30°C e submetida à leitura em 595 nm.

A MIC foi considerada a menor concentração do agente que inibiu o crescimento do organismo. Estes valores foram utilizados para calcular a concentração inibitória fracionária (FIC), definida como a razão do MIC entre o agente utilizado em combinação e o MIC do agente antimicrobiano sozinho. O índice FIC (FICI) foi considerado como a soma dos FIC de cada agente nas suas concentrações mais efetivas (ou seja, o menor FICI obtido foi utilizado; BONAPACE et al., 2002):

$$A / MIC_A + B / MIC_B = FIC_A + FIC_B = \text{Índice FIC (FICI)}$$

**A** é a menor concentração inibitória do agente antimicrobiano em combinação. **MIC<sub>A</sub>** é a MIC do agente antimicrobiano sozinho. **FIC<sub>A</sub>** é a concentração inibitória fracionária do agente antimicrobiano **A**. **B**, **FIC<sub>B</sub>** são definidos da mesma maneira. **FICI** é a soma dos FIC de cada agente antimicrobiano. Extraído de Eliopoulos e Moellering (1996).

Os dados foram analisados segundo o seguinte critério  $FICI \leq 0,5$ : sinergismo;  $0,5-4,0$ : sem interação e  $>4,0$ : antagonismo (ODDS, 2003). O ensaio foi realizado em duplicata.

#### e) Ensaio Hemolítico (modificado de FÁZIO et al., 2006)

Amostras de aproximadamente 8 mL de sangue de doadores saudáveis foram coletadas em tubo a vácuo contendo heparina como anticoagulante. Os eritrócitos foram separados por centrifugação por 5 min a 4°C a 300 x g e lavados 3 vezes com tampão fosfato de sódio (PBS: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, contendo 140 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,4; 313 mOsm/kg de água, medida pelo osmômetro OSMETTE A (Precision systems Inc, modelo 5002, EUA). O concentrado de células foi suspenso em PBS e depois diluído para uma concentração de eritrócitos de 0,44% em PBS ou em tampão fosfato isotônico (IGP: tampão fosfato de potássio 1mM suplementado com 287 mM de glicose; pH 7,4, 314 mOsm/kg de água, medida pelo osmômetro descrito acima; WEI; BOBEK, 2004).

Em alguns dos 96 poços de uma microplaca (TPP código 92096, Suíça), 90 µL da suspensão 0,44% de eritrócitos de PBS foram adicionados a 10 µL de soluções de concentrações variadas de Hb40-61a em água (0,20-50 µM). Controles positivos (SDS 0,1% em PBS) e negativos (água sem peptídeo) também foram feitos. Nos outros poços foram colocados 180 µL da suspensão 0,44% de eritrócitos em IGP, aos quais foram adicionados 20 µL de soluções de concentrações variadas de Hb40-61a em IGP (0,20-50 µM). Controles positivos (SDS 0,1% em IGP) e negativos (IGP) também foram feitos. Após incubação por 1 h a 37°C e centrifugação a 300 x g a 4°C por 5 min, 50 µL dos sobrenadantes foram

transferidos para uma microplaca de 96 poços que foi submetida a leitura em 405 nm (**Figura 8**).

A porcentagem de hemólise foi calculada usando a fórmula:

$$[(Abs\ peptideo - Abs\ controle\ negativo)/(Abs\ controle\ positivo - Abs\ controle\ negativo)]$$

Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes em triplicatas.

#### **f) Cinética de morte celular** (modificado de DESTOUMIEX-GARZÓN et al., 2001)

Em cada um dos 96 poços de uma microplaca (TPP código 92096, Suíça) foram colocados 10 µL de solução aquosa de Hb40-61a em água (25,0 µM ou 62,5 µM) e 80 µL da suspensão de células de *C. albicans* MDM8 na fase log de crescimento (concentração final:  $1 \times 10^4$  células/mL de 1,2% PDB isento de NaCl). A cada poço foi adicionada água para um volume final de 100 µL. Controles contendo água sem peptídeo foram feitos. A incubação foi realizada a 30°C. Aliquotas de 10 µL dos controles foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, e 40 min, 1 h, 2 h e 4 h e diluídas (100x, 1000x e 10000x em 1,2% PDB). Aliquotas de 50 µL dos poços contendo peptídeo foram retiradas nos mesmos tempos e diluídas (5x, 10x ou 80x em 1,2% PDB). Um volume de 50 µL destas suspensões sem diluição ou com diluição foi inoculado em ágar Sabouraud e incubado por 24 h a 37°C para a contagem posterior das colônias desenvolvidas.

### **3.5 Análises por dicroísmo circular**

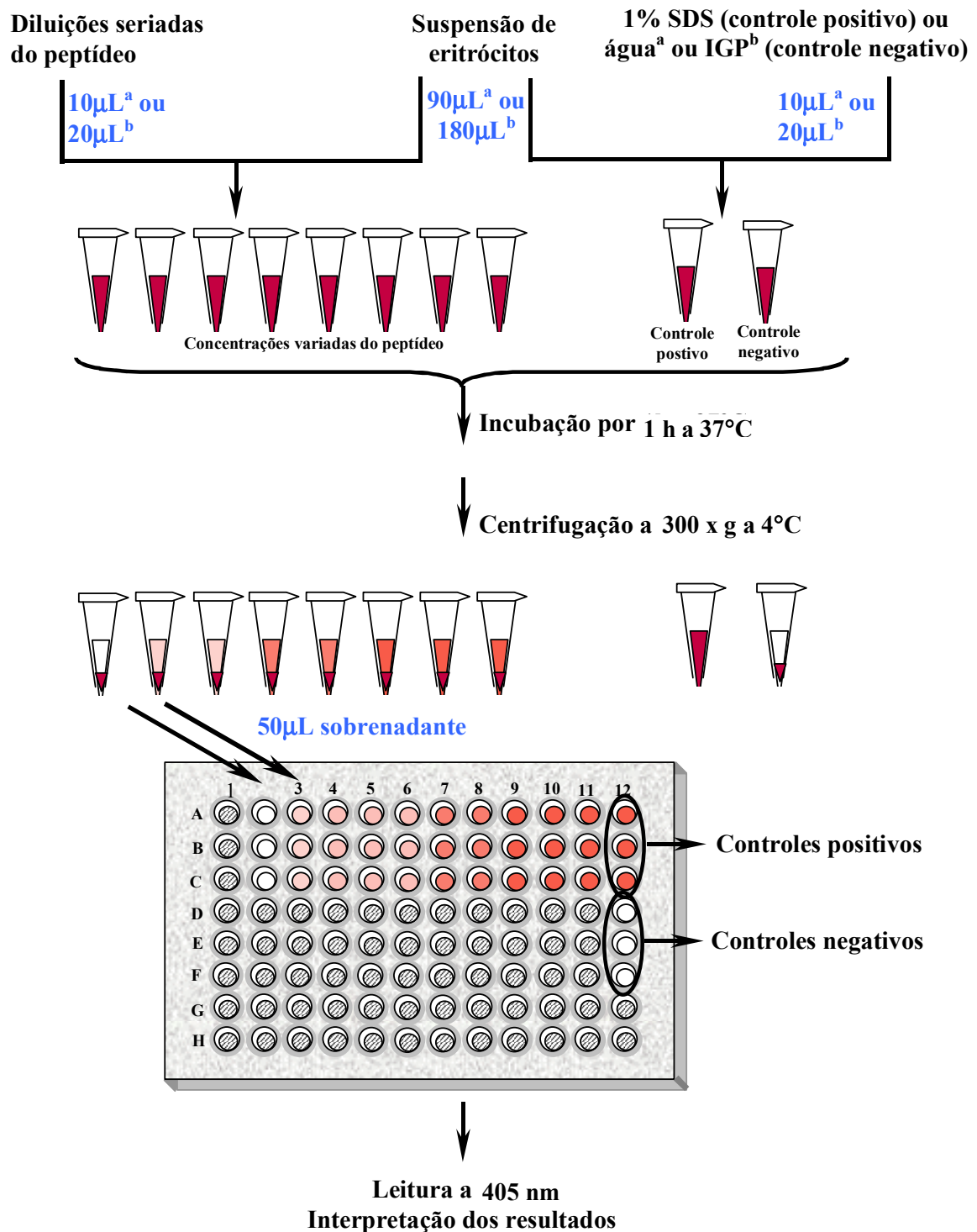
O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica baseada na diferença de absorção de moléculas opticamente ativas da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda e que pode ser utilizada para determinar a estrutura secundária de proteínas e peptídeos em solução (FORATO et al., 1998; GREENFIELD, 1999; SANTOS et al., 2007). Através dessa técnica se obtém os valores de elipticidade:

$$\theta = 2,303(A_E - A_D) \frac{180}{4\pi}$$

onde  $A_E$  e  $A_D$  são, respectivamente, absorvância da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita.

Os diferentes motivos estruturais apresentam espectros de CD característicos na região do ultravioleta distante (178-250 nm): por exemplo,  $\alpha$ -hélices apresentam banda negativa a 222 e 208 nm e positiva a 193 nm; folhas  $\beta$  apresentam banda larga negativa próxima a 218 nm e banda larga positiva próxima a 195 nm; banda larga negativa a 200 nm e larga positiva a 217 nm indicam ausência de estruturação (estrutura randômica; GREENFIELD, 1999). O espectro de uma dada molécula permite avaliar a sua estrutura secundária, pois este será a soma dos espectros de seus elementos estruturais (GREENFIELD, 1999).

Massas dos peptídeos Hb40-61a, Hb35-56a, Hb40-56a, [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a e Hb40-63 foram dissolvidos em água, pH 4,0 ou água contendo 200 mM de SDS, pH 4,0, produzindo soluções de diferentes concentrações. Essas soluções foram submetidas ao registro dos espectros a 20°C em espectropolarímetro Jasco J-810 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan) acoplado a um controlador de temperatura (Peltier Jasco PFD-425S) do Departamento de Biofísica da UNIFESP. Foram realizadas oito acumulações na faixa de comprimento de onda 190-250 nm. Os dados obtidos em elipticidade,  $\theta$ , foram convertidos a elipticidade molar média  $[\theta]$  (deg.cm<sup>2</sup>dmol<sup>-1</sup>).



**Figura 8.** Esquema para realização do ensaio hemolítico para os peptídeos estudados. A placa mostra o ensaio em triplicata. <sup>a</sup> Ensaio em PBS <sup>b</sup> Ensaio em IGP.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos

#### a) Considerações gerais

Os dados quantitativos de síntese, purificação e caracterização química dos peptídeos estudados estão descritos nas **Tabelas 4 e 5**.

A síntese dos peptídeos Ac-Hb40-61, Ac-Hb40-61a, Hb40-61a, Hb40-58a, [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a, Hb40-56a, Hb35-56a e Hb40-63 ocorreu sem grandes problemas até o acoplamento da Leu-47, a partir do qual parte das novas etapas de desproteção e acoplamento tiveram de ser repetidas.

Apesar de não ter havido problemas nas purificações dos peptídeos brutos, os rendimentos foram bastante baixos, o que pode ser explicado pela presença de contaminantes de comportamentos cromatográficos similares aos dos peptídeos desejados.

#### b) Peptídeo Ac-KTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAK-NH<sub>2</sub> (Ac-Hb40-61a)

O rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total para fornecer o peptídeo bruto foi de 45%. Os perfis de RP-HPLC do peptídeo bruto nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 9A**) e TEAP (**Figura 9B**) revelaram a presença de diversos componentes. A análise por LC-ESI/MS (**Figura 9C**) indicou que o peptídeo desejado era o componente majoritário (pico 3) e os picos 1 e 4 correspondiam aos seguintes subprodutos da síntese: o análogo deletado em uma Phe e o análogo contendo uma Ala adicional, respectivamente. O componente correspondente ao pico 2 não foi identificado.

O rendimento total de obtenção do peptídeo, com pureza superior a 95%, foi de 2% (**Figuras 10A e 10B**). A composição de aminoácidos e a massa molar obtidas confirmaram a

Tabela 4. Resultados quantitativos das sínteses e purificações dos peptídeos estudados

Peptídeo	Construção da cadeia peptídica		Peptidil-resina (mg)	Clivagem do peptídeo da resina/ desproteção total		Purificação
	Resina (mg)/ GS (mmol/g)	Peptidil-resina (mg)		Peptídeo bruto <sup>a</sup> (mg)	Peptídeo purificado (mg)	
Ac-Hb40-61a	-	-	269,9	148,0	6,7 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 2,1 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
Hb40-61a	1000/0,35	1000	297,8	87,0	16,5 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 5,6 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
			237,4	79,0	7,1 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 6,2 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
Ac-Hb40-61	400/0,52	432	150,0	50,0	6,0 (fração 1 <sup>ª</sup> )	
			300,3	162,9	1,9 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 0,7 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
Hb40-58a	500/0,22	703	131,7	51,0	0,4 (fração 1 <sup>ª</sup> )	
			295,2	147,3	2,9 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 29,3 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58a	600 /0,30	669	255,3	89,6	6,5 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 6,9 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
			261,8	84,02	25,3 (fração 1 <sup>ª</sup> )	
Hb35-56a	380/0,35	380	243,0	88,8	1,5 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 1,8 (fração 2 <sup>ª</sup> )	
			137,0	15,3	<1 (fração 1 <sup>ª</sup> )	
Hb40-63	300 /0,45	317	149,0	58,6	7,2 (fração 1 <sup>ª</sup> ) 0,8 (fração 2 <sup>ª</sup> )	

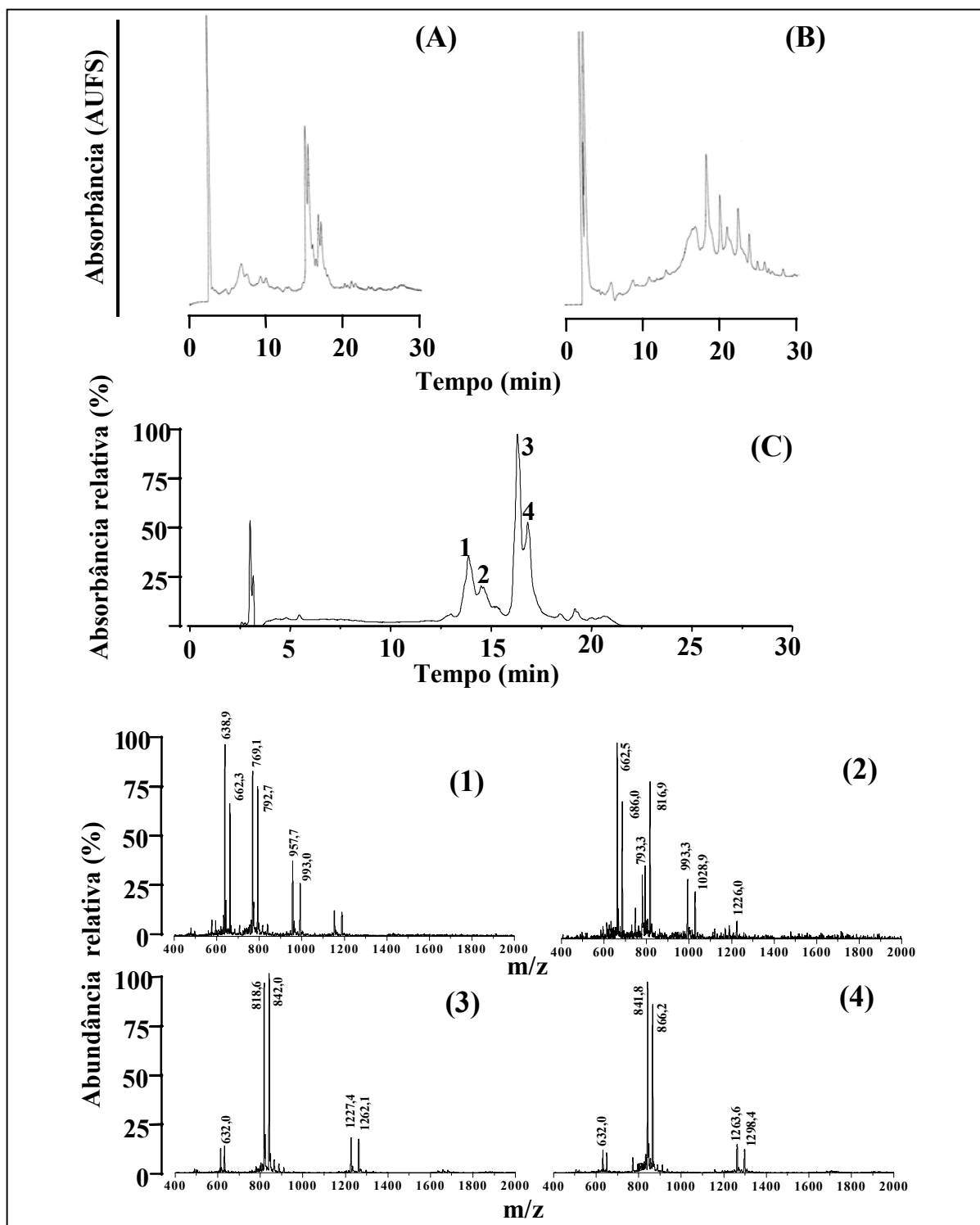
GS: grau de substituição ou aminoacilação. <sup>a</sup> refere-se também à quantidade de material submetido à purificação.



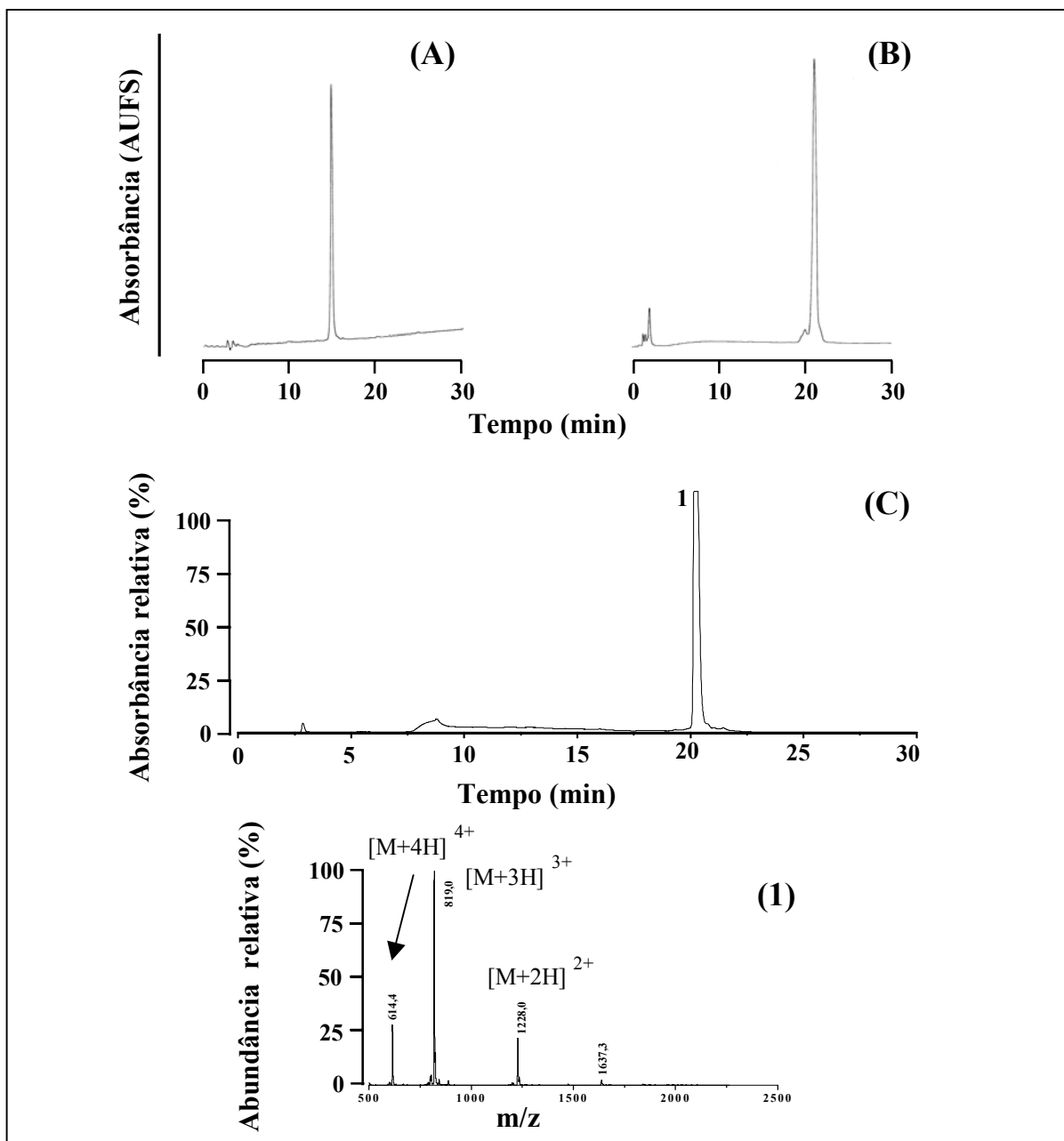
Tabela 5. Caracterização química dos peptídeos sintetizados

