

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

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

CÉSAR MANUEL REMUZGO RUIZ

**Estudos de síntese, relação estrutura-atividade
e modo de ação de peptídeos antimicrobianos
ricos em glicina**

São Paulo

Data do Depósito na SPG
22/12/2008

06/02/09

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

73.166

CÉSAR MANUEL REMUZGO RUIZ

Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda

Co-orientadora: Profa. Dra. Sirlei Daffre

São Paulo
2008

574.192456
3912A

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015213

Ficha Catalográfica

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

Remuzgo Ruiz, César Manuel
R391es Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação
de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina / César Manuel
Remuzgo Ruiz. -- São Paulo, 2008.

207p.
195
*
R391es

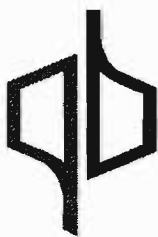
Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Miranda, Maria Terêsa Machini de

Co-orientador: Daffre, Sirlei

I. Peptídeo : Síntese : Bioquímica I. T. II. Miranda, Maria
Terêsa Machini de, orientador. II. Daffre, Sirlei, Co-orientador.

574.192456 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina”

CÉSAR MANUEL REMUZGO RUIZ

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. MARIA TERÊSA DE MIRANDA
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SHIRLEY SCHREIER
IQ – USP

Profa. Dra. REGINA LÚCIA BALDINI
IQ – USP

Prof. Dr. CARLOS BLOCH JUNIOR
EMBRAPA – Brasília

Prof. Dr. CLOVIS RYUICHI NAKAIE
UNIFESP

SÃO PAULO
06 DE FEVEREIRO DE 2009

César Manuel Remuzgo Ruiz

Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICO MINHA TESE

À Paola, minha amada e adorável esposa, por todo amor, carinho e paciência que recebo e recebi dela nestes 14 anos que estamos juntos. Obrigado pela linda filhinha que temos.

À Sofia, minha adoração. Desde que chegaste à minha vida, meu coração ficou mais feliz. Não sabes quanto te esperava.

A meus pais Alberto e Elba pela vida, amor, carinho e pelo grande esforço que fizeram para me dar educação.

A meus irmãos Alberto, Jaime, Orlando, Freddy e Sandra pelos felizes momentos da infância e o apoio que ainda recebo deles.

Aos meus sobrinhos Alonso, Betito, Jean Luc, Fátima, Alvarito e Stefano; apesar de não vê-los crescerem, eu os quero muito e desejo servir de exemplo.

A meus sogros Armando e Vilma pelo carinho, amizade, confiança, ajuda e apoio que sempre me deram.

AGRADEÇO

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda pela orientação, amizade, carinho e apoio que me deu diariamente; pelas conversas de fim de tarde sobre ciência e pesquisa e pela independência que me deu no desenvolvimento do projeto.

Aos atuais colegas do laboratório Cleber W. Liria, Carina Loffredo, Thaís S. Oewel, Vinicius R. Milan, Juliana S. Cavalcanti e aos que já foram embora Elaine Nogueira, Patrícia B. Proti, Alessandra Machado, Carolina D. Romagna, Giuliano C. Xavier, Renata Moura, Nicolas Nishikido e João B. dos Santos pela amizade, confiança, apoio, ajuda, os bolos de aniversário e o calor de família que deles recebi.

À Profa. Dra. Sirlei Daffre pela ajuda nos ensaios de atividade antimicrobiana e hemolítica, amizade e confiança.

À Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini e ao Dr. Gustavo F. S. Andrade pela excelente e produtiva colaboração no desvendamento da conformação estrutural das cadeias em crescimento ligadas à resina por espectroscopia Raman.

À Profa. Dra. Gláucia M. Machado-Santelli e Roberto Cabado pela colaboração nos estudos realizados por microscopia confocal de varredura a laser.

Ao pessoal amigo do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes do ICB: Eliane, Aline, Carlos, Andréia, Rodrigo, Diego, Carolina, Rafael, Felipe, e em especial, à Fernanda e à Suzana por toda a ajuda recebida na realização dos ensaios biológicos; pela sua amizade e confiança.

A Adriana Y. Matzukuma e Wilton da Rocha Lima pelo auxílio nas análises por citometria de fluxo.

Aos Prof. Dr. Frederico Gueiros, Guilherme Louzada e José Roberto Tavares pelo empréstimo do microscópio de fluorescência e pelo auxílio na obtenção de imagens.

A Fernanda M. Prado pelo auxílio na utilização do espectrômetro de massas multiusuário do Bloco 12 Inferior.

Ao Dr. Cleber W. Liria pelas análises de aminoácidos.

Ao Prof. Robert I. Schumacher por sua gentileza ao nos proporcionar os reagentes fluorescentes Mitotracker Orange e DiOC₂(3).

Aos Profs. Drs. Hermi F. de Brito e Pedro de Oliveira por sua gentil doação dos sais caotrópicos LiCl e NaClO₄, respectivamente.

À Profa. Dra. Shirley Schreier e ao Dr. Fábio H. Diszy pelas análises por dicroísmo circular que estão sendo realizadas e, por isso, não estão mostradas nesta tese.

Aos meus amigos peruanos e brasileiros Celso, Miriam, Elianita, Andréita, Miguel, Glenda, Miguelito, Erik, Cesty, Dioguito, Juan, Érika, Julio, Ricardo, Shila, Andrés, Marcos, Eduardo, Luis Fernando, Karen, Diego, Fernando.