Peptídeo	Pureza (%)		Massa molecular obs. (calc.) (u)	Composição molar de aminoácidos <sup>i</sup> obs. (calc.)	Conteúdo Peptídico (%) <sup>j</sup>
	Sistema contendo TFA	Sistema contendo TEAP			
Ac-Hb40-61a	99 <sup>a</sup>	95 <sup>e</sup>	2454,52 (2453,77)	K: 2,87 (3); A: 2,20 (2); T: 0,93 (1); G: 3,10 (3); V: 0,87 (1); S: 1,73 (2); P: 1,10 (1); L: 1,00 (1); H: 2,97 (3); F: 2,17 (2); Q: 1,07 (1); D: 1,07 (1); Y: 0,97 (1).	65
Hb40-61a	100 <sup>b</sup>	100 <sup>f</sup>	2412,50 (2411,73)	K: 2,65 (3); A: 2,53 (2); T: 0,93 (1); G: 3,14 (3); V: 1,00 (1); S: 2,18 (2); P: 1,15 (1); L: 1,39 (1); H: 2,30 (3); F: 2,05 (2); Q: 1,16 (1); D: 1,36 (1); Y: 0,69 (1).	67
Ac-Hb40-61	96 <sup>a</sup>	100 <sup>e</sup>	2455,18 (2454,75)	K: 2,72 (3); A: 1,86 (2); T: 0,94 (1); G: 2,40 (3); V: 1,00 (1); S: 1,66 (2); P: 1,09 (1); L: 0,96 (1); H: 2,70 (3); F: 2,00 (2); Q: 1,09 (1); D: 1,19 (1); Y: 1,41 (1).	66
Hb40-58a	94 <sup>c</sup>	100 <sup>e</sup>	2156,08 (2155,42)	K: 1,93 (2); A: 1,09 (1); T: 0,90 (1); G: 1,88 (2); V: 1,00 (1); S: 1,46 (2); P: 0,98 (1); L: 0,88 (1); H: 2,47 (3); F: 1,86 (2); Q: 0,98 (1); D: 1,08 (1); Y: 1,25 (1).	84
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58a	98 <sup>a</sup>	99 <sup>g</sup>	2169,5 (2169,45)	K: 1,97 (2); A: 2,54 (2); T: 1,00 (1); G: 1,29 (1); V: 1,00 (1); S: 0,34 (2); P: 1,13 (1); L: 1,12 (1); H: 1,88 (3); F: 1,54 (2); Q: 1,02 (1); D: 1,09 (1); Y: 0,76 (1).	67
Hb40-56a	88 <sup>a</sup>	88 <sup>g</sup>	1961,70 (1961,23)	K: 2,26 (2); A: 1,33 (1); T: 0,47 (1); G: 1,09 (1); V: 1,00 (1); S: 0,91 (2); P: 0,61 (1); L: 0,86 (1); H: 2,01 (2); F: 1,52 (2); Q: 0,90 (1); D: 0,85 (1); Y: 0,97 (1).	76
Hb35-56a	100 <sup>d</sup>	100 <sup>g</sup>	2495,60 (2494,91)	K: 1,69 (2); A: 1,01 (1); T: 0,85 (3); G: 1,08 (1); V: 1,00 (1); S: 1,64 (2); P: 1,25 (2); L: 0,82 (1); H: 0,62 (2); F: 2,28 (3); Q: 1,72 (1); D: 0,58 (1); Y: 0,22 (1).	67
Hb40-63	100 <sup>a</sup>	98 <sup>h</sup>	2583,00 (2582,93)	K: 2,00 (3); A: 3,05 (3); T: 0,80 (1); G: 2,65 (3); V: 2,00 (2); S: ND (2); P: 0,90 (1); L: 0,80 (1); H: 2,10 (3); F: 1,90 (2); Q: 1,10 (1); D: 1,10 (1); Y: 1,10 (1).	55

Condições de análise por RP-HPLC: coluna Vydac C<sub>18</sub>, λ: 210 nm, fluxo: 1 mL/min, (a): solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min; (b): solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, gradiente linear: 28 a 58% de B em 30 min; (c): solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min; (d): solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, gradiente linear: 32 a 62% de B em 30 min; (e): solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min; (f): solvente A: TEAP, solvente B: 60%ACN/TEAP e gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min; (g): solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP e gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min; (h): solvente A: TEAP, solvente B: 60%ACN/TEAP, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min; (i) Os erros observados são toleráveis neste tipo de análise; (j) porcentagem em massa do peptídeo na amostra seca.



**Figura 9.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Ac-Hb40-61a bruto. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2), (3) e (4): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 10.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Ac-Hb40-61a purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC, (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) ou 5 a 95% de B em 30 min (C), **B:** coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 50 kV, modo de ionização: ES<sup>+</sup>.

sua identidade (**Tabelas 4 e 5**).

**c) Peptídeo KTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAK-NH<sub>2</sub> (Hb40-61a)**

Neste caso, o rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total, que forneceu o peptídeo bruto, foi de 35%. Os perfis de RP-HPLC do peptídeo bruto nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 11A**) e TEAP (**Figura 11B**) e a análise por LC/ESI-MS mostraram que o produto principal era o peptídeo desejado (**Figura 11C**).

O rendimento total de obtenção do peptídeo com pureza de praticamente 100% segundo a **Figura 12** foi de 7%. A composição de aminoácidos e a massa molar obtidas concordam com os valores teóricos e os erros observados são toleráveis (**Tabela 5**).

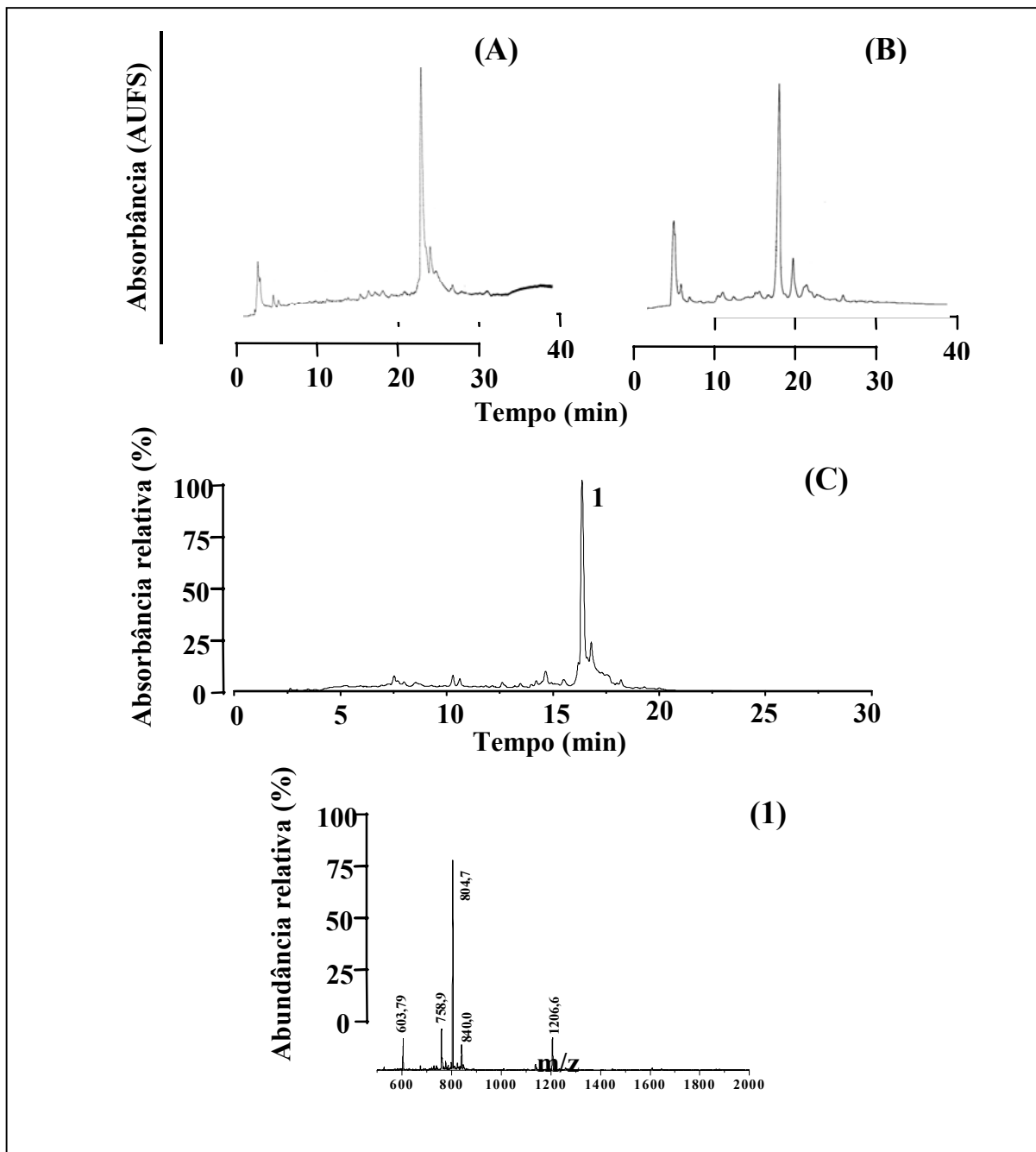
**d) Peptídeo Ac-KTYFPHFDSLHGSAQVKGHGAK (Ac-Hb40-61)**

O rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção, para a obtenção do peptídeo bruto, foi de 46%. Os perfis de RP-HPLC nos sistemas de solventes contendo TFA e TEAP estão mostrados nas **Figuras 13A e 13B**. O peptídeo desejado foi identificado por LC-ESI/MS como correspondente ao pico 4 na **Figura 13C**. Os outros componentes (picos 1 e 2) foram identificados como isômeros do subproduto Ac-HGSAQVKGHGAK. O componente correspondente ao pico 3 não foi identificado.

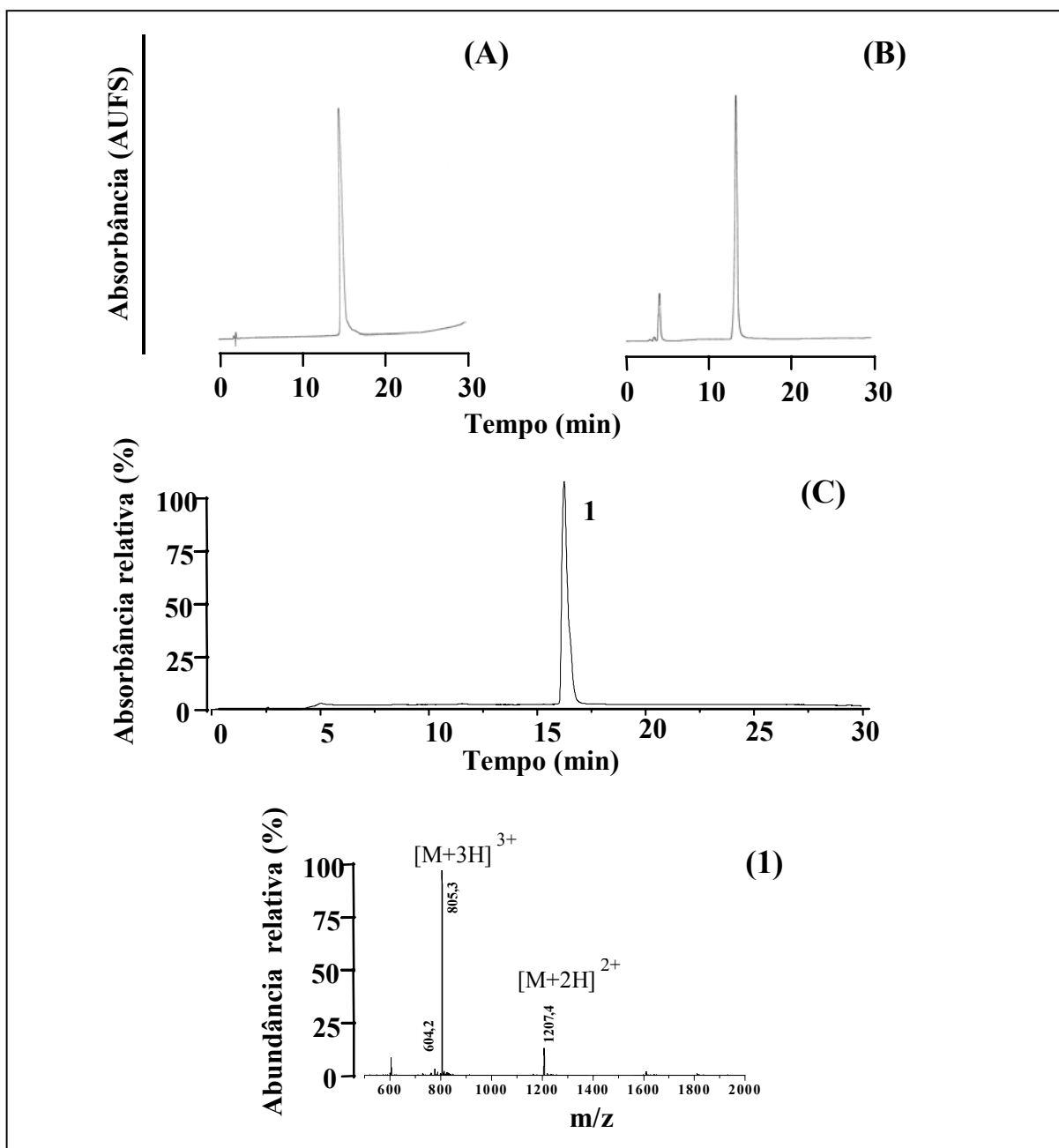
O rendimento total, de obtenção do peptídeo com pureza superior a 95% (**Figuras 14A e 14B**), foi de 0,6%. A composição de aminoácidos e a massa molar obtidas concordaram com os valores teóricos (**Tabela 5**).

**e) Peptídeo KTYFPHFDSLHGSAQVKGH-NH<sub>2</sub> (Hb40-58a)**

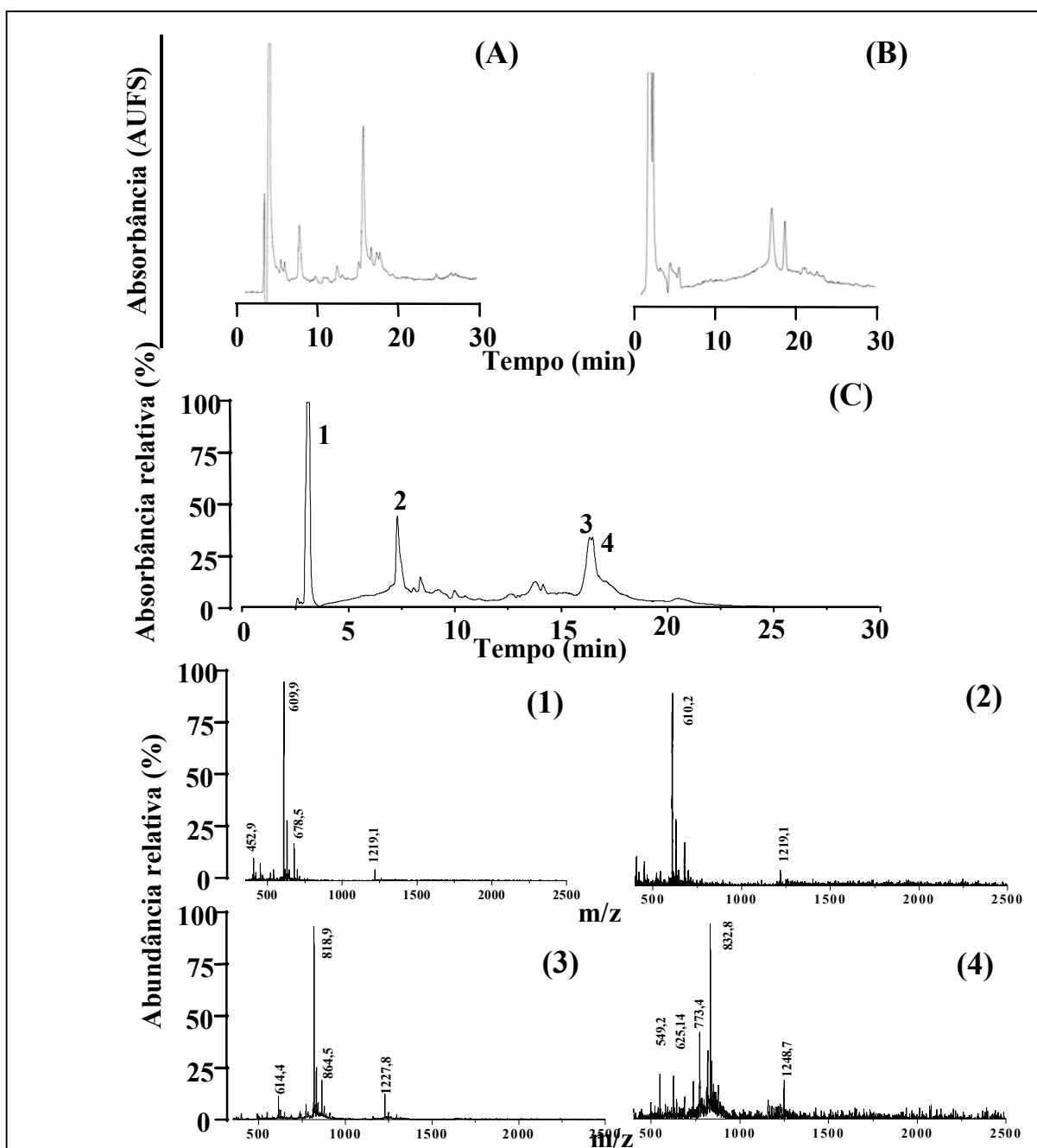
O rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total, que forneceu o peptídeo bruto, foi de 72%. Analisado nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 15A**) e TEAP (**Figura 15B**), este apresentou um pico majoritário que demonstrou ser o peptídeo desejado por LC-ESI/MS (pico 2 na **Figura 15C**). O componente correspondente



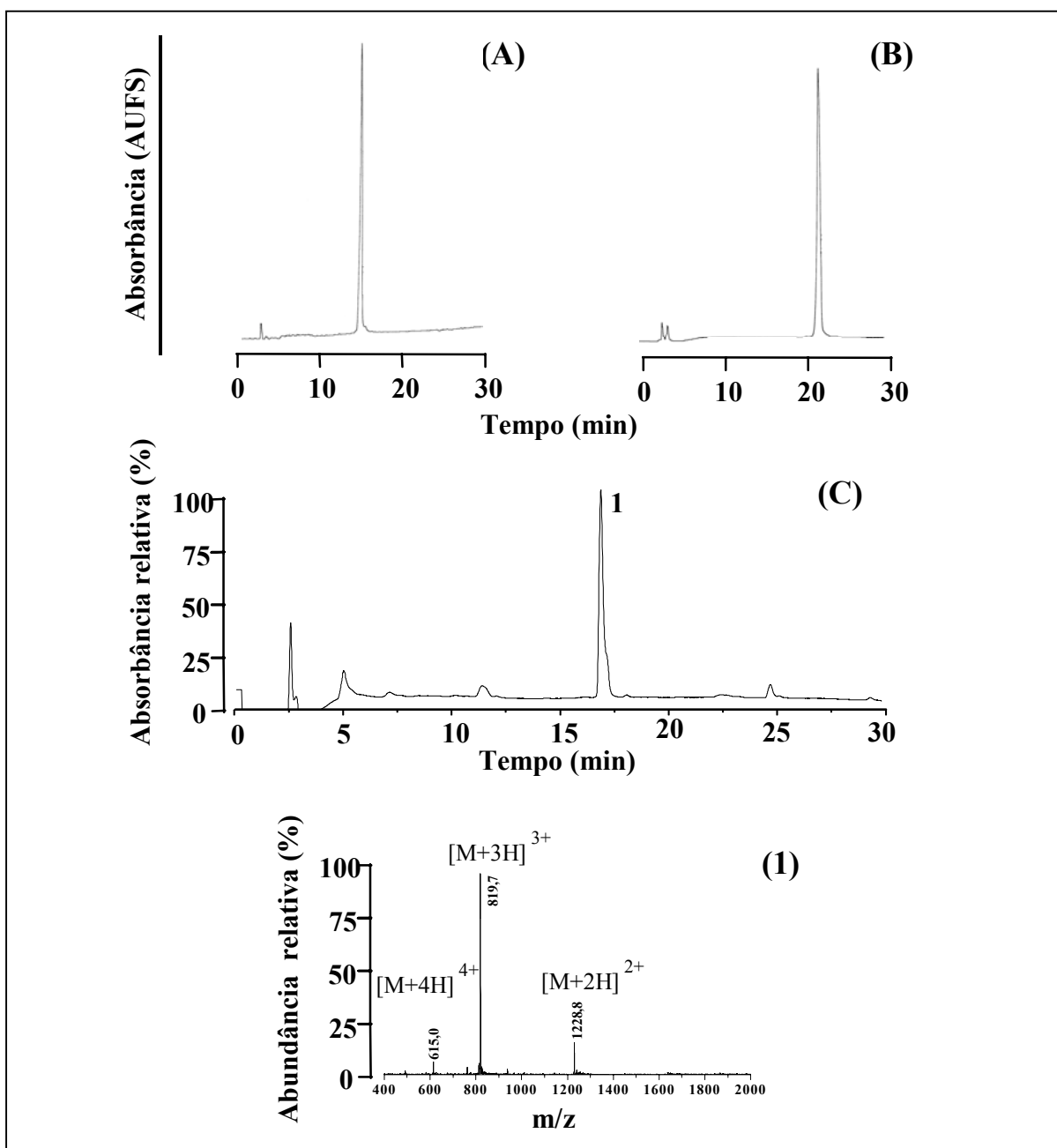
**Figura 11.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-61a bruto. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 28 a 58% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 12.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-61a purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 28 a 58% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.