Aos amigos do "Ciência com cerva" pelos momentos de descontração e discussão sobre ciência e política científica bebendo umas cervejas bem geladas.

A todo o povo brasileiro que com seus impostos permitem a criação de fundos para pesquisa e bolsas de estudos para estrangeiros.

Ao bandejão por aliviar minha fome nos almoços e, às vezes, no jantar.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao nosso laboratório e projetos.

E ao CNPq pela bolsa recebida.

“... não posso oferecer maior presente do que por em condição de poder entender, em pouco tempo, tudo o que aprendi em muitos anos e às custas de tantos dissabores e perigos.”

Nicoló Maquiavelli “O Príncipe”

RESUMO

Remuzgo, C. Estudos de síntese, relação estrutura-atividade e modo de ação de peptídeos antimicrobianos ricos em glicina. 2008. (207p). Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Proteínas e peptídeos ricos em glicina são encontrados em animais e plantas. Alguns apresentam atividade antimicrobiana. Como pouco se sabe sobre suas síntese, estrutura, relação estrutura-atividade e mecanismo de ação, tais tópicos foram estudados para os antimicrobianos cheferina I (*Chef I*) e/ou fragmentos da acantoscurreina (*acanto*).

No que se refere à *Chef I* (67,9% de Gly, 28,6% de His, seis repetições do motivo GGH e uma Tyr), sintetizamos, purificamos, caracterizamos e testamos *Chef I*, os seus análogos truncados na(s) porção(ções) N- ou/e C-terminal (is) e os análogos amidados *Chef Ia*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a*. Os três últimos e *Chef I* foram igualmente ativos frente a cepas de *C. albicans* (MIC: 12,5 μ M), mas não frente a cepas de *C. tropicalis* e *S. cerevisiae*. A amidação tornou o análogo *Chef I (3-28)a* mais ativo frente a tais cepas. Enquanto as atividades antifúngicas de *Chef Ia* e de seus análogos foram reduzidas pelo aumento da força iônica, elas foram aumentadas em presença de $ZnCl_2$ 5-10 μ M. A 62,5 μ M a *Chef Ia* foi letal para *C. albicans* MDM8. Ela foi pouco hemolítica em tampão fosfato contendo NaCl ou em tampão glicose fosfato isotônico (100 μ M: 18%). Análises por microscopia confocal e citometria de fluxo revelaram que *Chef Ia* marcada com carboxifluoresceína (FAM-*Chef Ia*) foi rapidamente internalizada nas células de *C. albicans* MDM8, um processo que não foi afetado pela força iônica do meio e se mostrou dependente de ATP e temperatura.

Quanto aos fragmentos da *acanto* (proteína com 132 aminoácidos, 73% de Gly e 3 repetições de uma seqüência de 26 aminoácidos), estudamos a síntese em fase sólida dos fragmentos N- e C-terminais, *acanto (1-22)* e *acanto (101-132)*, respectivamente, e da porção repetitiva, *acanto (23-48)*. Apesar de uma predição teórica não ter indicado alto

potencial de agregação para a *acanto*, as sínteses foram problemáticas: a ocorrência de aminoacilações incompletas repetitivas a 60° C usando diferentes estratégias, resinas, reagentes acopladores, solventes e sais caotrópicos sugeriram a ocorrência de agregação das cadeias peptídicas em crescimento sobre as resinas. O uso da resina CLEAR amida permitiu a obtenção do *acanto* (113-132). Tentativa de síntese convergente em fase sólida não foi bem sucedida. Espectros Raman das peptidil-resinas obtidas confirmaram a presença de estruturas em folha β pregueada. Somente o uso combinado de resina CLEAR amida, 60°C, 20% DMSO/NMP, Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH e LiCl permitiram a síntese total de *acanto* (101-132). O uso da resina CLEAR ácida permitiu a síntese do fragmento *acanto* (23-48) e *acanto* (10-22), esta última durante a tentativa de síntese do *acanto* (1-22). Os rendimentos foram baixíssimos e os espectros Raman das peptidil-resinas correspondentes também indicaram a formação de folhas β pregueadas.

Estes resultados indicaram que *Chef I* (3-28) *a* mimetiza *Chef I*, que *Chef Ia* é um fungicida potente com alvo intracelular, que a internalização do seu análogo marcado na célula de levedura ocorra via endocitose, que a *Chef Ia* tem potencial para agir como uma droga de uso tópico e que os fragmentos de *acanto* são “difficult sequences” típicas.

Palavras chaves: peptídeo rico em glicina, peptídeo antimicrobiano, cheferina, acantoscurreina, ação fungicida, agregação.

ABSTRACT

Remuzgo, C. Study of glycine-rich antimicrobial peptides: synthesis, structure-activity relationship and mode of action. 2008. (207 p). PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Proteins and peptides with high content of glycine have been found in animals and plants. Some of them display antimicrobial activity. As little is known about their chemical synthesis, structure, structure-activity relationship and mode of action, we studied such topics using shepherin I (*Shep I*) and fragments of acanthoscurrin (*acantho*) as targets.

Concerning to *Shep I* (67.9% of Gly, 28.6% of His, six direct repeats of the motif GGH and one Tyr), we synthesized, purified, characterized and tested *Shep I*, its analogues truncated at the N- and/or C-terminal portions and the amidated analogues *Shep Ia*, *Shep I (3-28)a* and *Shep I (6-28)a*. The last three analogues and *Shep I* were equally active against *C. albicans* (MIC: 12.5 μ M) strains, but not against *C. tropicalis* and *S. cerevisiae* strains. C-terminal amidation made *Shef I (3-28)a* more active against those fungal strains. Anticandidal activities of *Shep Ia* and truncated analogues were inhibited in high ionic strength solutions, but enhanced at 10 μ M ZnCl (2 to 8-fold). At 62.5 μ M (5 MIC), *Shep Ia* killed *C. albicans* MDM8 in 30 min. It caused low hemolysis in phosphate buffered saline and isotonic glucose phosphate buffer (100 μ M: 18%). Confocal microscopy and flow cytometry analyses revealed that *Shep I* modified with carboxyfluorescein (FAM-*Shep Ia*) was rapidly internalized into *C. albicans* MDM8 cells, process not affected by ionic strength and showed to be energy and temperature-dependent.

As to the fragments of *acantho* (a protein with 132 amino acids, 73% of Gly, and three repeats of 26 amino acids), we studied solid-phase syntheses of the N- and C-terminal portions, *acantho (1-22)* and *acantho (101-132)*, respectively, and of the repetitive portion, *acantho (23-48)*. A theoretical prediction did not indicate high aggregation potential for *acantho*, but solid-phase syntheses were troublesome: repetitive incomplete aminoacylations

took place even at 60°C using different strategies, resins, coupling reagents, solvents and chaotropic salts, suggesting aggregation of the growing peptide chains. Change to CLEAR amide resin allowed obtaining *acantho* (113-132). Attempt using convergent solid phase synthesis was not successful. Raman spectra of the growing peptidyl-resins revealed pleated β -sheet structures. Only the combination of CLEAR amide resin, 60°C, 20% DMSO/NMP, Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH and LiCl allowed the total synthesis of *acantho* (101-132). The use of CLEAR acid resin also allowed obtaining the fragments *acantho* (23-48) and *acantho* (10-22), the last one during the attempt of the synthesis of *acantho* (1-22). The synthesis yields were extremely low and, again, the Raman spectra of the growing peptide-resins indicated the occurrence of pleated β -sheet structures.

Altogether, the results indicated that *Shep I* (3-28)*a* mimics the fungicidal activity of *Shep I*, *Shep Ia* is a potent anticandidacidal peptide that has an intracellular target, FAM-*Shep Ia* may be internalized into the fungal cells via endocytosis, *Shep Ia* has the potential to act as a drug for topical use and *acantho* fragments are typical difficult sequences.

Keywords: glycine-rich peptide, antimicrobial peptide, shepherin, acanthoscurrin, fungicide, aggregation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo a IUPAC [União Internacional de Química Pura e aplicada, *Eur. J.Biochem.* 138:9-37 (1984)]

Código de uma e três letras para os vinte aminoácidos usuais					
A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutâmico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptofano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

Acanto : Acantoscurreina

ACN : acetonitrila

Boc : *t*-butiloxicarbonil

BOP : hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio

2-Br-Z : 2-bromo-benziloxicarbonil

But : *t*-butil

Bzl : benzil

2-Cl-Z : 2-cloro-benziloxicarbonil

CaCO₃ : Carbonato de cálcio

Chef I : cheferina I

Chef Ia : cheferina I amidada

CLEAR : resina com ligações cruzadas de etoxileno e acrilamida

DBU : 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undeca-7-eno

DCM : diclorometano

DCP : dicetopiperazina

DIC : *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DIPEA : *N,N'*-diisopropiletilamina

DMAP : dimetilaminopiridina

Dmb : dimetilbenzil

DMF : *N,N'*-dimetilformamida

DMSO : dimetilsulfóxido

DVB : divinilbenzeno

EDC : 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide

FACS : “Fluorescence activated cell sorting”

FAM : carboxifluoresceína

FITC : isotiocianato de fluoresceína

Fmoc : 9-fluorenilmetiloxycarbonil

GRP : proteína rica em glicina

GS : grau de substituição

HAc : ácido acético

HATU : hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HCl : ácido clorídrico

HF : fluoreto de hidrogênio

HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol

Hmb : 2-hidroxi-4-metoxibenzil

HMPB : ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butírico

HOBt : *N*-hidroxibenzotriazol

HRGPs : glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas.

LiCl : cloreto de lítio

LC/ESI-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray

MBHA : 4-metil-benzidrilamina

MeOH : metanol

MIC : concentração mínima inibitória

NaClO₄ : perclorato de sódio

NIR-FT-Raman : espectroscopia Raman próximo ao infravermelho com transformada de Fourier