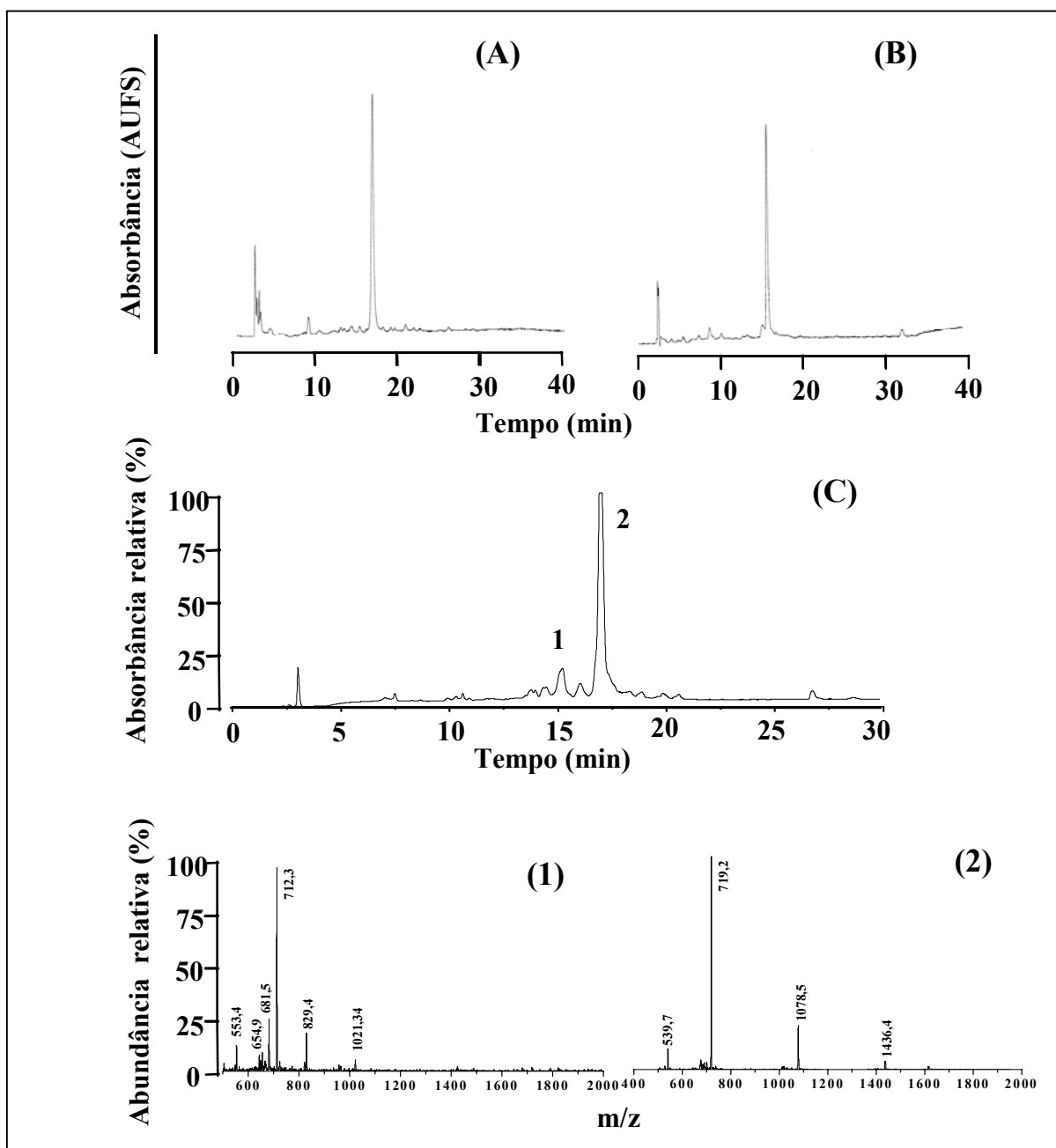


**Figura 13.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Ac-Hb40-61 bruto. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2), (3) e (4): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 14.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Ac-Hb40-61 purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 50 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.





**Figura 15.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-58a bruto (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2), (3) e (4): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 20 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.

ao pico 1 foi identificado como o subproduto da síntese Ac-FDLSHGSAQVKGH-NH<sub>2</sub> (Ac-Hb46-58a).

O rendimento total de obtenção do peptídeo com grau de pureza superior a 90% (**Figuras 16A e 16B**) foi de 1%. A **Figura 16C** mostra os resultados de sua análise por RP-HPLC e LC-ESI/MS. A massa molar e a composição molar de aminoácidos obtida permitiram confirmar a identidade do mesmo (**Tabela 5**).

**f) Peptídeo KTYFPHFDLSHGSAQVKAH-NH<sub>2</sub> ([Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a)**

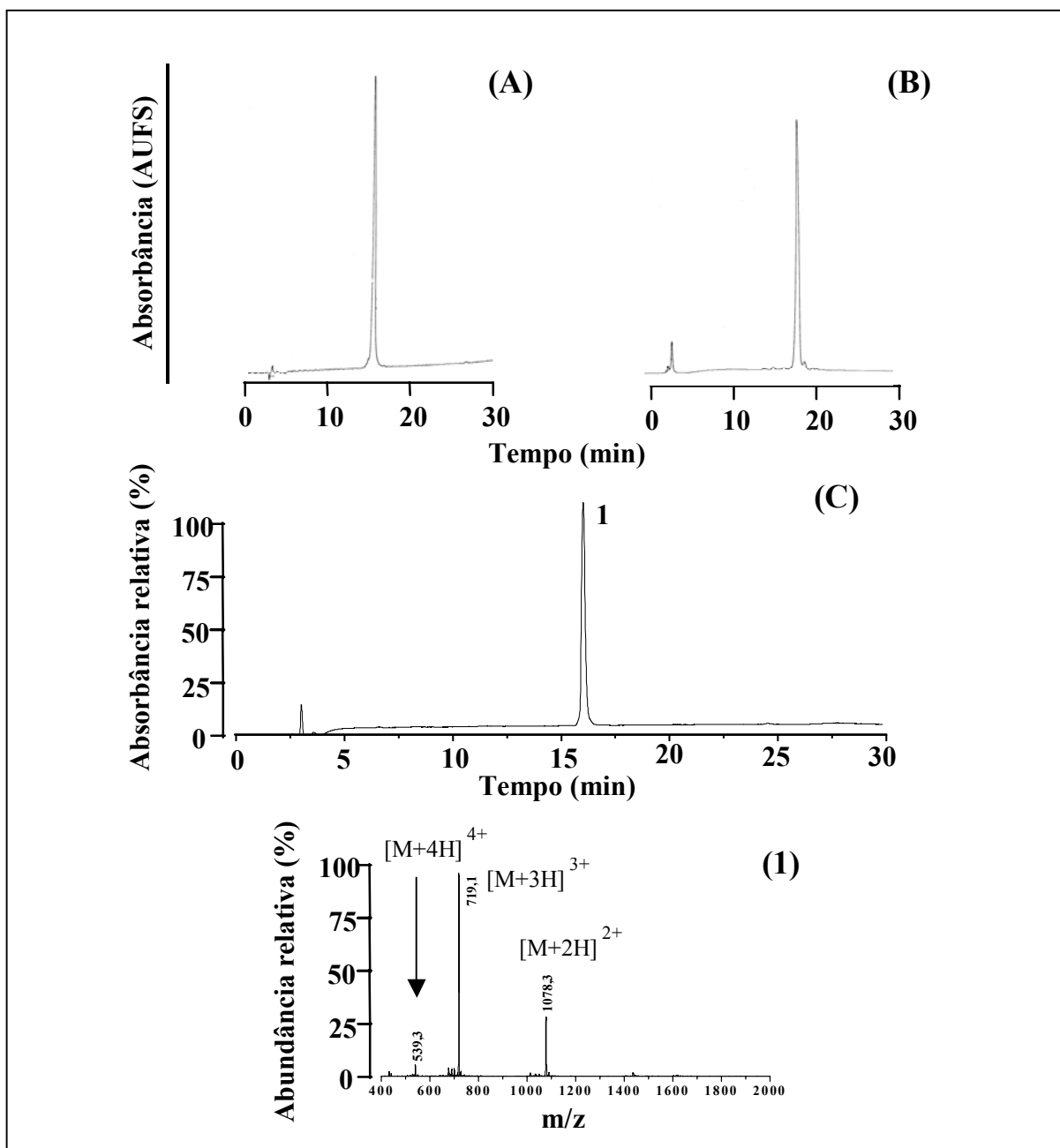
Neste caso, o rendimento de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total, que forneceu o peptídeo bruto, foi de 60%. As análises por RP-HPLC nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 17A**) e TEAP (**Figura 17B**) revelaram a presença de dois contaminantes, já que o peptídeo desejado foi identificado por LC-ESI/MS como correspondente ao pico 2 na **Figura 17C**.

O rendimento total de obtenção do peptídeo, com grau de pureza superior a 95% (**Figuras 18A e 18B**), foi de 4%. A composição de aminoácidos e a massa molar obtidas concordaram com as teóricas (**Tabela 5**).

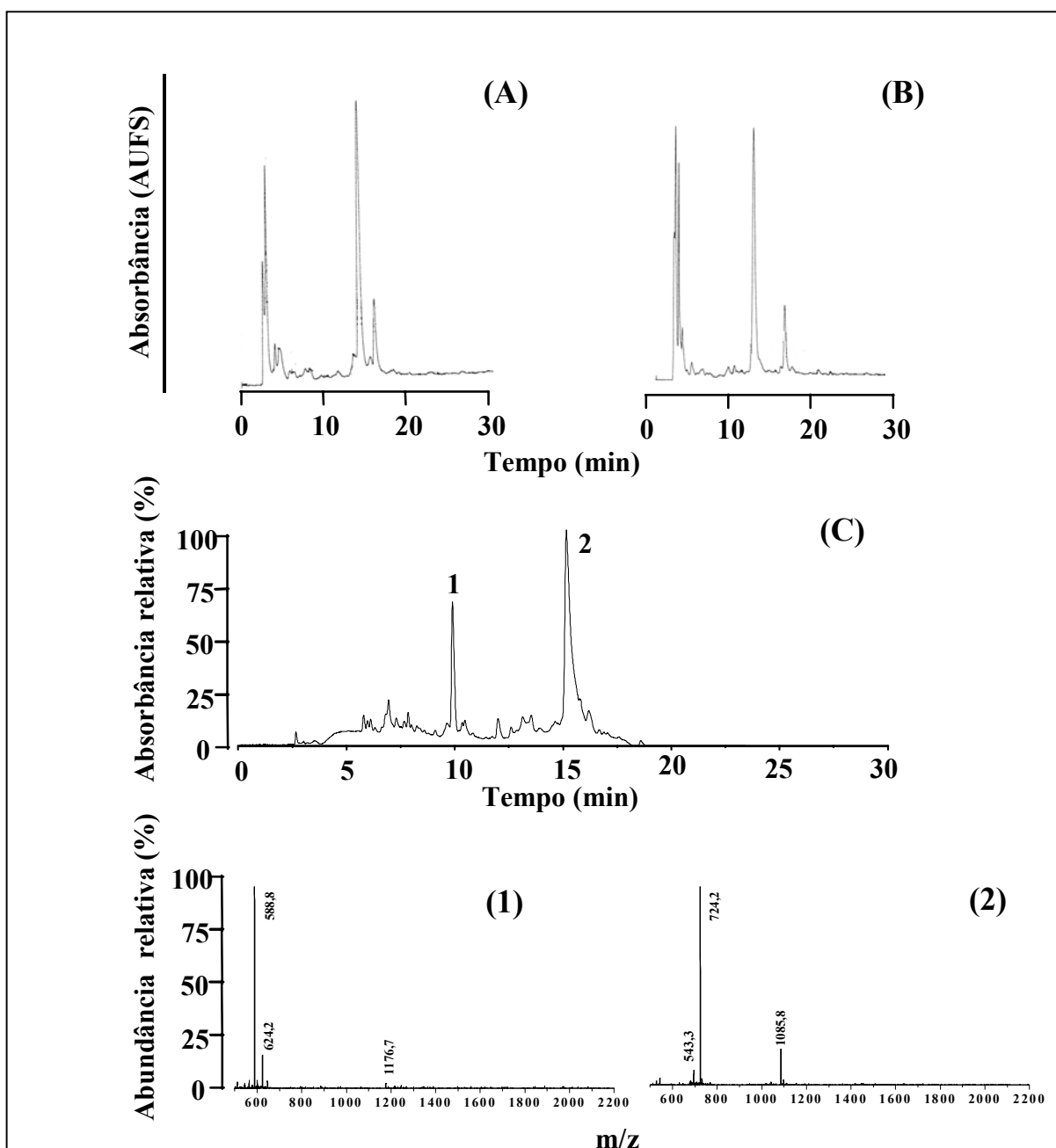
**g) Peptídeo KTYFPHFDLSHGSAQVK-NH<sub>2</sub> (Hb40-56a)**

O rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total para fornecer o peptídeo bruto foi de 54%. Quando foi analisado nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 19A**) e TEAP (**Figura 19B**), este apresentou um componente (pico 1) identificado por LC-ESI/MS como correspondente ao peptídeo desejado (**Figura 19C**).

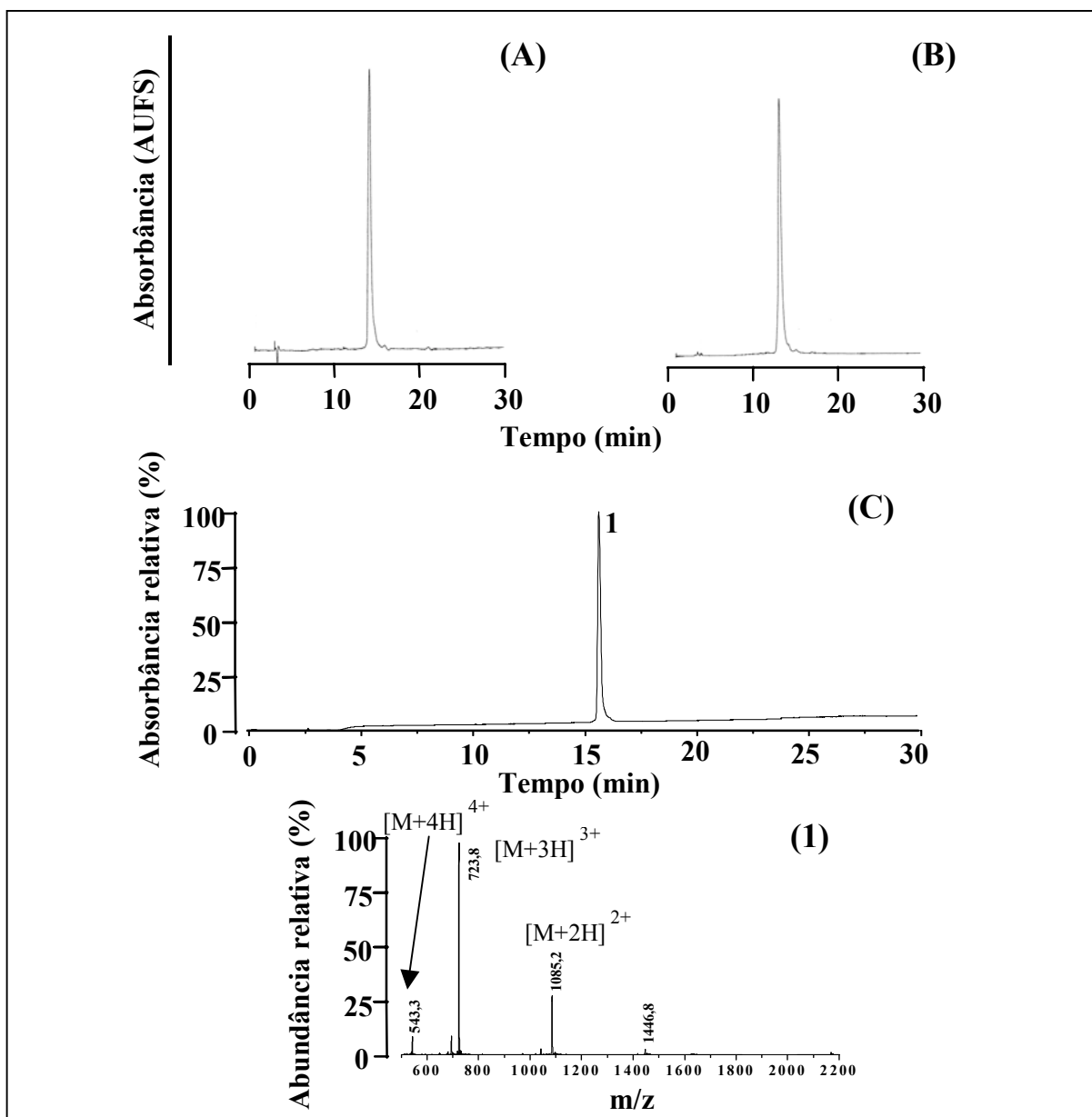
O rendimento total de obtenção do peptídeo Hb40-56a, com grau de pureza superior a 85% (**Figuras 20A e 20B**), foi de 16%. A massa molar e a composição de aminoácidos obtidas concordaram com os valores teóricos (**Tabela 5**). Os erros observados na análise de aminoácidos são toleráveis.



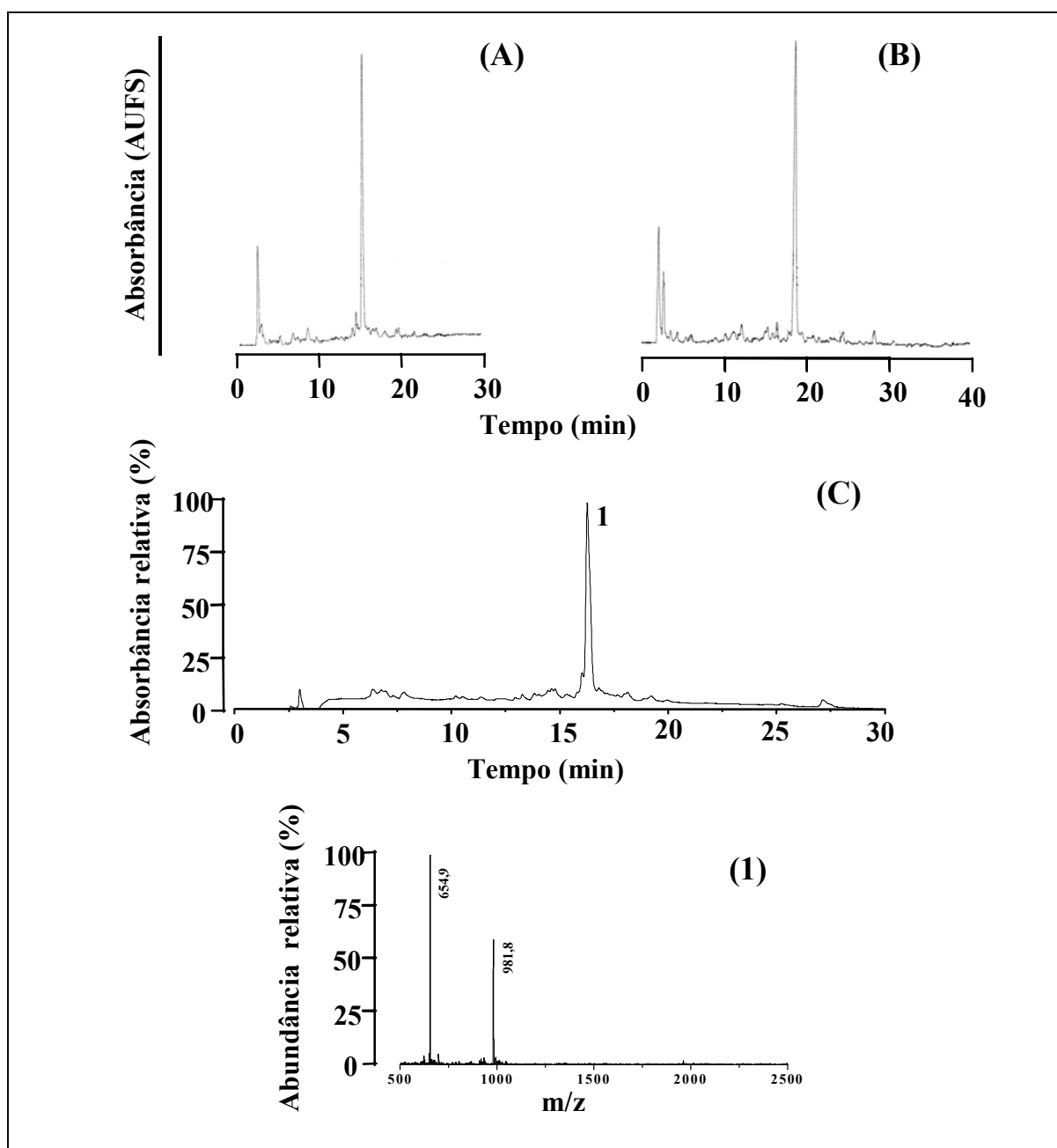
**Figura 16.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-58a purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 40%ACN/TEAP, λ: 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



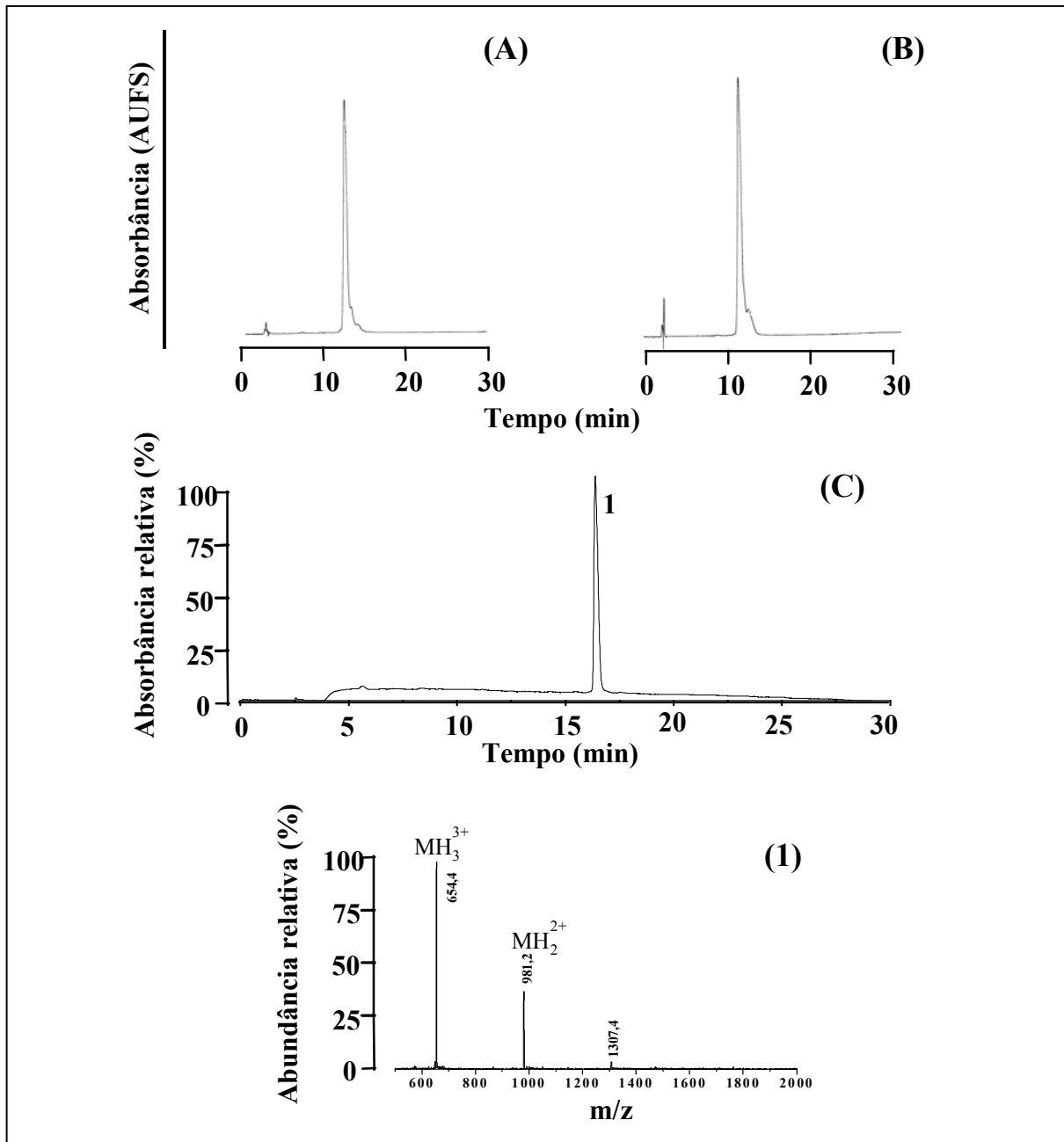
**Figura 17.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do  $[Ala^{57}]Hb_{40-58a}$  bruto (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1) e (2): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac  $C_{18}$ , solvente A: 0,1%TFA/ $H_2O$ , solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/ $H_2O$ ,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac  $C_{18}$ , solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 20 kV, modo de ionização  $ES^+$ .



**Figura 18.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do  $[Ala^{57}]Hb_{40-58a}$  purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac  $C_{18}$ , solvente A: 0,1%TFA/ $H_2O$ , solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/ $H_2O$ ,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac  $C_{18}$ , solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização  $ES^+$ .



**Figura 19.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-56a bruto (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2), (3) e (4): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 20.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb 40-56a purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 20 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.

#### **h) Peptídeo SFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK-NH<sub>2</sub> (Hb35-56a)**

Neste caso, a peptidil-resina Hb40-56-Rink amida foi alongada pela introdução de mais cinco resíduos. Como se pode observar, a qualidade do peptídeo bruto piorou muito, o que foi indicado pela presença de vários picos no perfil por RP-HPLC (**Figuras 21A e 21B**). Em uma nova tentativa, foram feitas modificações no protocolo de síntese, tais como a troca do reagente acoplador e a utilização de solventes contendo sais caotrópicos (THALER; SEEBACH, 1991). No entanto, estas alterações não levaram a um peptídeo bruto de melhor qualidade (dados não mostrados).

O rendimento de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total que levou ao peptídeo bruto foi de 42%. Os perfis por RP-HPLC do peptídeo bruto apresentaram diversos componentes (**Figuras 21A e 21B**), sendo que o peptídeo desejado foi identificado por LC-ESI/MS como correspondente ao componente majoritário 2 (**Figura 21C**). O componente correspondente ao pico 3 foi identificado como sendo um subproduto que contém um resíduo de Pro adicional; o componente 1 não pôde ser identificado.

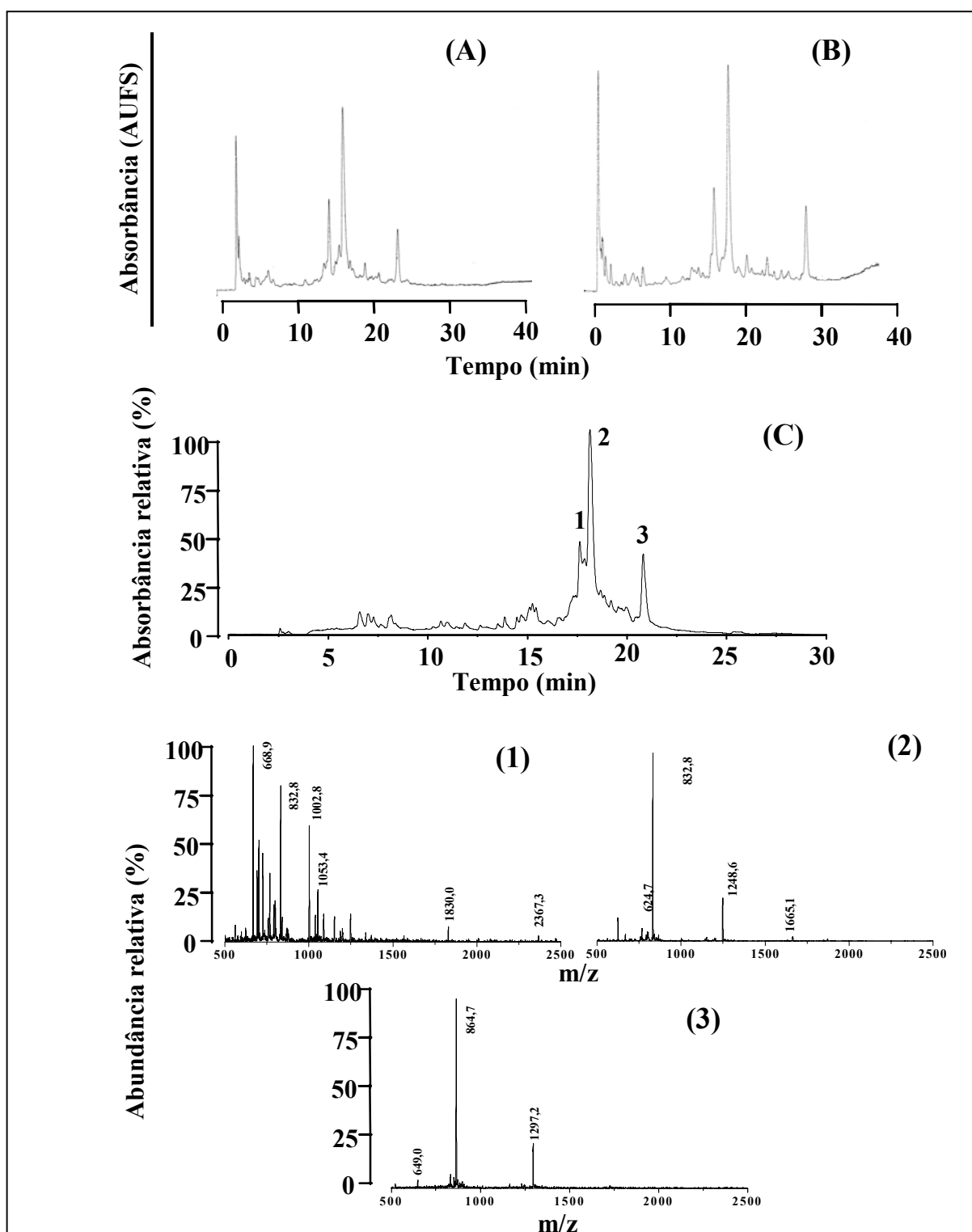
O rendimento total de obtenção do purificado, com grau de pureza superior a 95% (**Figuras 22A e 22B**), foi de 0,3%. Este foi caracterizado por LC-ESI/MS (**Figura 22C**) e análise de aminoácidos. Os resultados obtidos concordaram com os valores teóricos (os erros observados na análise de aminoácidos são toleráveis).

#### **i) Peptídeo KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVA (Hb40-63)**

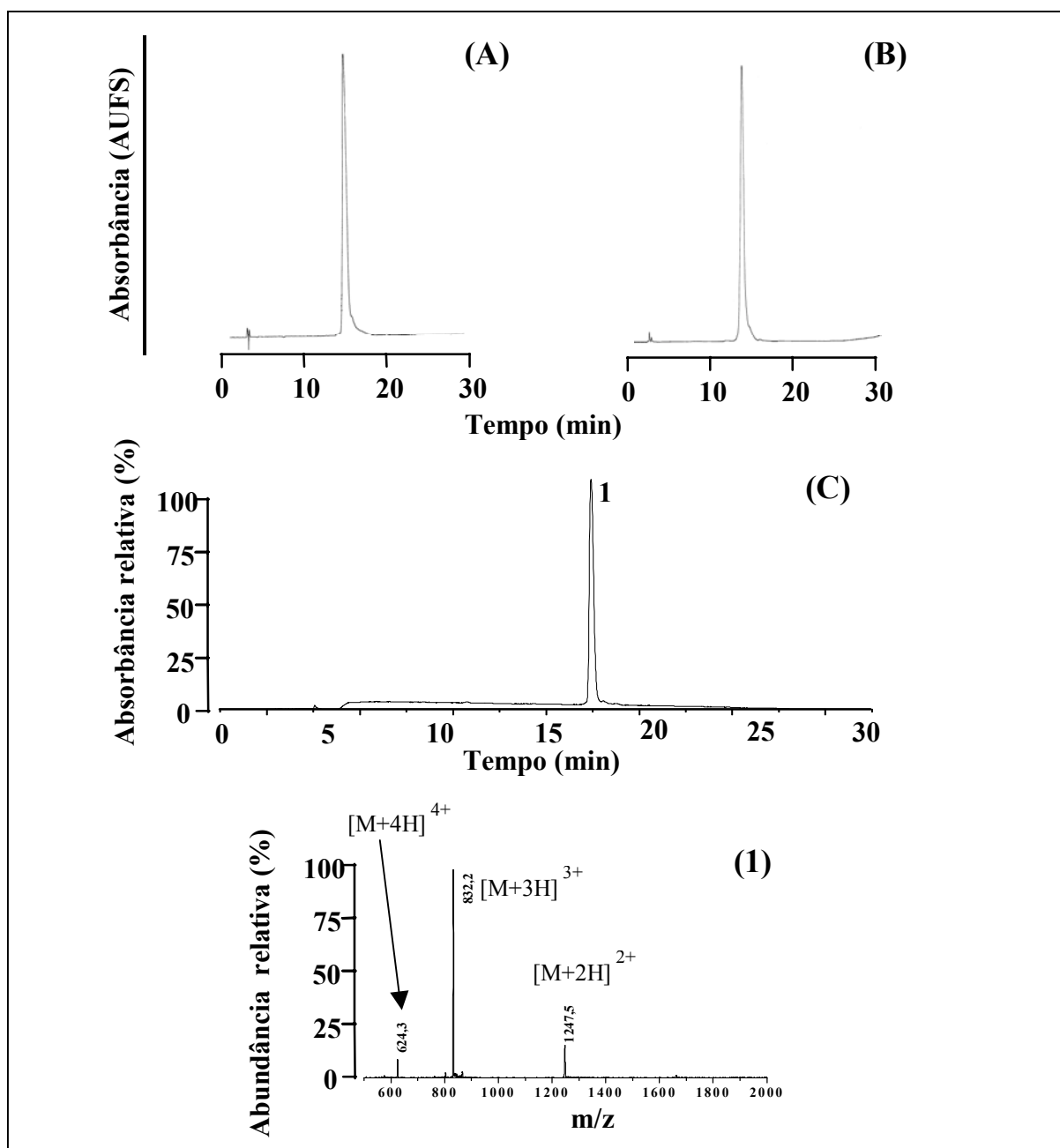
O rendimento da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total, que forneceu o peptídeo bruto, foi de 36%. O peptídeo bruto obtido, analisado nos sistemas de solventes contendo TFA (**Figura 23A**) e TEAP (**Figura 23B**), mostrou conter o peptídeo desejado identificado por LC-ESI/MS como correspondente ao pico 2 na **Figura 23C**. O componente correspondente ao pico 1 não foi identificado.

O rendimento total de obtenção do peptídeo purificado [grau de pureza superior a 95%

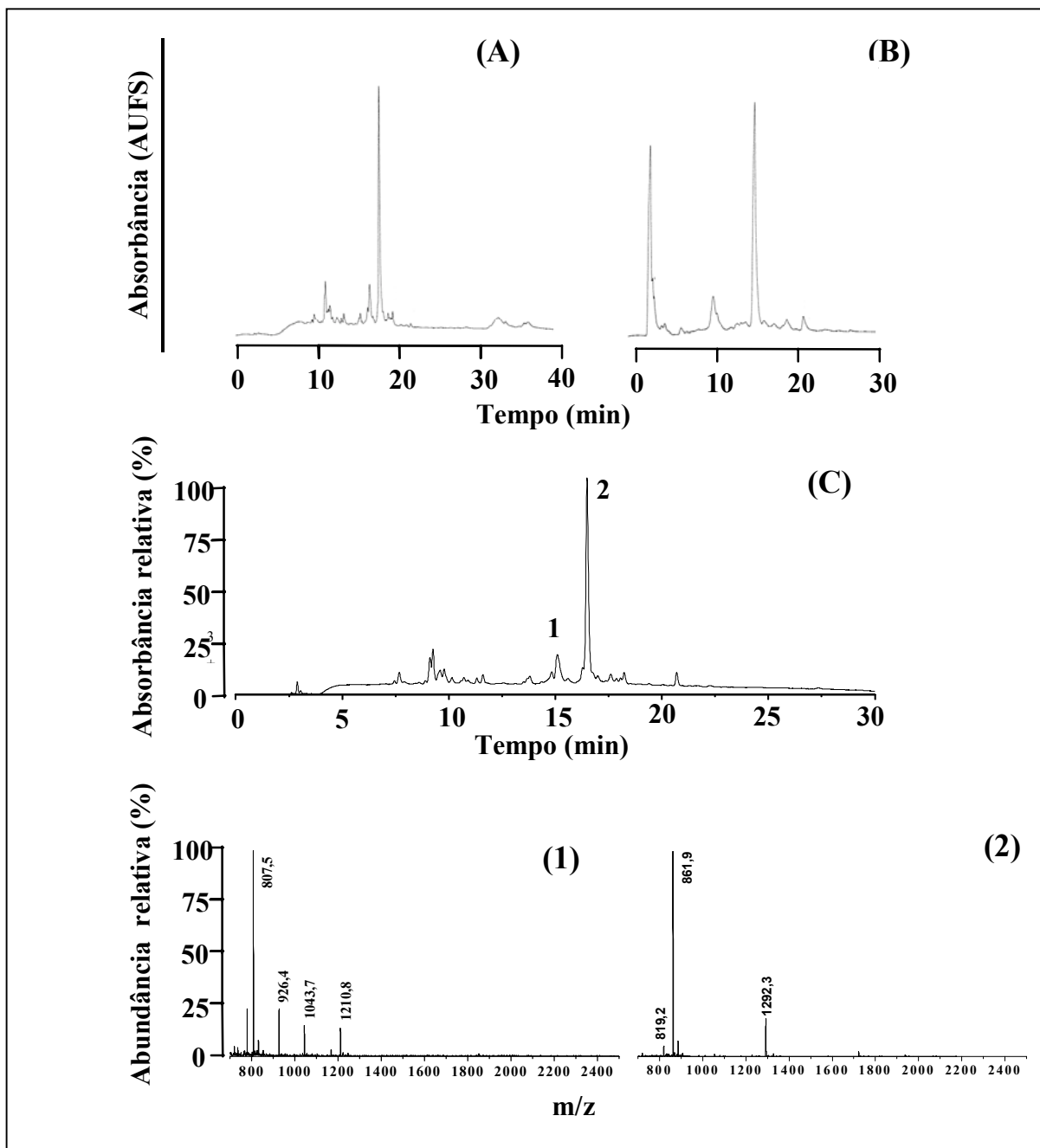




**Figura 21.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb35-56a bruto (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2), (3): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 32 a 62% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 20 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 22.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb35-56a purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 32 a 62% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 45%ACN/TEAP, λ: 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 20 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.



**Figura 23.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-63 bruto (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1), (2): espectros de massa dos componentes em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 60%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.

(Figuras 24A e 24B)] foi de 4%. A massa molar e a composição de aminoácidos obtidas confirmaram sua identidade (Tabela 5).