NMP : *N*-metilpirrolidona

OBu_t : éster *t*-butílico

PAM : resina *p*-hidroximetilfenilacetamidometil

PEG : polietilenoglicol

Pmc : 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonil

PS : poliestireno

Rink amida : resina 4-(2',4'-dimetóxfenil-Fmoc-aminometil)-fenóximetil

RP-HPLC : cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

SAR : relação estrutura-atividade

SCPFS : síntese convergente de peptídeos em fase sólida

SPFS : síntese de peptídeos em fase sólida

TBTU : tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

TEA : trietilamina

THF : tetraidrofurano

TFA : ácido trifluoroacético

TFE : 2,2,2-trifluoroetanol

TFMSA : ácido trifluorometanosulfônico

TIS : triisopropilsilano

Tos : tosil

Trt : tritil

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. As doenças infecciosas e o seu controle	20
1.2. Peptídeos antimicrobianos (AMPs).....	25
a) Mecanismo de ação: modelo carpete (“carpet”).....	25
b) Mecanismo de ação: modelo “barrel stave”.....	26
c) Mecanismo de ação: poro toroidal.....	27
d) Mecanismo de ação: “detergent like” (agregados micelares).....	27
e) Mecanismos de ação não destrutivos à membrana celular.....	27
f) Classificação dos peptídeos antimicrobianos.....	28
1.3. Antimicrobianos peptídicos ricos em glicina.....	32
a) Proteínas ricas em glicina (GRPs).....	32
b) Peptídeos ricos em glicina isolados de plantas.....	35
c) Cheferina I.....	36
d) Acantoscurreina.....	37
e) Estrutura dos peptídeos ricos em glicina.....	37
1.4. Peptídeos ricos em histidina com atividade antimicrobiana e/ou de transferência de genes.....	39
1.5. Métodos de detecção e quantificação da internalização de AMPs em células.....	42
1.6. A importância da síntese química no estudo de peptídeos antimicrobianos.....	44
1.7. Síntese de peptídeos em fase sólida.....	45
a) Passo a passo.....	45
b) Agregação na síntese de peptídeos.....	48
c) O uso de protetores do grupo NH do esqueleto peptídico para evitar agregação na SPFS.....	51
d) O uso da espectroscopia Raman e a agregação na síntese em fase sólida de peptídeos.....	53
e) SPFS convergente de peptídeos em fase sólida (SCPFS).....	54
2. OBJETIVOS	56
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1. Resinas.....	57
3.2. Derivados de aminoácidos.....	57
3.3. Reagentes ativadores do grupo carboxila dos derivados de aminoácidos ou reagentes acopladores.....	57
3.4. Solventes e outros reagentes.....	57
3.5. Microorganismos.....	59

3.6. Síntese manual das peptidil-resinas.....	59
a) Procedimento geral para a síntese das peptidil-MBHA e peptidil-PAM.....	59
b) Procedimento geral para a síntese das peptidil-Rink amida.....	60
c) Procedimento geral para a síntese das peptidil-CLEAR ácida e amida.....	60
d) Procedimento geral para a síntese das peptidil-HMPB-CLEAR amida.....	61
e) Marcação da cheferina I e seu análogo amidado com 5(6)-carboxifluoresceína.....	62
3.7. Quantificação de grupamentos α -amino livres nas peptidil-resinas.....	63
3.8. Desproteção total e clivagem dos peptídeos das resinas.....	63
a) Estratégia Boc/Bzl.....	63
b) Estratégia Fmoc/But.....	64
3.9. Clivagem dos peptídeos das resinas.....	64
3.10. Purificação dos peptídeos brutos.....	65
3.11. Análise das peptidil-resinas e peptídeos obtidos.....	65
a) Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....	65
b) Análise de aminoácidos.....	65
c) Espectroscopia Near infrared-Fourier transformed (NIR-FT) Raman.....	66
d) Análise por RP-HPLC acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS).....	66
3.12. Ensaios biológicos com os peptídeos purificados.....	67
a) Atividade antibacteriana.....	67
b) Atividade antifúngica na ausência e presença de NaCl e ZnCl ₂	67
c) Ação fungicida.....	68
d) Cinética de morte celular.....	68
e) Ensaio hemolítico.....	69
3.13. Interação da cheferina I amidada com membranas biológicas.....	69
a) Permeabilização de membrana citoplasmática de <i>C. albicans</i>	69
b) Análises por microscopia confocal de varredura a laser.....	70
c) Análises por FACS.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. Estudo da relação estrutura-atividade antimicrobiana da Cheferina I.....	72
4.1.1. Síntese, purificação, caracterização química e atividade antimicrobiana da <i>Chef I</i> e análogos truncados.....	77
a) Sínteses da <i>Chef I</i> e de <i>Chef I</i> (3-28) na resina CLEAR ácida.....	77
b) Síntese dos análogos truncados <i>Chef I</i> (1-20), <i>Chef I</i> (3-20), <i>Chef I</i> (6-20), <i>Chef I</i> (9-20), <i>Chef I</i> (12-20), <i>Chef I</i> (15-20), <i>Chef I</i> (18-20) na resina PAM.....	84