## 4.2 Bioensaios

### a) Atividade antifúngica

As MICs dos peptídeos antimicrobianos frente a *C. albicans* MDM8 estão descritas na

#### Tabela 6.

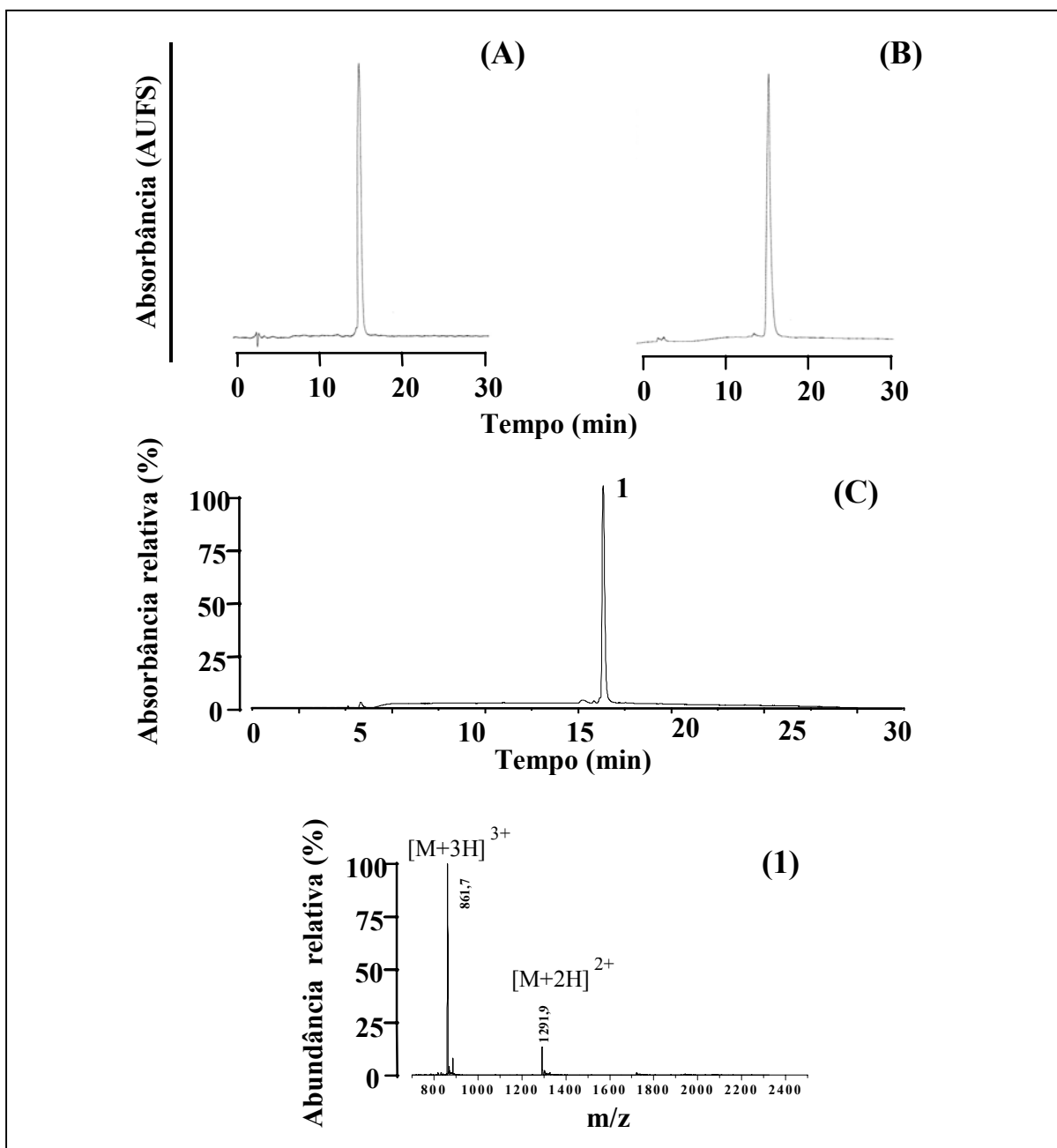
**Tabela 6. Nomes, seqüências e MICs frente a *C. albicans* MDM8 dos peptídeos estudados.**

Peptídeos	Seqüência	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
Hb33-61a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSA QVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	3,12-6,25
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	3,12-6,25
AcHb40-61a	Ac-KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	12,5-25,0
Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGH-NH <sub>2</sub>	6,25-12,50
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKAH-NH <sub>2</sub>	6,25-12,50
Hb40-56a	KTYFPHFDLSHGSAQVK-NH <sub>2</sub>	100-200
Hb35-56a	SFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK-NH <sub>2</sub>	>200
Hb40-63	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVA	3,12-6,25

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] é a menor que causou total inibição do crescimento. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de diluição em caldo segundo Fehlbau et al. (1994), em meio PDB sem adição de NaCl.

Como se pode observar, dentre os peptídeos estudados, o peptídeo Hb40-61a é o análogo que representa a porção mínima capaz de expressar a atividade antifúngica do Hb33-61a. De fato, a acetilação do grupo N-terminal levou a uma redução de 4 vezes da MIC; a retirada de três e cinco resíduos do C-terminal levou a análogos menos ativos: Hb40-58a (2 vezes) e Hb40-56a (32 vezes). A adição da porção Val<sup>62</sup>-Ala<sup>63</sup> no C-terminal substituiu o efeito da amidação. A troca da Gly<sup>57</sup> por Ala para dar o análogo [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a não causou alteração na MIC do Hb40-58a. A introdução da porção Ser<sup>35</sup>-Thr<sup>39</sup> no peptídeo Hb40-56a, levou ao Hb35-56a, que foi não ativo.

Com base nesses resultados, testes antifúngicos frente a outras cepas de *C. albicans*



**Figura 24.** Perfis de RP-HPLC e LC/ESI-MS do Hb40-63 purificado. (A), (B) e (C): perfis de RP-HPLC. (1): espectro de massa do componente em (C). Condições de RP-HPLC: (A) e (C): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: 0,1%TFA/H<sub>2</sub>O, solvente B: 60%ACN/0,09%TFA/H<sub>2</sub>O,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente linear: 30 a 60% de B em 30 min (A) e 5 a 95% de B em 30 min (C), (B): coluna Vydac C<sub>18</sub>, solvente A: TEAP, solvente B: 60%ACN/TEAP,  $\lambda$ : 210 nm, fluxo: 1,0mL/min, gradiente linear: 20 a 50% de B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização ES<sup>+</sup>.

foram realizados com o peptídeo Hb40-61a e este se mostrou ativo como mostrado na **Tabela 7**.

**Tabela 7. Atividade antifúngica do peptídeo Hb40-61a frente a outras cepas de *C. albicans*.**

Cepa	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
ATCC 90028	6,2-12,5
IAL 2151	6,2-12,5

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] é a menor que causou total inibição do crescimento. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de diluição em caldo segundo Fehlbaum et al. (1994), em meio PDB sem adição de NaCl.

Os testes preliminares frente a outras espécies do gênero *Candida*, feitos de acordo com a CLSI com algumas modificações usando a anfotericina B como controle e referência forneceram os resultados mostrados na **Tabela 8**.

**Tabela 8. Atividade antifúngica do peptídeo Hb40-61a e anfotericina B frente a espécies do gênero *Candida*.**

Microorganismo	MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}/\mu\text{M}$ )			
	Anfotericina B		Hb40-61a	
	Meio de Cultura		Meio de Cultura	
	YNB	PDB	YNB	PDB
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	>2,0 / >2,2	1,0-2,0 / 1,1-2,2	>482,6/ >200,0	241,3-482,6/ 100,0-200,0
<i>C. albicans</i> IAL2151	-	-	>482,6/ >200,0	60,3-120,6/ 25,0-50,0
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	-	-	-	>482,6/ >200,0
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	-	-	-	60,3-120,6/ 25,0-50,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	-	120,6-241,3/ 50,0-100,0

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] é a menor que causou total inibição do crescimento. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo segundo CLSI, com modificações, em meio PDB sem adição de sal ou em YNB (contém fosfato de magnésio monobásico 1,0 g/L, sulfato de magnésio 0,5 g/L, cloreto de sódio 0,1 g/L e cloreto de cálcio 0,1 g/L); (-): não determinado.

Como se observa, o peptídeo não se mostrou ativo frente às duas cepas de *C. albicans* testadas no meio YNB e à *C. glabrata* ATCC 90030 no meio PDB. Ele, porém, apresentou

baixa atividade no meio PDB frente a *C. albicans* ATCC 90028 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 no meio PDB, mas foi ativo frente à cepa com resistência a fluconazol e *C. krusei*. Estas atividades, entretanto, foram muito inferiores às da anfotericina B frente a *C. albicans* ATCC 90028 em meio PDB.

## b) Atividade antibacteriana

As MICs dos peptídeos estudados frente a *M. luteus* A270 estão descritos na **Tabela 9**.

**Tabela 9. Nomes, seqüências e MICs frente a *M. luteus* A270 dos peptídeos estudados.**

Peptídeos	Seqüência	MIC ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>
Hb33-61a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	1,6-3,1
Hb33-52a	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGS-NH <sub>2</sub>	>100,0
Hb40-61a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	6,2-12,5
Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKGH-NH <sub>2</sub>	25,0-50,0
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58a	KTYFPHFDLSHGSAQVKAH-NH <sub>2</sub>	25,0-50,0
Hb40-56a	KTYFPHFDLSHGSAQVK-NH <sub>2</sub>	>100,0
Hb48-61a	LSHGSAQVKGHGAK-NH <sub>2</sub>	50,0-100,0

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] é a menor que causou total inibição do crescimento. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo segundo Bulet et al. (1993), em meio PB com adição de 34,25 mM de NaCl.

Os análogos com redução do N-terminal Hb40-61a e Hb48-61a foram 4 e 32 vezes menos ativo do que o Hb33-61a, respectivamente. A redução maior da região C-terminal para dar o análogo Hb40-58a causou a redução de 16 vezes na atividade antibacteriana. O análogo Hb40-56a não foi ativo nas concentrações testadas. A troca da Gly-57 por uma Ala para dar o peptídeo [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a não causou a alteração da atividade do Hb40-58.

Em resumo, nestes casos o peptídeo Hb40-61a não se comportou como porção ativa mínima do Hb33-61a.

Testes preliminares do peptídeo Hb40-61a frente a outras bactérias Gram-positivas *S. epidermidis* e *B. megaterium* e a Gram-negativa *S. marcescens* foram feitos em meios contendo 86 mM de NaCl. Nas condições dos testes, ele não se mostrou ativo (**Tabela 10**).

**Tabela 10. Atividade antibacteriana do Hb40-61a frente a bactérias.**

<b>Espécie</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{M}</math>)<sup>a</sup></b>
<i>S. epidermidis</i>	>200,0
<i>B. megaterium</i>	>200,0
<i>S. marcescens</i>	>200,0

<sup>a</sup>: MIC: concentração inibitória mínima. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de diluição em caldo segundo Bulet et al. (1993), em meio PB com adição de 86 mM de NaCl.

**c) Efeito da força iônica do meio nas atividades dos peptídeos estudados frente a *C. albicans* e *M. luteus***

Os peptídeos testados não foram ativos quando os ensaios frente a *C. albicans* foram feitos em alta concentração de NaCl (Tabela 11).

**Tabela 11. Efeito da salinidade na atividade frente a *C. albicans* MDM8.**

<b>Peptídeo</b>	<b>MIC (<math>\mu\text{M}</math>)<sup>a</sup></b>
Hb35-56a	>200,0
Hb40-56a	>200,0
Hb40-58a	>200,0
[Ala <sup>57</sup> ]Hb40-58a	>200,0
Hb40-61a	>200,0
Ac-Hb40-61a	>200,0

<sup>a</sup>: MICs: Concentração inibitória mínima. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de diluição em caldo segundo Fehlbau et al. (1994), em meio PDB com adição de 137mM NaCl.

A Tabela 12 mostra o efeito da concentração de NaCl nas MICs do Hb40-61a frente a *C. albicans* MDM8 e *M. luteus* A270.

**Tabela 12. Efeito da concentração de NaCl nas MICs do peptídeo Hb40-61a frente a *C. albicans* MDM8 (A) e *M. luteus* A270 (B).**

<b>NaCl (mM)</b>	<b>A</b>	<b>B</b>
	<b>MIC (<math>\mu\text{M}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>MIC (<math>\mu\text{M}</math>)<sup>a</sup></b>
0,0	3,1-6,2	-
34,2	25,0-50,0	6,2-12,5
68,5	≈200,0	25,0-50,0
137,0	>200,0	>200,0

<sup>a</sup>: MICs foram expressos como o intervalo de concentrações [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada na qual o microorganismo cresceu e [b] é a menor que causou total inibição do crescimento. A atividade antifúngica foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo segundo Fehlbau et al., 1994, em meio PB. A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo segundo Bulet et al. (1993), em meio PDB.



Como se pode observar, a concentração de sal afeta negativamente as atividades antifúngicas e antibacterianas, que se extinguem em condições tidas como próximas à dita fisiológica (120-150 mM NaCl). Entretanto, quando o ensaio frente a *M. luteus* foi realizado sem adição de NaCl, os resultados não foram reprodutíveis.

#### d) Efeito da associação de dois agentes antimicrobianos no crescimento celular

Como mostra a **Tabela 13**, com a combinação com o fluconazol, as MICs foram reduzidas em 2 vezes. A consideração dos critérios discutidos na mesma tabela permitiu concluir que não ocorreu interação entre eles, já que o índice FIC (FICI) foi de 1,0.

**Tabela 13. Possibilidade de interação entre Hb40-61a e fluconazol frente a *C. albicans* ATCC 90028 investigada pelo método do “chequerboard” (WEI e BOBEK, 2004).**

Agente Antimicrobiano	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		FIC <sup>b</sup>	FICI <sup>c</sup>
	Sozinho	Combinação		
Hb40-61a	30,2	15,1	0,5	
Fluconazol	1	0,5	0,5	1,0

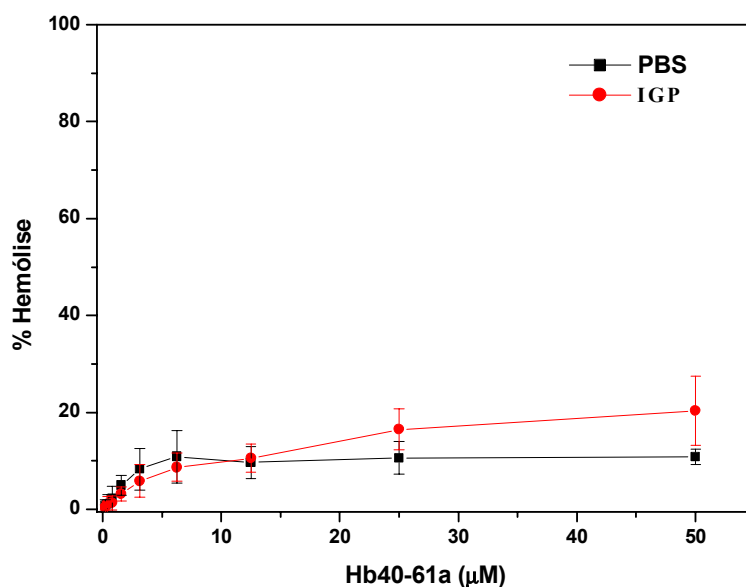
<sup>a</sup>: MICs: Concentração inibitória mínima.; <sup>b</sup>FIC (concentração inibitória fracionária): razão do MIC do agente utilizado em combinação pelo MIC do agente utilizado sozinho; <sup>c</sup>FICI (índice FIC): soma do FIC de cada agente; os dados foram analisados segundo o critério estabelecido por Odds (2003):  $\text{FICI} \leq 0,5$ : sinergismo;  $0,5 < \text{FICI} < 4,0$ : sem interação e  $\text{FICI} > 4,0$ : antagonismo.

#### e) Ensaio de hemólise com o Hb40-61a

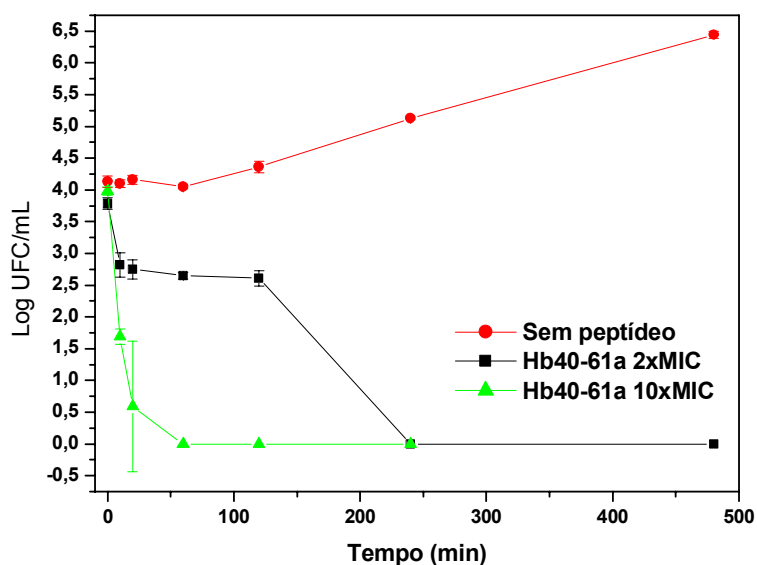
Como descrito no **item 3.4**, o ensaio foi realizado em dois tampões: PBS, de alta força iônica e o IGP, de baixa força iônica. Os resultados obtidos se encontram na **Figura 25**. Neste caso, observa-se que, em ambos os casos, a atividade hemolítica foi baixa.

#### f) Cinética de morte celular causada pelo Hb40-61a

Os resultados obtidos em concentrações 2 e 10 vezes superior a MIC do peptídeo (25,0 e 62,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente) estão na **Figura 26**. Eles indicaram que o peptídeo é de ação rápida, pois nas concentrações 2 x MIC e 10 x MIC já não havia mais células viáveis com 4 h e 1 h de incubação, respectivamente.



**Figura 25.** Atividade do Hb40-61a sobre eritrócitos humanos. Resultados de dois ensaios realizados em triplicata. PBS: tampão fosfato de sódio. IGP: tampão fosfato isotônico.



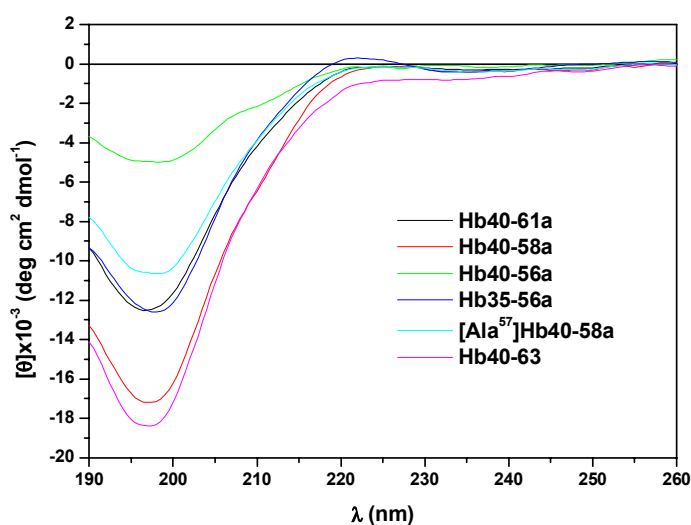
**Figura 26.** Cinética de morte de *C. albicans* MDM8 na presença do Hb40-61a.

### 4.3 Estudos preliminares por dicroísmo circular

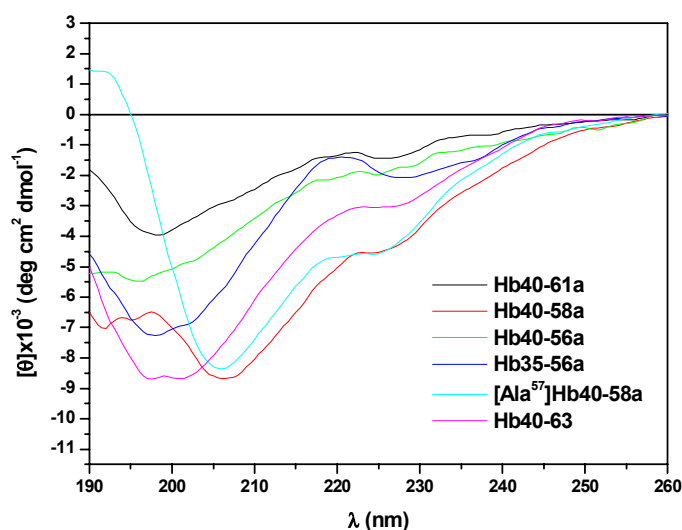
Em solução aquosa, todos os peptídeos apresentaram espectros típicos de estrutura randômica [presença de banda negativa em 197nm (**Figura 27**)].

Nos espectros obtidos na presença de 200 mM de SDS, observou-se: 1) um deslocamento da banda em 197 nm para a região do vermelho; 2) a banda na região de 220

nm que apresenta valores negativos em relação ao espectro em água, o que sugere uma aquisição de estrutura secundária (**Figura 28**). Além disso, os espectros dos análogos com encurtamento do C-terminal (Hb40-58a e Hb40-56a) diferiram daquele do Hb40-61a. O análogo com substituição da Gly<sup>57</sup> por Ala parece ter se estruturado em  $\alpha$ -hélice, no entanto, o seu espectro apresenta bandas (205 e 220 nm) bastante semelhantes às presentes naquele do Hb40-58a.



**Figura 27.** Espectros de CD do Hb40-61a (20 $\mu$ M), Hb35-56a (20 $\mu$ M), Hb40-56a (20 $\mu$ M), [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a (8 $\mu$ M) e Hb40-63 (12 $\mu$ M) em água, pH 4,0 a 20°C.



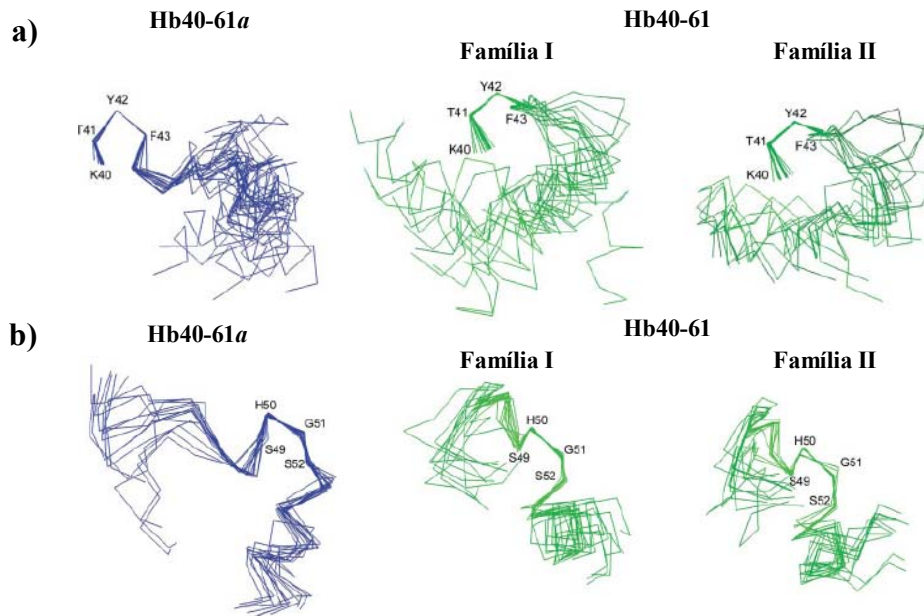
**Figura 28.** Espectros de CD do Hb40-61a (20 $\mu$ M), Hb35-56a (20 $\mu$ M), Hb40-56a (20 $\mu$ M), [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a (20 $\mu$ M) e Hb40-63 (20 $\mu$ M) em 200mM de SDS, pH 4,0 a 20°C.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Desenho dos peptídeos estudados

A escolha dos peptídeos estudados neste trabalho levou em consideração os dados de Machado et al. (2003), Sforça et al. (2005) e Machado et al. (2007) obtidos no estudo da relação estrutura-atividade antifúngica do peptídeo Hb33-61, os quais demonstraram que: 1) em geral, a amidação da porção C-terminal levou a análogos mais ativos frente a *C. albicans* (**Tabela 1** do **item 1.2**); 2) os peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a, na presença de micelas de SDS, apresentam estruturas muito similares – presença de uma dobra na porção N-terminal (Lys<sup>40</sup>-Phe<sup>43</sup>), uma alça flexível espacialmente organizada na porção Pro<sup>44</sup>-Leu<sup>48</sup> e uma outra dobra na porção C-terminal (Ser<sup>49</sup>-Ser<sup>52</sup>) seguida por uma  $\alpha$ -hélice (Ala<sup>53</sup>-Ala<sup>60</sup>), **Figura 3** do **item 1.2**; 3) a  $\alpha$ -hélice C-terminal é essencial, mas não suficiente, para a expressão da atividade antifúngica do Hb33-61a e Hb40-61a (**Tabela 1** do **item 1.2**); 4) na presença de micelas de SDS, há uma única família de estruturas para o peptídeo Hb40-61a, pois o hidrogênio do grupo amida terminal (Lys<sup>61</sup>) no Hb40-61a participa de uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio do resíduo de Gly<sup>57</sup>, restringindo a liberdade conformacional desta porção, o que não ocorre para o análogo Hb40-61 que apresenta duas famílias de estruturas; uma delas (família I) se assemelha a do Hb40-61a (**Figura 29**); 5) o peptídeo Hb40-61a apresentou a mesma MIC, igual capacidade de permeabilização da membrana plasmática de *C. albicans* e hemólise que o Hb33-61a, sugerindo que ele fosse a porção ativa deste último.

Os análogos Hb40-58a e Hb40-56a (**Tabela 6** do **item 4.2a**) correspondem a análogos do Hb40-61a com encurtamento da  $\alpha$ -hélice C-terminal em 3 e 5 resíduos, respectivamente, e permanência de pelo menos 4 resíduos participantes da  $\alpha$ -hélice. O análogo com a troca da



**Figura 29.** Sobreposição das porções Lys<sup>40</sup>-Phe<sup>43</sup> (a) e de Ser<sup>49</sup>-Ser<sup>52</sup> (b) do Hb40-61a e das famílias I e II de estruturas do Hb40-61 obtidos por RMN. Extraído de Machado et al. (2007).

Gly<sup>57</sup> por Ala, [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a, foi concebido visando estabilizar a porção correspondente à  $\alpha$ -hélice terminal deletada, já que a Ala tem sido descrita capaz de estabilizar esse tipo de estrutura secundária (PACE; SCHOLTZ, 1998; SCOTT et al., 2007). O análogo amidado do fragmento 33-56 da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina humana (Hb35-56a) foi desenhado com base no trabalho de Mak et al. (2004), os quais descreveram ter encontrado o Hb35-56 em sangue menstrual humano (MIC>300mM frente a *C. albicans*). Além disso, esse análogo ia de encontro com os nossos objetivos, pois ele corresponde ao Hb33-52a (Tabela 1 do item 1.2) estudado por Machado et al. (2007) alongado no C-terminal ou ao Hb40-56a alongado no N-terminal.

O fragmento Hb33-63 também pode estar presente no conteúdo intestinal do carrapato, pois ensaios de substratos fluorogênicos com proteases purificadas do conteúdo intestinal ou de um homogenato de células digestivas do carrapato de boi *B. microplus* (realizados pelo grupo de pesquisa colaborador do ICB; projeto de Doutorado de C. E. CRUZ) apontam

um sítio de clivagem da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina bovina entre os resíduos Ala<sup>63</sup>-Ala<sup>64</sup>. Assim sendo, o análogo Hb40-63 também foi incluído neste trabalho e corresponde ao análogo Hb40-61 alongado em dois resíduos de aminoácidos na porção correspondente à  $\alpha$ -hélice.

Como também era interesse investigar a relação estrutura-atividade do peptídeo Hb33-61a frente a *M. luteus*, todos os análogos descritos acima foram testados. Nestes testes também foram incluídos os seguintes análogos previamente estudados: a) o Hb33-52a, análogo que contém as porções envolvidas nas dobras (Lys<sup>40</sup>-Phe<sup>43</sup> e Ser<sup>49</sup>-Ser<sup>52</sup>) e alça flexível (Pro<sup>44</sup>-Leu<sup>48</sup>) do Hb33-61a; b) o Hb48-61a, análogo que contém a porção correspondente a  $\alpha$ -hélice (Ala<sup>53</sup>-Ala<sup>60</sup>) do Hb33-61a; c) os Ac-Hb40-61a e Ac-Hb40-61, que permitiram examinar o parâmetro carga líquida dos Hb40-61a e Hb40-61.

## 5.2 Síntese, purificação e caracterização dos peptídeos estudados

Os peptídeos Ac-Hb40-61a e Ac-Hb40-61 foram sintetizados manualmente pela estratégia *t*-Boc e os demais pela estratégia Fmoc. A troca de estratégia *t*-Boc pela Fmoc foi feita para: 1) tentar superar os problemas nas sínteses que empregaram a primeira (MACHADO et al., 2007); 2) evitar o emprego do HF, substância de alta toxicidade e grande poder corrosivo (LLYOD-WILLAMS et al., 1997). Os resultados obtidos mostraram que as duas estratégias de síntese se mostraram igualmente aplicáveis para esta finalidade, já que os peptídeos desejados foram os compostos majoritários nos perfis de RP-HPLC para a maioria dos peptídeos brutos obtidos (**Figuras 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 e 23 do item 4.1**). Por outro lado, a estratégia Fmoc se mostrou superior em relação a *t*-Boc, pois como pode ser observado nos perfis por RP-HPLC dos peptídeos brutos do Hb40-61a e Ac-Hb40-61a (**Figuras 9A, 9B, 11A e 11B**), esta forneceu produtos de melhor qualidade. Este dado concorda com outros relativos a peptídeos sintéticos obtidos pelas duas estratégias, como por exemplo, antagonistas da neurocinina A e análogos de colecistocinina que mostraram que a estratégia Fmoc foi superior à *t*-Boc (ROVERO et al., 1991; MIRANDA et al., 1993a; MIRANDA et al., 1993b).

A purificação por RP-HPLC permitiu obter peptídeos finais de alto grau de pureza, suficientes para a realização dos ensaios biológicos e análises por CD. Entretanto, os rendimentos finais foram baixos, o que não é surpreendente para peptídeos contendo mais de 15 resíduos de aminoácidos obtidos pela SPFS. De fato, a seqüência e o tamanho determinam a qualidade do peptídeo a ser purificado; é muito comum o componente majoritário não ser o peptídeo desejado (BRAY, 2003).

### 5.3 Ensaios biológicos

Há diversos relatos de fragmentos da hemoglobina, que foram isolados de tecidos de animais, com funções distintas da molécula original. Dentre as funções relatadas estão as de: liberação de hormônios (SCHALLY et al., 1971, SCHALLY et al., 1978, CHANG et al., 1980), analgesia (TAKAGI et al., 1979, FUKUI et al., 1983), constrição coronária (BARKHUDARYAN et al., 1992, GALOYAN, 1998), produção de células sangüíneas (IVANOV et al., 1992) e de inibição da enzima conversora de angiotensina (LANTZ et al., 1991). A atividade antimicrobiana de um fragmento de hemoglobina foi descrita pela primeira vez em 1999 (FOGAÇA et al., 1999) e posteriormente, por outros grupos (NAKAJIMA et al., 2003; MAK et al., 2004; SONENSHINE, 2005, NEDJAR-ARROUME et al., 2006).

Por outro lado, a digestão *in vitro* da hemoglobina produz peptídeos que apresentam atividade opióide-like (BRANDTL et al., 1986), que potencializam a ação da bradicinina (PIOT et al., 1992) ou que têm atividade antimicrobiana (MAK et al., 2000). Estes últimos autores relataram que as proteínas hemoglobina, citocromo C e mioglobina não apresentavam atividade bactericida e fungicida, mas se desprovidas do grupo heme e parcialmente desnaturadas, as suas cadeias polipeptídicas passavam a exibir atividade frente a microorganismos em concentrações bastante baixas ( $\mu\text{M}$ ). A informação que a hemoglobina nativa não é ativa *per se* concorda com ensaios realizados por nós (FOGAÇA et al., 1999); entretanto, outros grupos descreveram que a hemoglobina intacta apresenta atividade

antimicrobiana (HOBSON; HIRSCH, 1958, PARISH et al., 2001). Essas diferenças poderiam ser atribuídas ao uso de diferentes protocolos empregados nos diferentes laboratórios (a manipulação poderia levar à desnaturação ou perda do grupo heme).

O nome “hemocidinas” (*HEMOglobin microbiCIDAL peptides*) foi sugerido para os fragmentos derivados de proteínas que contêm heme que apresentam atividade antimicrobiana (MAK et al., 2000). Os fragmentos até agora descritos derivados de hemoglobina estão listados na **Tabela 14**. Além disso, há duas patentes depositadas na PCT (*Patent Cooperation Treaty*) de fragmentos de hemoglobina de répteis (WO99/17785) e mamíferos (WO99/17786) com atividade antimicrobiana.

**Tabela 14. Seqüências e modos de obtenção dos fragmentos derivados da hemoglobina com atividade antimicrobiana**

Peptídeo	Fragmento	Obtenção	Referência
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	$\alpha$ (33-61) bovina	Conteúdo intestinal do carrapato de boi <i>B. microplus</i>	Fogaça et al., 1999
VLSPADKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERM	$\alpha$ (1-32) humana		
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNA-VAHVDDM	$\alpha$ (33-76) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	
PNALSALS DLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHL-PAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	$\alpha$ (77-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLVVYP-WTQRFLESEFGDLSTPDAVM	$\beta$ (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLNFKGTFATLSEL-HCDKLVDPENFRLLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQ-AAAYQKVVAGVANALAHKYH	$\beta$ (56-146) humana		
VLSPADKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALER	$\alpha$ (1-31) humana		
MFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALT-NAVAHVDDMPNALSALS DLHAHKLR	$\alpha$ (32-92) humana	Digestão por Arg-C	Mak et al., 2000
VDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	$\alpha$ (93-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGR	$\beta$ (1-30) humana		



Peptídeo	Fragmento	Obtenção	Referência
LLVVYPWTQR	$\beta$ (31-40) humana	Digestão por Arg-C	Mak et al., 2000
FFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLA- HLDNLKGTFFATLSELHCDKLVDPENFR	$\beta$ (41-104) humana		
LLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQAAAYQKV VAGVANALAHKYH	$\beta$ (105-146) humana		
VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	$\alpha$ (1-23) bovina	Digestão por pepsina	Froidevaux et al., 2001
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTN- AVAHVDDM	$\alpha$ (33-76) humana	Clivagem por brometo de cianogênio	Parish et al., 2001
VLSPADKTNVKAAWGKVG AHAGEYGAEALERMFLSF- PTTKTYF-PHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNAVA- HVDDMR	$\alpha$ (1-76) humana		
PNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHL- AEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTISKYR	$\alpha$ (77-141) humana		
VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDVEVGG EALGRLLVVYP- WTQRFFESFGDLSTPDAVM	$\beta$ (1-55) humana		
GNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL DNLKGTFFATLSEL- HCDKLVDPENFRLLGNVLVCVLAHHFGKEFTPPVQ- AAAYQKV-VAGVANALAHKYH	$\beta$ (56-146) humana		
VLSPADKTNIK	$\alpha$ (1-11) coelho	Conteúdo intestinal do carrapato de coelho	Nakajima et al., 2003
SPADKTNIKTAW EKIGS	$\alpha$ (3-19) coelho	<i>Ornithodoros moubata</i>	
VCVLAHHFGKEFTPPVQAAAYQKV VAGVANALAHKYH	$\beta$ (111-146) humana	Placenta humana	Liepke et al., 2003
WQKMVTAVASALSSRYH	$\gamma$ (130-146) humana		
SFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK	$\alpha$ (35-56) humana	Sangue menstrual humano	Mak et al., 2004
AHHFGKEFTPPVQAAAYQKV-VAGVANALAHKYH	$\beta$ (115-146) humana		
VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	$\alpha$ (107-136) bovina	Digestão por pepsina	Daoud et al., 2005

Peptídeo	Fragmento	Obtenção	Referência
VTLASHLPSDFTPAVHASLKDKFLANVSTVLTSKYR	$\alpha$ (107-141) bovina	Digestão por pepsina	Nedjar- Arroume et al., 2006
STVLTSKYR	$\alpha$ (133-141) bovina		
TSKYR	$\alpha$ (137-141) bovina		
QADFQKVVAGVANALAHRYH	$\beta$ (126-145) bovina		

Neste trabalho, demos continuidade ao estudo da relação estrutura-atividade de uma hemocidina sintética, o Hb33-61a, frente a *C. albicans* que foram iniciados por Machado et al. (2007). Uma vez sintetizados, purificados e caracterizados quimicamente os novos análogos truncados sintéticos, passamos a testá-los. A *C. albicans* foi novamente escolhida por nós pela sua importância na área da saúde.

Os resultados dos bioensaios (realizados em colaboração com a Profa. Dra. Sirlei Daffre do Departamento de Parasitologia do ICB-USP e com a Profa. Dra. Elsa M. Mamizuka do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP e o Dr. Nilton Lincopan do IQ-USP) descritos nos **itens 4.2** permitiram concluir que, para a ação antifúngica, o peptídeo Hb40-61a é a porção mínima do Hb33-61a. A menor atividade dos análogos Hb40-58a e Hb40-56a pode ser devida à desestruturação da porção Ala<sup>53</sup>-Ala<sup>58</sup>, que nos peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a está envolvida na formação da  $\alpha$ -hélice C-terminal; ela ressalta a importância da porção correspondente à  $\alpha$ -hélice para a atividade. Pelos dados de CD, o [Ala<sup>57</sup>]Hb40-58a pareceu ter se estruturado em  $\alpha$ -hélice, entretanto, a diferença de interação desse análogo com SDS em relação àquela do peptídeo Hb40-61a poderia explicar a diferença de atividades entre eles. Além das mudanças conformacionais apontadas, os novos análogos apresentam em pH 5,1 (no qual foi realizado o ensaio frente à levedura) cargas líquidas

inferiores às dos análogos mais ativos (+6). Incluído entre eles está o Ac-Hb40-61a, 4 vezes menos ativo do que o Hb40-61a.

O *M. luteus* é uma espécie comumente utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos que nos últimos anos foi reconhecido como um agente causador de meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunodeprimidos (YANG et al., 2001). Com relação à atividade frente a este microorganismo, os dados obtidos no presente estudo (**Tabela 9 do item 4.2b**) indicaram que: 1) a região C-terminal sozinha não é suficiente para expressar a atividade total (assim como para a atividade antifúngica; **Tabela 6 do item 4.2a**); 2) uma redução expressiva da atividade ocorreu com a deleção da porção 33-47 (contendo a dobra  $\beta$  na porção N-terminal e parte da alça flexível espacialmente organizada) ou 53-61 (correspondente à  $\alpha$ -hélice da porção C-terminal), sendo o efeito mais acentuado nesta última; 3) apesar de o fragmento Hb40-61a apresentar uma estrutura muito similar à encontrada para o Hb33-61a pelos estudos de CD e  $^1\text{H-RMN}$  em presença de micelas de SDS, este não é a porção mínima frente a *M. luteus*. O fato da porção mínima ativa para a atividade antifúngica não ser a mesma para a atividade antibacteriana de um peptídeo antimicrobiano é esperado e concorda com observações anteriores feitas para diversos outros peptídeos, tais como a protegrina-1 [no qual a deleção de quatro resíduos na porção N-terminal e dois na porção C-terminal forneceu o análogo PC-17, que teve a sua atividade frente a *C. albicans* diminuída, enquanto a antibacteriana foi mantida (CHO et al., 1998)], a tanatina [na qual a remoção dos três resíduos da porção N-terminal não influenciou a atividade antibacteriana, mas reduziu a antifúngica (FEHLBAUM et al., 1996)]. As estrutura e composição de membrana desses microorganismos são muito distintas e podem explicar os diferentes requisitos estruturais do peptídeo necessários à expressão destes dois tipos atividades.

A diminuição da atividade frente ao aumento da força iônica do meio tem sido observada para vários peptídeos antimicrobianos catiônicos, inclusive para algumas

hemocidinas (GANZ; LEHRER, 1995, TAM et al., 1999, MAK et al., 2000, ROTHSTEIN et al., 2001). Algumas hipóteses para explicar essa redução na atividade em meios de alta força iônica já foram levantadas. Dentre elas, o enfraquecimento da interação eletrostática inicial entre as cargas positivas presentes nos peptídeos catiônicos e as cargas negativas de estruturas da membrana do microorganismo (os LPS nas bactérias Gram-negativas, o ácido lipoteicoico na maioria das bactérias Gram-positivas e a lipomanana no *M. luteus*) resultaria em uma diminuição/perda de atividade (DE LILLO et al., 1997, TAM et al., 2002). Outra hipótese é que a sensibilidade a sais de certos peptídeos está relacionada às mudanças de estrutura tridimensional. Park et al. (2004) mostraram que o análogo com a adição de motivos “helix capping” nos N- e C-terminais ao peptídeo estruturado em  $\alpha$ -hélice — [RLLR]<sub>5</sub> — manteve a estrutura e atividade em concentração elevada de sais, ao contrário do composto de partida, que perdeu a estrutura e reduziu sua atividade nessas condições. Esses autores sugeriram que a propriedade de estabilidade da hélice seria responsável pela integridade estrutural e insensibilidade a sais em alta força iônica. Tam et al. (2002) estudando peptídeos com motivos em folha  $\beta$  estabilizados por pontes dissulfeto, relataram aumento da sensibilidade a sais quando os mesmos foram linearizados. Essa influência da força iônica nas atividades dos peptídeos representa um entrave para a introdução dos peptídeos antimicrobianos na clínica e justifica o desenho de análogos com menor sensibilidade a sais (FRIEDRICH et al., 1999, YU et al., 2000, TAM et al., 2000). No presente trabalho, as atividades antimicrobianas de todos os peptídeos estudados foram influenciadas pela força iônica do meio (**Tabelas 8, 11 e 12 do item 4.2**), sugerindo que a busca por análogos menos suscetíveis deva ser perseguida ou que os mais ativos, até agora o Hb40-61a, sejam submetidos a testes objetivando uso tópico ou meios de baixa força iônica.