c) Purificação da <i>Chef I</i> e dos análogos truncados <i>Chef I</i> (3-28), <i>Chef I</i> (1-20), <i>Chef I</i> (3-20), <i>Chef I</i> (6-20), <i>Chef I</i> (9-20), <i>Chef I</i> (12-20), <i>Chef I</i> (15-20) e <i>Chef I</i> (18-20).....	94
d) Atividade antimicrobiana.....	95
4.1.2. Efeito da amidação sobre a atividade antifúngica da <i>Chef I</i>	101
a) Tentativa inicial de síntese da <i>Chef I</i> na resina CLEAR amida.....	102
b) Síntese da <i>Chef Ia</i> e dos análogos truncados <i>Chef I</i> (3-28) <i>a</i> e <i>Chef I</i> (6-28) <i>a</i>	105
a) Atividade antimicrobiana.....	107
4.1.3. Efeito da força iônica sobre a atividade antifúngica de análogos da <i>Chef I</i>	110
4.1.4. Efeito do Zn ²⁺ sobre a atividade antimicrobiana de <i>Chef I</i> e de seus análogos amidados.....	112
4.1.5. Atividade hemolítica de <i>Chef Ia</i>	114
4.1.6. Atividade fungicida de <i>Chef Ia</i>	115
4.1.7. Mecanismo de ação de <i>Chef Ia</i>	116
a) Permeabilização da membrana de <i>Candida albicans</i> MDM8.....	116
b) Marcação de <i>Chef Ia</i> com 5(6)-carboxifluoresceína (FAM- <i>Chef Ia</i>).....	117
4.2. Estudo da SPFS da acantoscurreina.....	123
4.2.1. Síntese manual do fragmento <i>acanto</i> (101-132).....	123
a) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina MBHA pela estratégia Boc/Bzl.....	124
b) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi resina (Rink amida) pela estratégia Fmoc/But.....	129
c) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina CLEAR amida pela estratégia Fmoc/But.....	
d) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina CLEAR amida pela estratégia Fmoc/But.....	134
e) Tentativa de SPFS passo a passo usando protetor de esqueleto peptídico.....	149
4.2.2. Síntese do fragmento repetitivo <i>acanto</i> (23-48).....	149
4.2.3. Tentativa de síntese manual do fragmento N-terminal <i>acanto</i> (1-22)....	163
5. DISCUSSÃO GERAL	169
5.1. Cheferina I.....	169
5.2. Acantoscurreina.....	172
6. CONCLUSÕES	174
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176
ANEXOS	196

1. INTRODUÇÃO

1.1. As doenças infecciosas e o seu controle

Ao longo da história, o homem enfrentou epidemias causadas por diversos agentes infecciosos que dizimaram populações na Europa e na Ásia (LEDERBERG, 2000). A peste bubônica ou peste negra, a varíola, o tifo (séculos XIV-XV), a cólera e a febre puerperal (início do século XIX; TITBALL, 2004) são bons exemplos. Na América, a descoberta e a invasão pelos conquistadores europeus foram acompanhadas de doenças infecciosas como varíola, tifo, gripe e sarampo, que dizimaram parcialmente os nativos e os tornaram menos resistentes à conquista.

Da mesma forma que os conquistadores europeus trouxeram doenças infecciosas à América, eles levaram dela a sífilis, uma doença adquirida através de seus abusos sexuais, que na Europa acabou com a vida de reis, escritores, artistas, etc (WHO, 2000).

Na época não se sabia a origem destas infecções. Em 1530, Girolamo Fracastoro propôs que as doenças infecciosas seriam produzidas por contato direto e indireto com partículas que ele chamou de “esporos ou sementes”. As suas descobertas deram o primeiro indício do que seria a “teoria de contágio”: *“Eu chamo de fomites tais coisas como roupas, lençóis, etc., que apesar de não serem corrompidos por si próprios podem, entretanto, lançar as sementes essenciais do contágio e, assim, causar a infecção.”* (FRACASTORO; WRIGHT, 1930).

Após 350 anos da proposta de Fracastoro, Louis Pasteur propôs a “teoria germinal das doenças infecciosas”, na qual toda doença infecciosa tem sua causa em um micróbio que pode infectar a outras pessoas e propagar-se. Esta proposição, assim como a invenção do microscópio por Antonio van Leeuwenhoek, permitiram a identificação dos micróbios causadores das doenças infecciosas e a procura de formas para combatê-las (WHO, 2000).

Um dos relatos mais antigos sobre o uso de terapia antimicrobiana data de 1627, quando missionários jesuítas observaram que os índios peruanos utilizavam o extrato da casca da árvore *Cinchona* no tratamento da malária. Eles a levaram para Europa para controlar a doença causada pelo *Plasmodium falciparum*. Posteriormente, foi descoberto

que o extrato desta planta contém a quinina, um alcalóide que atualmente é o fármaco mais eficiente para o tratamento da malária (LEDERBERG, 2000).

Outro relato interessante foi feito em 1783 por David Forbes em uma comunicação à *Ethnological Society of London*: ele descreveu que os índios peruanos curavam a sífilis com soluções de mercúrio de uso tópico (TELLO, 1908).

Em 1789, Edward Jenner descobriu a vacina (derivado do latim “vaccinia” que significa vaca) como método de imunização ao observar que as mulheres que ordenhavam vacas adquiriam a varíola bovina, um tipo mais suave de doença se comparado à varíola humana. Ele recolheu o líquido das pústulas destas mulheres e infectou uma criança de 8 anos. O menino contraiu esta doença branda e, em pouco tempo, ficou recuperado. Em seguida, quando exposto à varíola humana, ele não contraiu a doença (PARRINO; GRAHAM, 2006).

Com a aceitação da “teoria germinal das doenças infecciosas” proposta por Pasteur, os materiais hospitalares começaram a ser fervidos para esterilização e o leite passou a ser pasteurizado para evitar o contágio de doenças infecciosas como a febre tifóide e a tuberculose (LEDERBERG, 2000).

No final do século XIX, as novas descobertas realizadas por L. Pasteur e R. Koch como as dos agentes etiológicos do antraz ou carbúnculo, da tuberculose e do cólera, das vacinas contra a raiva e antraz, bem como a descoberta dos vírus por D. Iwanoski e M. Beijerinck, iniciaram a era de ouro da microbiologia (LEDERBERG, 2000, BOSCH; ROSICH, 2008).