Os casos de infecções sistêmicas causadas por fungos que ocorrem principalmente em pacientes imunodeprimidos têm aumentado nos últimos anos em decorrência do aumento do

uso de medicamentos imunossupressores, da infecção por HIV e do avanço na idade da população (LUPETTI et al., 2002, WEI; BOBEK, 2004, RUHNKE, 2006). Por outro lado, as infecções superficiais (de pele e mucosas) também são causadas por esses microorganismos em pessoas saudáveis e imunocomprometidas (LUPETTI et al., 2002). Os fungos causam, por exemplo, candidíase vulvovaginal em mulheres sadias e candidíase oral e esofágica em pacientes portadores de HIV (REX et al., 1998). Nestas infecções, a *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, embora o número de isolados não-*albicans* tenha aumentado (REX et al., 2000). Entre os fármacos utilizados para o tratamento dessas infecções estão os antifúngicos poliênicos (como a anfotericina B), a 5-flucitosina e os inibidores da síntese do ergosterol (dentre eles estão os derivados azólicos, como o fluconazol; WHITE et al., 1998, SHEEHAN et al., 1999, REX et al., 2000). Entretanto, dificuldades como o aparecimento de resistência a fluconazol de vários isolados do gênero *Candida*, sobretudo nos portadores de HIV, bem como problemas como toxicidade da anfotericina B, tem impulsionado a busca por novos antifúngicos (LUPETTI et al., 2002). Portanto, o fato do Hb40-61a ter sido ativo frente à cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol abre novas perspectivas para o uso deste peptídeo (**Tabela 7 do item 4.2a**). Além disso, indica que o peptídeo tem um mecanismo diferente daquele do fluconazol.

Vários trabalhos mostraram que peptídeos apresentam sinergismo com outros compostos de ação antimicrobiana. Este é o caso da combinação do peptídeo “MUC-7 12-mer” com outro peptídeo “Hsn5 12-mer” ou miconazol frente a *Cryptococcus neoformans* (WEI e BOBEK, 2004) e do peptídeo gomesina com o fluconazol frente ao mesmo microorganismo (BARBOSA et al., 2007). Além disso, a associação de P18 e vancomicina apresentou sinergismo frente a *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VREF). Neste contexto, decidimos investigar a possibilidade do Hb40-61a, que em trabalho anterior se mostrou capaz de permeabilizar a membrana plasmática de *C. albicans* a 62,5 µM

(MACHADO et al., 2007) e que interage com lipídeos presentes neste tipo de membrana, poderia facilitar a entrada na célula de um outro antimicrobiano. O fluconazol, cujo alvo é uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol que está presente no citoplasma (WHITE et al., 1998), foi o escolhido. Infelizmente, os dados obtidos nos ensaios realizados não confirmaram qualquer ação sinérgica do Hb40-61a com o fluconazol, já que o índice fracional de concentração inibitória (index FIC) foi 1,0 (**Tabela 13 do item 4.2**), indicando ausência de sinergismo.

Em trabalho recente, relatamos que na faixa de concentrações 6,25-50,0  $\mu\text{M}$ , os peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a eram igualmente capazes de, após incubação por 18 h, causar a morte de *C. albicans* MDM8 e que em concentração 62,5  $\mu\text{M}$ , após incubação por 1h, ambos foram capazes de permeabilizar a membrana plasmática deste fungo (MACHADO et al., 2007). Anteriormente, também havíamos relatado que em 50,0  $\mu\text{M}$  o peptídeo Hb33-61a causou 100% de morte de *M. luteus* em 25 min (FOGAÇA, 2003). A ação antimicrobiana rápida é condizente com o observado para grande parte dos peptídeos antimicrobianos descritos (HANCOCK, 2001), sugerindo uma atuação via permeabilização de membranas celulares (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2001). No presente trabalho, a ação do peptídeo Hb40-61a frente a *C. albicans* MDM8 foi analisada em função do tempo (**Figura 26 do item 4.2f**). A taxa de morte de *C. albicans* causada pelo peptídeo foi alta e comparável a outros agentes peptídicos e não-peptídicos que, assim como o Hb40-61a, apresentam atividade fungicida como, por exemplo, a anfotericina B (BARTIZAL et al., 1997, HONG et al, 1999). Além disso, esta foi concentração-dependente, causando 100% de morte em 1h e 4h nas concentrações de 2 e 10 x MIC do peptídeo, respectivamente. Na concentração de 2 x MIC do peptídeo, apesar de uma redução inicial de 1 log de UFC/mL, ocorreu um período lag que durou aproximadamente 100 min, sugerindo que o crescimento da levedura seja necessário para ocorrer morte celular. De fato, o período de maior redução de células viáveis na presença

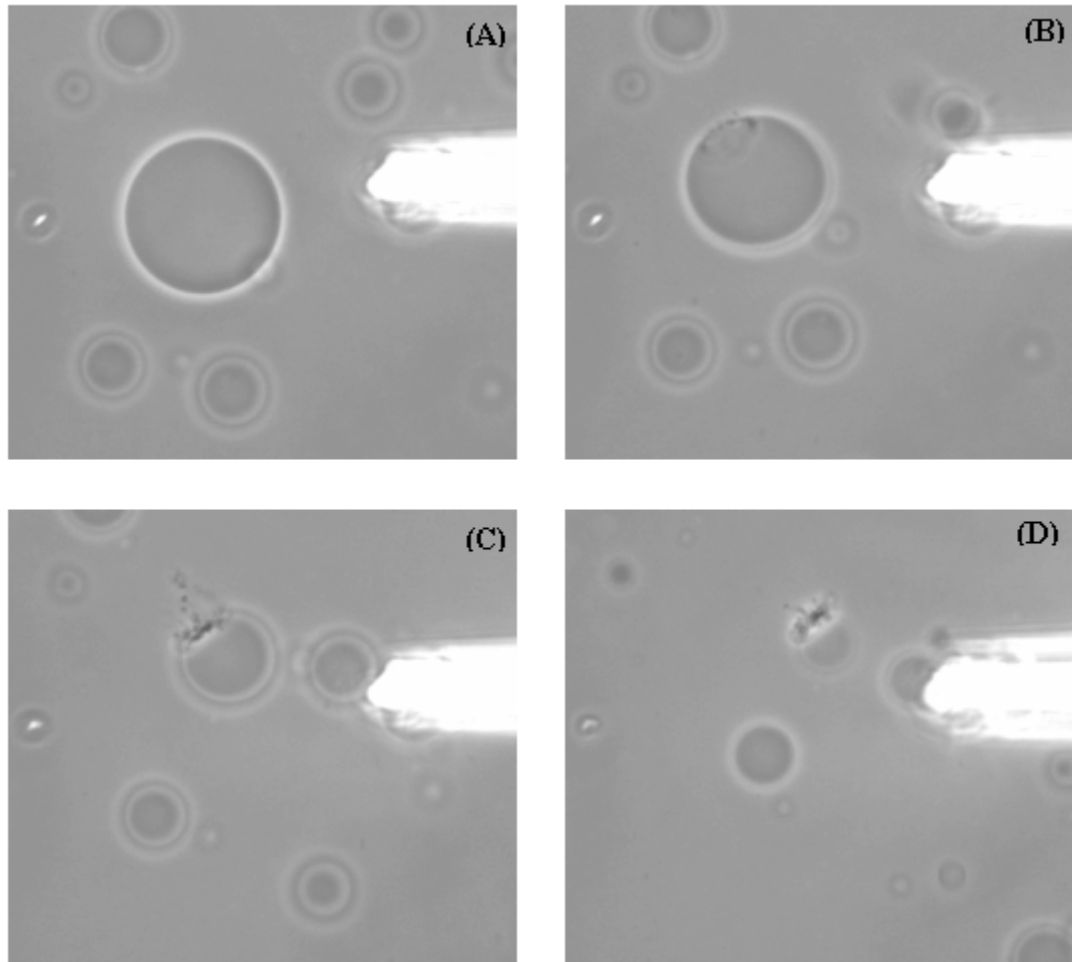
do peptídeo, também foi a de maior crescimento do controle. Portanto, outros mecanismos de ação como inibição de síntese de macromoléculas (que sejam essenciais para a sobrevivência da levedura) não podem ser descartados.

A determinação dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos é de fundamental importância, uma vez que essa informação pode ser utilizada para o desenho de novas drogas antibióticas e/ou mais específicas (MUÑOZ et al., 2006). Os primeiros mecanismos de ação descritos tinham como alvo a membrana plasmática, mas devido à diversidade desses compostos se tornou claro que este não era o único mecanismo possível (ver **item 1.1**). Como as hemocidinas são provenientes de proteínas com domínios de alto conteúdo de  $\alpha$ -hélice de natureza anfipática, Mak et al. (2000) sugeriram que a morte de microorganismos pelas hemocidinas envolvia a destruição da integridade da membrana plasmática pelo modelo carpete. Além disso, pelos ensaios de permeabilidade de membrana celular, Sforça et al. (2005) e Machado et al. (2007) sugeriram que o Hb40-61a é um peptídeo antimicrobiano de ação rápida que tem a membrana celular como alvo (HANCOCK; ROZEK, 2002). Para tentar obter mais indícios que fortaleçam esta suposição, o efeito do peptídeo Hb40-61a sobre modelos de membranas biológicas está sendo investigado em um projeto em colaboração com a Profa. Dra. Iolanda M. Cuccovia e da Dra. Kátia R. P. Daghanli, do nosso Departamento. Inicialmente, nossas colaboradoras realizaram experimentos de vazamento de carboxifluoresceína encapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina de ovo e cardiolipina (7:3 p/p, relação peptídeo/lipídeo (mol/mol) = 153/30). Nessa concentração testada, a adição do peptídeo Hb40-61a a essas LUVs não ocasionou o vazamento do marcador fluorescente para o meio que apresentava uma alta força iônica (tampão acetato 10mM, pH 5,1, contendo 300 mM de NaCl, concentração essa necessária para garantir o equilíbrio iônico entre o meio interno e externo das vesículas). Estes resultados, porém, concordam com aqueles obtidos nos ensaios microbiológicos (perda de atividade do peptídeo

Hb40-61a em alta força iônica). Assim, as Dras. Cuccovia e Daghasanli realizaram experimentos para investigar a interação do peptídeo com os mesmos lipossomos [relações peptídeo/lipídeo (mol/mol) testadas: 1/30, 2/30, 4/30, 8/30, 16/30] nos quais a turvação da mistura (devida à agregação dos lipossomos induzida pelo peptídeo) em várias concentrações de NaCl (0, 25, 50 e 100 mM) foi acompanhada em 400 nm. Os resultados já obtidos indicaram que a adição de peptídeo leva à agregação dos lipossomos, a qual diminui à medida que a força iônica aumenta (a partir de 50mM de NaCl). A capacidade do peptídeo de causar agregação de vesículas com carga negativa é uma indicação de que as interações eletrostáticas são essenciais para a atividade antimicrobiana desse peptídeo e que o sal pode antagonizar essa interação. Em colaboração com a Dra. Karin A. Riske, do Departamento de Biofísica da UNIFESP, também foram realizados experimentos de microscopia óptica envolvendo GUVs constituídas de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol de ovo (7:3 p/p) e o peptídeo Hb40-61a (relações peptídeo/lipídeo (mol/mol) testadas: 1/10, 1/20 e 1/100). Na ausência de sal, pH 5-6, somente na maior relação peptídeo/lipídeo testada, o peptídeo foi capaz de interagir com as GUVs provocando a formação de um “poro” e o extravasamento do conteúdo interno da vesícula (**Figura 30**). Com base nos resultados apresentados, não pudemos comprovar as sugestões prévias de Sforça et al. (2005) e Machado et al. (2007). Novos ensaios, essenciais para a continuidade do projeto, já foram programados pelas colaboradoras.

Muitos peptídeos com ação antibiótica apresentam certo grau de toxicidade a células de mamíferos. A toxicidade do peptídeo Hb40-61a foi medida pela determinação da sua atividade hemolítica. Neste caso, o peptídeo apresentou baixa hemólise em tampões de alta (PBS) e baixa força iônica (IGP). Análises anteriores de CD mostraram que os peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a interagem com o lipídeo de carga negativa SDS, mas não com o lipídeo zwitteriônico LPC (SFORÇA et al., 2005, MACHADO et al., 2007). Essa seletividade de ação sobre as bactérias em relação a células de mamíferos pode ser explicada por uma





**Figura 30. Microscopia óptica utilizando vesículas gigantes (GUVs) constituídas de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol de ovo (7:3 p/p) e o Hb40-61a. (A): injeção do peptídeo; (B), (C) e (D): tempos subseqüentes à injeção. Relação peptídeo/lipídeo = 1/10, pH 5-6, sem adição de sal.**

diferença na composição dos lipídeos dessas membranas (ZASLOFF, 2002, TOKE, 2005, GLUKHOV, 2005). Enquanto as membranas de eucariotos apresentam predomínio de lipídeos zwitteriônicos na face externa das bicamadas lipídicas (por exemplo, a fosfatidilcolina), as membranas externas das bactérias apresentam além de lipídeos zwitteriônicos (como por exemplo, fosfatidiletanolamina), 20 a 25% de lipídeos com carga negativa (por exemplo, o fosfatidilglicerol e a cardiolipina) (ZASLOFF, 2002, TOKE, 2005, GLUKHOV, 2005).

A observação de que o Hb40-61a foi pouco ativo em tampões de alta (PBS) e baixa força iônica (IGP) confirmou que a sua baixa atividade hemolítica, anteriormente relatada por Machado et al (2007), não era devida à alta força iônica do meio de medida da atividade hemolítica. Em outras palavras, o Hb40-61a é, de fato, um peptídeo antimicrobiano de baixa toxicidade.

#### **5.4 Análise por dicroísmo circular**

Na tentativa de correlacionar os resultados obtidos nos bioensaios com os comportamentos conformacionais dos peptídeos estudados, foram feitas análises preliminares em presença de 200 mM de micelas de SDS (meio anteriormente empregado para a determinação das estruturas dos peptídeos Hb33-61a e Hb40-61a por  $H^1$ -RMN). Para tanto, contamos com o auxílio da Dra. Luciana M. Quaglio.

Como descrito no **item 4.3**, foram observadas diferenças entre o comportamento conformacional do Hb40-61a e os dos seus análogos menos ativos. Infelizmente, não houve tempo hábil para o registro de novos espectros e análise detalhada destas diferenças, o que será feito na continuação do estudo da relação estrutura-atividade antimicrobiana do Hb40-61a.

## 6 CONCLUSÕES

A busca por novos compostos com ação antibiótica ou informações que permitam compreender o modo com eles a exibem é uma preocupação atual devido ao aparecimento crescente de resistência microbiana aos antibióticos usuais. Além disso, é esperado que o número de infecções causadas por microorganismos oportunistas, tais como *C. albicans*, aumentem com o avanço do número de pacientes imunocomprometidos pela AIDS, idade e transplantes. Por estas razões, os peptídeos antimicrobianos constituem uma classe de compostos atraente, pois, têm como características: promover a rápida morte de microorganismos, induzir menor aparecimento de resistência, poder apresentar amplo espectro de ação contra vírus, bactérias, fungos e parasitas e servir de modelos para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como análogos peptídicos e peptidomiméticos (HANCOCK, 2001, HELMERHORST et al., 1999).

Neste trabalho, demonstramos que o Hb40-61a é a porção mínima ativa do Hb33-61a frente a *C. albicans*, confirmando as suposições de Machado et al. (2007), os quais detectaram a presença dos mesmos motivos estruturais em ambos os peptídeos. Também evidenciamos que o Hb40-61a, não é a porção ativa do Hb33-61a frente a *M. luteus*, sugerindo que os requisitos estruturais para a exibição da atividade total frente aos dois microorganismos sejam diferentes. Além disso, coletamos novos dados que corroboram os anteriormente obtidos e sugerem que a ação antifúngica/fungicida desta hemocidina sintética ocorre pela perturbação da integridade da membrana plasmática de *C. albicans*.

Por ser linear, de médio tamanho, ativo em baixas concentrações contra *C. albicans* (inclusive frente a cepa resistente a fluconazol) e *M. luteus* e, além disso, apresentar ação fungicida rápida e baixa toxicidade frente a células de mamíferos, pode se tornar: 1) um composto de interesse comercial, desde que o seu uso seja tópico ou limitado a meios de baixa força iônica (água doce, por exemplo); 2) um modelo de estudos: i- para a elucidação de

mecanismo de ação de antimicrobianos de mesmas características estruturais; ii- da interação com modelos membranares; iii- de possibilidades de diminuição da influência da força iônica na sua atividade antimicrobiana.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERICIO, F.; KENIB-CORDONIER, N.; BIANCALANA, S.; GERA, L.; MASADA, R.I., HUDSON, D.; BARANY, G. Preparation and Application of the 5-(4-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric Acid (PAL) Handle for the Solid-Phase Synthesis of C-Terminal Peptide Amides under Mild Conditions. *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, p. 3730-3743.
- ALBIOL MATANIC, V.C.; CASTILLA, V. Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against Junin virus and herpes simplex virus. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, vol. 23, p. 382-9.**
- ANDERSEN, J.H.; JENSSEN, H.; SANDVIK, K.; GUTTEBERG, T.J. Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.*, 2004, vol. 74, p. 262-71.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, p. 415-33.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Chemistry and applications of synthetic antimicrobial peptides. In: DUTTON, C.J (ed.). *Peptide antibiotics: discovery, modes of action, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2002, 296 p.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. Solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford: IRL press, 1989. 216 p.
- BARBOSA, F.M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R.A.; MIRANDA, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M.L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, vol. 274, p. 279-86.
- BARKHUDARYAN, N.; OBERTHUER, W.; LOTTSPREICH, F.; GALOYAN, A. Structure of hypothalamic coronar-constrictory peptide factors. *Neurochem. Res.*, 1992, vol. 17, p. 1217-21.
- BARTIZAL, K.; GILL, C.J.; ABRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.M.; KONG, L.; SCOTT, P.M.; SMITH, J.G.; LEIGHTON, C.E.; BOUFFARD, A.; DROPINSKI, J.F.; BALKOVEC, J. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, vol. 41, p. 2326-32.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1758, p. 1529-39.
- BESSALLE, R.; KAPITKOVSKY, A.; GOREA, A.; SHALIT, I.; FRIDKIN, M. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 274, p. 151-5.

- BONAPACE, C.R.; BOSSO, J.A.; FRIEDRICH, L.V.; WHITE, R.L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, vol. 44, p. 363-6.
- BOWDISH, D.M.; DAVIDSON, D.J.; HANCOCK, R.E. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005, vol. 6, p. 35-51.
- BRANTL, V.; GRAMSCH, C.; LOTTSPREICH, F.; MERTZ, R.; JAEGER, K. H.; HERZ, A. Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur. J. Pharmacol.*, 1986, vol. 125, p. 309-10.
- BRAY, B.L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, vol. 2, p. 587-93.
- BREY, P.T.; LEE, W.J.; YAMAKAWA, M.; KOIZUMI, Y.; PERROT, S.; FRANÇOIS, M.; ASHIDA, M. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, p. 6275-9.
- BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 3, p. 238-50.
- BULET, P.; DIMARCQ, J.L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J.A. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, p. 14893-7.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.*, 2004, vol. 198, p. 169-84.
- CAO, W.; ZHOU, Y.; MA, Y.; LUO, Q.; WEI, D. Expression and purification of antimicrobial peptide adenoregulin with C-amidated terminus in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 40, p. 404-10.
- CHAN, D.I.; PRENNER, E.J.; VOGEL, H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.*, 2006, vol. 1758, p. 1184-202.
- CHANG, R.C.; HUANG, W.Y.; REDDING, T.W.; ARIMURA, A.; COY, D.H.; SCHALLY, A.V. Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, vol. 625, p. 266-73.
- CHERTOV, O.; MICHIEL, D.F.; XU, L.; WANG, J.M.; TANI, K.; MURPHY, W.J.; LONGO, D.L.; TAUB, D.D.; OPPENHEIM, J.J. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, p. 2935-40.