No início do século XX, P. Ehrlich observou que os microorganismos podiam ser corados especificamente em relação às células humanas para evidenciar neles a presença de receptores específicos. Assim, este pesquisador concebeu a idéia de um composto que seria tóxico para um parasita e inócuo para o seu hospedeiro. Após 606 experimentos, descobriu sua primeira “bala mágica” (que foi chamada de 606, asfernamina ou Salvarsan) um derivado do arsênico eficaz no tratamento da sífilis. Esta descoberta foi o passo inicial para a atual quimioterapia antimicrobiana (BOSCH; ROSICH, 2008).

Em 1928, A. Fleming, trabalhando com culturas de *Staphylococcus*, observou que algumas das placas haviam sido contaminadas com um mofo que tinha causado a formação de halos de inibição de crescimento. Posteriormente, ele identificou o mofo como fungos do gênero *Penicillium* e chamou a substância produzida por eles de penicilina (STEINBERG; RASO, 1998). Esta descoberta revolucionou a terapia antibacteriana e a Medicina, pois a penicilina foi muito utilizada durante a Segunda Guerra Mundial (WHO, 2000).

Nesta mesma época, G. Domagk, trabalhando com compostos derivados da sulfa, descobriu que o Prontosil vermelho curava camundongos que receberam doses letais de *Streptococcus* hemolíticos (BOSCH; ROSICH, 2008). Este composto foi utilizado com êxito no controle da febre puerperal na Europa e, em seguida, deu origem derivados de sulfa, tais como sulfonamida e sulfonamilaamida desenvolvidos por A. J. Evans e usados com grande êxito no combate de *Streptococcus* (WHO, 2000).

Posteriormente, foram descobertos alguns outros antibióticos (estreptomicina, isoniazida, rifampicina) que foram utilizados com eficácia na quimioterapia antibacteriana. Atualmente, contamos com uma ampla gama de antibióticos do tipo aminoglicosídeos, carbapenemos, cefalosporinas, glicopeptídeos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e quinolonas (DEMONTY, 1996).

Com respeito à terapia antiviral, esta começou em 1970 com a introdução do aciclovir, um potente antiviral usado contra herpes zoster, simples e genital (SUPERTI et al., 2008). Na década de 80, a AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida) começou a produzir vítimas convertendo-se em uma epidemia de caráter mundial, mas em 1983, R. Gallo e L. Montagnier (este último agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina de 2008) descobriram que o vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) era o agente etiológico desta doença (MONTAGNIER, 2002; GALLO, 2002). Em 1985, foi introduzida a Zidovudina (AZT), um inibidor da transcriptase reversa ou inversa do vírus. Posteriormente, foram descritos os inibidores de proteases e o Fuzeon® (Roche) ou enfuvirtida, um peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos que inibe a fusão do vírus HIV nos linfócitos (BRAY, 2003;

KITCHEN et al., 2008). Atualmente, existe um interesse mundial pela procura de uma vacina contra o HIV, mas, infelizmente, até agora ela ainda não foi desenvolvida.

Existe uma ampla variedade de antibióticos usados como armas para o combate das doenças infecciosas. Infelizmente, em muitos casos eles não são eficazes devido ao aumento de cepas microbianas resistentes. Somado a este problema, está o fato de que as grandes empresas farmacêuticas vem diminuindo o investimento para a procura de novos antibióticos peptídicos devido às seguintes razões: 1) ciclo de vida curto dos mesmos, pois em pouco tempo aparecem cepas resistentes a eles; 2) a terapia antimicrobiana é aguda e não crônica; 3) padrões estatísticos exigidos para demonstrar a eficácia e superioridade das novas drogas experimentais em ensaios clínicos (medida que foi imposta pela Agência Americana de Administração de Alimentos e Drogas; FDA), dificultam a aprovação de novos antibióticos (PROJAN, 2003; BRENNER; ELLIS-GROSSE, 2006).

Assim, se faz necessário pesquisar novos alvos diferentes daqueles dos antibióticos comerciais. Para isso são usadas abordagens experimentais como o sequenciamento dos genomas dos microorganismos, a genômica funcional e análises por microarranjos. Como estas abordagens modernas ainda não estão dando os resultados que se esperava, continua-se a investir na busca novos veículos e compostos antimicrobianos (SULAKVELIDZE, 2005). Os bacteriófagos, bacteriocinas e os peptídeos antimicrobianos são antibióticos potenciais devido às razões expostas a seguir:

a) Bacteriófagos: também chamados de fagos, são vírus que infectam bactérias para se replicar dentro delas. Após a replicação, alguns bacteriófagos lisam as bactérias hospedeiras e são liberados ao meio ambiente para infectar novas bactérias e repetir o ciclo. Este ciclo é conhecido como ciclo lítico e foi descoberto por F. Twort e F. D'Herelle independentemente em 1915 e 1917, respectivamente (DUCKWORTH, 1976). Como estes vírus não são tóxicos para plantas e animais e cepas bacterianas se tornaram resistentes a múltiplas drogas, eles passaram a ser considerados como passíveis de utilização em terapia antibacteriana. As abordagens podem incluir: 1) o seu uso direto como agentes

antibacterianos; 2) o uso das suas enzimas responsáveis pela lise celular como agentes antibacterianos; 3) o seu uso para o entendimento dos mecanismos de lise bacteriana induzida por fagos e a consequente identificação de novos alvos (SULAKVELIDZE, 2005). É essencial mencionar que mesmo diante do fato de as bactérias poderem adquirir resistência aos fagos, o uso de bacteriófagos na terapia antibacteriana ainda é visto como bastante promissor, pois os fagos coevoluem com as bactérias hospedeiras. Portanto, é possível isolar fagos mutantes que conseguem lisar as bactérias mutantes resistentes (SUMMERS, 2001).