- CHO, Y.; TURNER, J.S.; DINH, N.N.; LEHRER, R.I. Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, p. 2486-93.
- CHRISTENSEN, M.; CARLSEN, J.E.; JOSEFSSON, L. Structure-function studies on red pigment-concentrating hormone, II. The significance of the C-terminal tryptophan amide. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 1979, vol. 360, 1051-60.
- CHRISTOFFERSEN, R.E. Antibiotics - an investment worth making? *Nat. Biotechnol.*, 2006, vol. 24, p. 1512-4.
- 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.
- DATHE, M.; WIEPRECHT, T.; NIKOLENKO, H.; HANDEL, L.; MALOY, W.L.; MACDONALD, D.L.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.*, 1997, vol. 403, p. 208-12.
- DE LILLO, A.; QUIRÓS, L.M.; FIERRO, J.F. Relationship between antibacterial activity and cell surface binding of lactoferrin in species of genus *Micrococcus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, vol. 150, p. 89-94.
- DE LUCCA, A.J.; BLAND, J.M.; JACKS, T.J.; GRIMM, C.; WALSH, T.J. Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin. *Med. Mycol.*, 1998, vol. 36, p. 291-8.
- DE LUCCA, A.J.; WALSH, T.J. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, p. 1-11.
- DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, p. 47070-7.
- DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.*, 2002, vol. 3, p. 107-22.
- 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. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, p. 29537-44.
- ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. In: LORIAN, V. (ed). *Antibiotics in laboratory medicine*; Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co., 1991, 432-492.

- FAIRBROTHER, R.W.; WILLIAMS, B.L. Two new antibiotics: antibacterial activity of novobiocin and vancomycin. *Lancet*, 1956, vol. 271, p. 1177-8.
- FÁZIO, M.A.; JOUVENSAL, L.; VOVELLE, F.; BULET, P.; MIRANDA, M.T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Biological and structural characterization of new linear gomesin analogues with improved therapeutic indices. *Biopolymers*, 2007, vol. 88, p. 386-400.
- FÁZIO, M.A.; OLIVEIRA, V.X.JR.; BULET, P.; MIRANDA, M.T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers*, 2006, vol. 84, p. 205-18.
- FEHLBAUM, P.; BULET, P.; CHERNYSH, S.; BRIAND, J.P.; ROUSSEL, J.P.; LETELLIER, L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, vol. 93, p. 1221-5
- 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. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, p. 33159-63.
- FERNANDEZ-LOPEZ, S.; KIM, H.S.; CHOI, E.C.; DELGADO, M.; GRANJA, J.R.; KHASANOV, A.; KRAEHENBUEHL, K.; LONG, G.; WEINBERGER, D.A.; WILCOXEN, K.M.; GHADIRI, M.R. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature*, 2001, vol. 412, p. 452-5.
- FIELDS, G.B.; NOBLE, R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, vol. 35, p. 161-214.
- FINLAY, B.B.; HANCOCK, R.E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 2, p. 497-504.
- FOGAÇA, A.C. *Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos do carrapato de boi *Boophilus microplus**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade São Paulo, 2003. 138 p. Tese de Doutorado em Parasitologia.
- 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*. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, p. 25330-4.
- FORATO, L.A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L.A. Study of resolution enhancement methods for analysis of secondary structure of proteins by FTIR. *Quim. Nova*, 1998, vol. 21, p. 146-50.



- FRECER, V.; HO, B.; DING, J.L. De novo design of potent antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, p. 3349-57.
- FRIEDRICH, C.; SCOTT, M.G.; KARUNARATNE, N.; YAN, H.; HANCOCK, R.E. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, p. 1542-8.
- 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 Lett.*, 2001, vol. 491, p. 159-63.
- FUKUI, K.; SHIOMI, H.; TAKAGI, H.; HAYASHI, K.; KISO, Y.; KITAGAWA, K. Isolation from bovine brain of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, containing the Tyr-Arg (kyotorphin) unit. *Neuropharmacology*, 1983, vol. 22, p. 191-6.
- GALOYAN, A.A. Primary structure and biological activity of hemoglobin-related hypothalamic peptides. *Biopolymers*, 1997, vol. 43, p. 135-7.
- GANZ, T.; LEHRER, R.I. Defensins. *Pharmacol. Ther.*, 1995, vol. 66, p. 191-205.
- GAUSE, G.F.; BRAZHNIKOVA, M.G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature*, 1944, vol. 154.
- GAZZANO-SANTORO, H.; PARENT, J.B.; GRINNA, L.; HORWITZ, A.; PARSONS, T.; THEOFAN, G.; ELSBACH, P.; WEISS, J.; CONLON, P.J. High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, p. 4754-61.
- GLUKHOV, E.; STARK, M.; BURROWS, L.L.; DEBER, C.M. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, p. 33960-7.
- GOOTZ, T.D. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, vol. 3, p. 13-31.
- GORDON, Y.J.; ROMANOWSKI, E.G.; MCDERMOTT, A.M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.*, 2005, vol. 30, p. 505-15.
- GOUGH, M.; HANCOCK, R.E.; KELLY, N.M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, p. 4922-7.
- GREENFIELD, N.J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *Trends Anal. Chem.*, 1999, vol. 18, p. 236-44.

- GREGORY, K.; MELLO, C.M. Immobilization of *Escherichia coli* cells by use of the antimicrobial peptide cecropin P1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, p. 1130-4.
- GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B.N. Antifungal antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 58, p. 46-57.
- GUY, C.A.; FIELDS, G. B. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. Em: **Methods in Enzymology** (Fields, G.B., ed.); San Diego: Academic Press, 1997, vol. 289, p. 67-83.
- HANCOCK, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet. Infect. Dis.*, 2001, vol. 1, p. 156-64.
- HANCOCK, R.E. Peptide antibiotics. *Lancet*, 1997, vol. 349, p. 418-22.
- HANCOCK, R.E.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, p. 1317-23.
- HANCOCK, R.E.; ROZEK, A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, vol. 206, p. 143-9.
- HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, 2006, vol. 24, p. 1551-7.
- HELMERHORST, E.J.; REIJNDERS, I.M.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; NIEUW AMERONGEN, A.V. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 449, p. 105-10.
- HOBSON; D.; HIRSCH, J.G. The antibacterial activity of hemoglobin. *J. Exp. Med.*, 1958, vol. 107, 167-183.
- HOLAK, T.A.; ENGSTRÖM, A.; KRAULIS, P.J.; LINDEBERG, G.; BENNICH, H.; JONES, T.A.; GRONENBORN, A.M.; CLORE, G.M. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 1988, vol. 27, p. 7620-9.
- 7 HONG, S.Y.; OH, J.E.; LEE, K.H. In vitro antifungal activity and cytotoxicity of a novel membrane-active peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, p. 1704-7.
- IVANOV, V.T.; KARELIN, A.A.; PHILIPPOVA, M.M.; NAZIMOV, I.V.; PLETNEV, V.Z. Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers*, 1997, vol. 43, p. 171-88.

- JANG, W.S.; KIM, H.K.; LEE, K.Y.; KIM, S.A.; HAN, Y.S.; LEE, I.H. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett.*, 2006, vol. 580, p. 1490-6.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 19, p. 491-511.
- JUBILUT, G.N.; MIRANDA, M.T.; TOMINAGA, M.; OKADA, Y.; MIRANDA, A.; NAKAIE, C.R. Resin selection based on the lability of peptidyl-resin linkage towards HF and TFA steps: dependence on the C-terminal amino acid and peptide length. *Pharm. Bull.*, 1999, vol. 47, p. 1560-3.
- 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. *Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, p. 595-8.
- KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, vol. 56, p. 285-9
- KIM, H.K.; LEE, D.G.; PARK, Y.; KIM, H.N.; CHOI, B.H.; CHOI, C.H.; HAHM, K.S. Antibacterial activities of peptides designed as hybrids of antimicrobial peptides *Biotechnology Letters*, 2002, vol. 24, p. 347-53
- KIM, H.S.; YOON, H.; MINN, I.; PARK, C.B.; LEE, W.T.; ZASLOFF, M.; KIM, S.C. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone 2A to the strong antimicrobial peptide Buforin I. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, p. 3268-74.
- KIM, Y.C.; LUDOVICE, P.J.; PRAUSNITZ, M.R. Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide. *J. Control. Release*, 2007, vol. 122, p. 375-83.
- 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. *J. Med. Chem.*, 2003, vol. 46, p. 2325-33.
- LAI, R.; LIU, H.; HUI LEE, W.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide toad *Bombina maxima*. *Biochem. Biophys. Res.*, 2002, vol. 295, p. 796-9.
- LANTZ, I.; GLÄMSTA, E.L.; TALBÄCK, L.; NYBERG, F. Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity. *FEBS Lett.*, 1991, vol. 287, p. 39-41.
- LEE, D.G.; KIM, D.H.; PARK, Y.; KIM, H.K.; KIM, H.N.; SHIN, Y.K.; CHOI, C.H.; HAHM, K.S. Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, vol. 282, p. 570-4.

- LEE, I.H.; CHO, Y.; LEHRER, R.I. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect. Immun.*, 1997a, vol. 65, p. 2898-903.
- LEE, I.H.; CHO, Y.; LEHRER, R.I. Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 1997b, vol. 118, p. 515-21.
- LEE, J.H.; MINN, I.; PARK, C.B. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 1998, vol. 12, p. 53-60.
- 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. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, vol. 791, p. 345-56.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERÍCIO, F.; GIRALT, E. *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Boca Raton: CRC Press, 1997, 278 p.
- LORENZINI, D.M.; DA SILVA, P.I.JR.; FOGAÇA, A.C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, vol. 27, p. 781-91.
- LUPETTI, A.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; SENESI, S.; CAMPA, M.; VAN DISSEL, J.T.; NIBBERING, P.H. Internal thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, vol. 46, p. 1634-9.
- MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. 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  $\alpha$ -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.
- MANT, C.T.; HODGES, R.S. *High-performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1991, 938 p.
- MERRIFIELD, B. Solid Phase Peptide Synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, p. 2149-54.
- MILTZ, J.; RYDLO, T.; MOR, A.; POLYAKOV, V. Potency evaluation of a dermaseptin S4 derivative for antimicrobial food packaging applications. *Packag. Technol. Sci.*, 2006, vol. 19, p. 345-54.
- MIRANDA, M.T.; CRAIG, A.G.; MILLER, C.; LIDDLE, R.A.; RIVIER, J.E. Total synthesis, purification, and characterization of human [Phe(p-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na)<sub>52</sub>, Nle<sub>32,53,56</sub>, Nal<sub>55</sub>]-CCK20-58, [Tyr<sub>52</sub>, Nle<sub>32,53,56</sub>, Nal<sub>55</sub>]-CCK-58, and [Phe(p-CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na)<sub>52</sub>, Nle<sub>32,53,56</sub>, Nal<sub>55</sub>]-CCK-58. *J. Protein Chem.*, 1993a, vol. 12, p. 533-44.
- MIRANDA, M.T.; LIDDLE, R.A.; RIVIER, J.E. Synthesis of human CCK26-33 and CCK-33 related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.*, 1993b, vol. 36, p. 1681-8.
- MONROC, S.; BADOSA, E.; FELIU, L.; PLANAS, M.; MONTESINOS, E.; BARDAJÍ, E. De novo designed cyclic cationic peptides as inhibitors of plant pathogenic bacteria. *Peptides*, 2006, vol. 27, p. 2567-74.
- MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GARCÍA, B.; MARCOS, J.F. Studies on the mode of action of the antifungal hexapeptide PAF26. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, p. 3847-55.
- MURAKAMI, T.; NAKAJIMA, T.; KOYANAGI, Y.; TACHIBANA, K.; FUJII, N.; TAMAMURA, H.; YOSHIDA, N.; WAKI, M.; MATSUMOTO, A.; YOSHIE, O.; KISHIMOTO, T.; YAMAMOTO, N.; NAGASAWA, T. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, p. 1389-93.
- NAKAJIMA, Y.; OGIHARA, K.; TAYLOR, D.; YAMAKAWA, M. Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.*, 2003, vol. 40, p. 78-81.
- 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. 2082-9.

- NISSEN-MEYER, J.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.*, 1997, vol. 167, p. 67-77
- ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, vol. 52, p. 1.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Cyclization of a cytolytic amphipathic alpha-helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, p. 6103-14.
- OREN, Z.; SHAI, Y. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure-function study. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, p. 1826-35.
- OSTRESH, J.M.; BLONDELLE, S.E.; DÖRNER, B.; HOUGHTEN, R.A. Generation and use of nonsupport-bound peptide and peptidomimetic combinatorial libraries. *Methods Enzymol.*, 1996, vol. 267, p. 220-34
- PACE, C.N.; SCHOLTZ, J.M.; A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys. J.*, 1998, vol. 75, p. 422-27.
- 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. *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, vol. 9, p. 377-82
- PARISIEN, A.; ALLAIN, B.; ZHANG, J.; MANDEVILLE, R.; LAN, C.Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 104, p. 1-13.
- PARK, I.Y.; CHO, J.H.; KIM, K.S.; KIM, Y.B.; KIM, M.S.; KIM, S.C. Helix stability confers salt resistance upon helical antimicrobial peptides. *J Biol Chem.*, 2004, vol. 279, p. 13896-901.
- PARK, Y.; PARK, S.N.; PARK, S.C.; SHIN, S.O., KIM, J.Y.; KANG, S.J., KIM, M.H, JEONG, C.Y.; HAHM, K.S. Synergism of Leu-Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, vol. 1764, p. 24-32.
- PATRZYKAT, A.; DOUGLAS, S.E. Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. *Trends Biotechnol.*, 2003, vol. 21, p. 362-69.
- PIERS, K.L.; BROWN, M.H.; HANCOCK, R.E.W. Improvement of outer membrane-permeabilizing lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by c-terminal modification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, vol. 38, p. 2311-16.

- PIOT, J.M.; ZHAO, Q.; GUILLOCHON, D.; RICART, G.; THOMAS, D. Isolation and characterization of a bradykinin-potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate. *FEBS Lett.*, 1992, vol. 299, p. 75-9.
- PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. *J. Pept. Sci.*, 2007, vol. 13, p. 386-92
- RAJ, P.A.; DENTNO, A.R. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; vol. 206, p. 9-18.
- RAJ, P.A.; EDGERTON, M.; LEVINE, M.J. Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, p. 3898-905.
- REX, J.H.; NELSON, P.W.; PAETZNICK, V.L.; LOZANO-CHIU, M.; ESPINEL-INGROFF, A.; ANAISSIE, E.J. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, p. 129-34.
- REX, J.H.; WALSH, T.J.; SOBEL, J.D.; FILLER, S.G.; PAPPAS, P.G.; DISMUKES, W.E.; EDWARDS, J.E. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, vol. 30, p. 662-78.
- ROBINSON, W.E. JR; MCDUGALL, B.; TRAN, D.; SELSTED, M.E. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, vol. 63, p. 94-100.
- ROTEM, S.; RADZISHEVSKY, I.; MOR, A. Physicochemical properties that enhance discriminative antibacterial activity of short dermaseptin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, p. 2666-72
- ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P.; TRAN, L.T.; XU, T.; ROBERTS F.D., DALLA SERRA M., BUXTON D.K.; OPPENHEIM F.G.; FRIDEN, P. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, vol. 45, p. 1367-73.
- ROVERO, P.; QUARTARA, L.; FABBRI, G. Solid-phase synthesis of neurokinin A antagonists. Comparison of the Boc and Fmoc methods. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 1991, vol. 37, p. 140-4.
- RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr. Drug Targets.*, 2006, vol. 7, p. 495-504.

- SAHL, H.G.; PAG, U.; BONNESS, S.; WAGNER, S.; ANTICHEVA, N.; TOSSI, A. Mammalian defensins: structures and mechanism of antibiotic activity. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, vol. 77, p. 466-75.
- SANTOS, A.R.; PINHEIRO, A.C.; SODERO, A.C.R.; CUNHA, A.S.; PADILHA, M.C.; SOUSA, P.M.; FONTES, S.P.; VELOSO, M.P.; FRAGA, C.A.M. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. *Quím. Nova*, 2007, vol. 30, p. 125-35.
- SCHALLY, A.V.; BABA, Y.; NAIR, R.M.G.; BENNETT, C. D.Amino acid sequence of a peptide with growth hormone-releasing activity isolated from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246, p. 6647-50.
- SCHALLY, A.V.; HUANG, W.Y.; REDDING, T.W.; ARIMURA, A.; COY, D.H.; CHIHARA, K.; CHANG, R.C.C.; RAYMOND, V.; LABRIE, F. Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the  $\alpha$ -chain of porcine hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, vol. 82, p. 582-8.
- SCOTT, K.A.; ALONSO, D.O.V.; SATO, S.; FERSHT, A.R.; DAGGETT, V. Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2007, vol. 104, p. 2661-6.
- SELSTED, M.E.; NOVOTNY, M.J.; MORRIS, W.L.; TANG, Y.Q.; SMITH, W.; CULLOR J.=S. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem.*, 1992, vol. 267, p. 4292-5.
- SFORÇA, M.L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R.C.; OYAMA, S. JR.; SILVA F.D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M.T.; 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.
- SHEEHAN, D.J.; HITCHCOCK, C.A.; SIBLEY, C.M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, vol. 12, p. 40-79.
- SHIN, S.Y.; KANG, J.H.; HAHM, K.S. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Pept. Res.*, 1999, vol. 53, p. 82-90.
- SHIN, S.Y.; YANG, S.T.; PARK, E.J.; EOM, S.H.; SONG, W.K.; KIM, Y.; HAHM, K.S.; KIM, J.I. Salt resistance and synergistic effect with vancomycin of alpha-helical antimicrobial peptide P18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 290, p. 558-62.
- SILVEIRA, G. P., NOME, F., GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. *Quím. Nova*, 2006, vol. 29, p. 844-55.



- SMILLIE, L.B.; NATTRISS, 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. 847-63.
- SOLÉ, N.A.; BARANY, G.J. Optimization of solid-phase synthesis of [Ala<sup>8</sup>]-dynorphin A. *J. Org. Chem.*, 1992, vol. 57, p. 5399.
- SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.; CERAUL, S.M.; MITCHELL, R.; BENZINE, T. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. *Exp. Appl. Acarol.*, 2005, vol. 36, p. 207-23.
- 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.
- STEWART, J.M.; YOUNG, J.D. *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2<sup>nd</sup> ed. Illinois: Pierce Chemical Company Rockford, 1984, 176 p.
- STORICI, P.; ZANETTI, M. A novel cDNA sequence encoding a pig leukocyte antimicrobial peptide with a cathelin-like pro-sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 196, p. 1363-8.
- STORM, D.R.; ROSENTHAL, K.S.; SWANSON, P.E. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.*, 1977, vol. 46, p. 723-63.
- TABER, H. Introduction to the peptide antibiotics In: DUTTON, C.J (ed.). *Peptide antibiotics: discovery, modes of action, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2002. 296 p.
- TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; UEDA, H.; AMANO, H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser. *Nature*, 1979, vol. 282, p. 410-2.
- TAM, J.P.; LU, Y.A.; YANG, J.L. Correlations of cationic charges with salt sensitivity and microbial specificity of cystine-stabilized  $\beta$ -strand antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 50450-6.
- TAM, J.P.; LU, Y.A.; YANG, J.L. Design of salt-insensitive glycine-rich antimicrobial peptides with cyclic tricyclic structures. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, p. 7159-69
- TAM, J.P.; LU, Y.A.; YANG, J.L.; CHIU, K.W. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 1999, vol. 96, p. 8913-8.
- TEMSAMANI, J.; VIDAL, P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov. Today*, 2004, vol. 9, p. 1012-9.

- TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, 2005, vol. 80, p. 717-35.
- VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; HELMERHORST, E.J.; AMERONGEN, A.V. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol Chem.*, 2001, vol. 382, p. 597-619.
- VANDERSPEK, J.C.; WYANDT, H.E.; SKARE, J.C.; MILUNSKY, A.; OPPENHEIM, F.G.; TROXLER, R.F. Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, vol. 45, p. 381-7.
- VARANDA, L.M.; MIRANDA, M.T.M. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Peptide Res.*, 1997, vol. 50, p. 102-8.
- WEI, G.X.; BOBEK, L.A. In vitro synergic antifungal effect of MUC7 12-mer with histatin-5 12-mer or miconazole. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004, vol. 53, p. 750-8.
- WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, vol. 11, p. 382-402.
- WU, M.; HANCOCK, R.E. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, p. 1274-6.
- YANG, D.; BIRAGYN, A.; KWAK L.W.; OPPENHEIM J.J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.*, 2002, vol. 23, p. 291-6.
- YANG, S.; SUGAWARA, S.; MONODANE, T.; NISHIJIMA, M.; ADACHI, Y.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; HASE, S.; TAKADA, H. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, p. 2025-30.
- YASIN, B.; WANG, W.; PANG, M.; CHESHENKO, N.; HONG, T.; WARING, A.J.; HEROLD, B.C.; WAGAR, E.A.; LEHRER, R.I. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, p. 5147-56.
- YU, Q.; LEHRER, R.I.; TAM, J.P. Engineered salt-insensitive alpha-defensins with end-to-end circularized structures. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, p. 3943-9.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002, 415, p. 389-95.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, vol. 84, 5449-53.