b) Bacteriocinas: são toxinas bactericidas produzidas por bactérias e arqueae que não causam danos a elas mesma, mas inibem o crescimento de cepas bacterianas similares ou relacionadas (FARKAS-HIMSLEY, 1980; KIRKUP, 2006). Existem três tipos de bacteriocinas (COTTER et al., 2005): 1) os lantibióticos, que são peptídeos (< 5 kDa) termoestáveis que possuem na sua estrutura os aminoácidos modificados lantionina e metil-lantionina (JUNG, 1991; JACK et al., 1994; WILLEY; VAN DER DONK, 2007); 2) as bacteriocinas não lantibióticos, que também são peptídeos (< 10 kDa) termoestáveis mas não possuem modificações pós-transcrição como os lantibióticos (GALVEZ et al., 2007); 3) as bacteriolisinas, que são estruturas proteicas (> 30 kDa) termolábeis com mecanismo de ação diferente do das outras bacteriocinas e que causam lise celular via hidrólise de componentes da parede celular (COTTER et al., 2005). As bacteriocinas mostraram ter um grande potencial na preservação de alimentos (GALVEZ et al., 2007) por não serem tóxicas às células eucarióticas, serem inativadas pelas proteases gástricas, serem estáveis ao calor, tolerarem variações de pH, terem como alvos a parede celular ou a membrana citoplasmática, apresentarem um relativamente amplo espectro de ação. O valor deste potencial fez com que o FDA liberasse o lantibiótico Nisina para seu uso na preservação de alimentos (KIRKUP, 2006).

c) Peptídeos antimicrobianos: são peptídeos contendo 12-100 resíduos de aminoácidos produzidos pelos organismos procariotos e eucariotos que apresentam atividade frente a vírus, bactérias, fungos e alguns protozoários (JENSSEN et al., 2006).

1.2. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Inicialmente, estes compostos foram considerados como uma relíquia evolucionária insignificante do sistema imune inato em comparação com a resposta específica a antígenos do sistema imune adquirido. Entretanto, nos últimos anos, esta visão mudou devido à comprovação da sua onipresença em plantas e animais, à sua distribuição em diversas locações anatômicas, à descoberta de doenças contraídas na sua ausência ou mau funcionamento (RIVAS; GANZ, 1999) e à observação de que *in vitro* estes compostos eram ativos frente a patógenos de importância médica. Eles apresentam em sua estrutura elementos que facilitam a sua interação com as membranas celulares carregadas negativamente e tal interação consiste no primeiro passo para o desencadeamento da sua ação antimicrobiana (JOERGER, 2003).

Boa parte dos AMPs se caracteriza por sua carga líquida de +2 a +9 e por adotar uma estrutura anfipática em solução ou em contato com fosfolípidios ou membranas-alvo (GIULIANI et al., 2007). A sua expressão pode ser constitutiva ou induzida por estímulos inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias) ou infecciosos (carga microbiana) (HANCOCK, 2001).

Eles podem apresentar dois mecanismos no desencadeamento de seus modos de ação (**Figura 1**; POWERS; HANCOCK, 2003; GIULIANI et al., 2007):

- 1) Mecanismos destrutivos à membrana celular, que compreende os modelos de carpete ("carpet"), "barrel stave", poro toroidal e "detergent-like" (agregados micelares);
- 2) Mecanismos não destrutivos à membrana celular (envolvendo alvos intracelulares).

a) Mecanismo de ação: modelo carpete ("carpet")

Neste mecanismo, os peptídeos interagem com a superfície negativa da membrana celular (cabeças polares dos fosfolípidios que as compõem) para formar agregados de alta densidade que cobrem a membrana como se fosse um carpete. Ao alcançar uma determinada densidade estes agregados causam o rompimento da membrana

(BECHINGER; LOHNER, 2006). A dermaseptina utiliza este mecanismo de ação no desencadeamento de sua atividade antimicrobiana (GIULIANI et al., 2007).

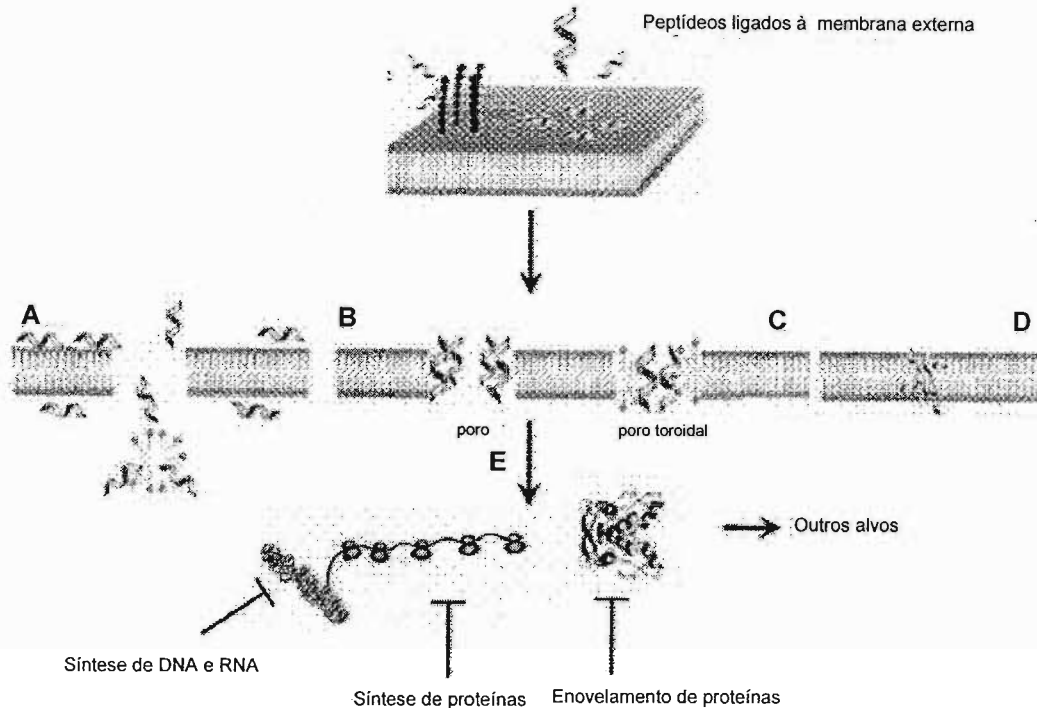


Figura 1: Modelos de mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos (Extraído de GIULIANI et al.; 2007). (A) “carpet”, (B) “barrel stave”, (C) poro toroidal, (D) “detergent like” e (E) mecanismos não destrutivos de membrana.

b) Mecanismo de ação: modelo “barrel stave”

Este mecanismo envolve a inserção perpendicular e agregação de pequenos peptídeos, criando poros na membrana celular. É necessário que eles apresentem estruturação em α -hélice ou em folhas- β pregueadas anfipáticas para permitir a formação do poro transmembranar (SHAI; OREN, 2001). De fato, as regiões hidrofóbicas se dispõem em paralelo às caudas hidrofóbicas dos fosfolípidios da bicamada lipídica e as regiões hidrofílicas se voltam para o interior do poro transmembranar criado (GIULIANI et al., 2007). O processo compreende a ligação do peptídeo na forma monomérica à membrana (o que o faz assumir estrutura secundária), agregação dos diversos monômeros, inserção dos

peptídeos na membrana e vazamento do conteúdo intracelular. A alameticina é um bom exemplo de AMP que apresenta este mecanismo, formando poros transmembranares de 2-3 Å (SANSOM, 1993).

c) Mecanismo de ação: poro toroidal

É uma extensão do mecanismo “barrel stave”, mas nesse caso os poros são formados por moléculas de peptídeos que se estruturam e lipídeos alinhados a eles (BECHINGER; LOHNER, 2006). A magainina-2 é caracterizada por apresentar este mecanismo (MATSUZAKI et al., 1996).

d) Mecanismo de ação: “detergent like” (agregados micelares)

Este mecanismo representa a explicação mais aplicável para os AMPs cujo alvo final é a membrana celular. Neste modelo, os peptídeos se reorientam, associam e intercalam à membrana formando micelas ou agregados que causam o rompimento da membrana (POWERS; HANCOCK, 2003; BECHINGER; LOHNER, 2006).

e) Mecanismos de ação não destrutivos à membrana celular

Existem AMPs que atravessam a membrana celular sem danificá-la. É o caso das defensinas de plantas (cuja atividade antifúngica é baseada no influxo de Ca^{+2} dentro da célula-alvo desencadeado por sua interação direta ou indireta com o canal de Ca^{+2} de membrana; RIVAS; GANZ, 1999), do análogo de sapecina (que ativa os neutrófilos através da interação com a calreticulina; CHO et al., 2001), do peptídeo híbrido cecropina-melitina (que induz a produção de NO em macrófagos; VELASCO et al., 1997), da 5-s-GAD (que está envolvida na produção de H_2O_2 e inibição de tirosina-quinase; AKIYAMA; NATORI, 2003) e da pirrocoricina (que se liga à proteína de choque térmico DnaK e inibe o enovelamento de proteínas assistido por chaperonas; KRAGOL et al., 2001).

f) Classificação dos peptídeos antimicrobianos

Nos últimos anos, centenas de AMPs foram isolados. Assim, classificações diferentes foram propostas. Inicialmente, a classificação se baseou unicamente na seqüência ou estrutura primária (ANDREU; RIVAS, 1998). Posteriormente, a estrutura secundária passou a ser considerada (BULET et al., 1999). Atualmente, a classificação que se baseia na composição de aminoácidos e estrutura secundária divide os AMPs em (BRODGEN, 2005): peptídeos aniônicos; peptídeos catiônicos lineares com estrutura em α -hélice; peptídeos aniônicos e catiônicos que contém Cys e pontes dissulfeto; peptídeos aniônicos e catiônicos que são fragmentos de proteínas; peptídeos catiônicos ricos em aminoácidos específicos.

AMPs aniônicos

Apesar de a maioria dos AMPs serem catiônicos, muitos são aniônicos como, por exemplo, os peptídeos associados ao surfactante pulmonar ovino que é ativo contra as bactérias *Mannheimia hemolytica*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Estes AMPs se caracterizam por seu alto conteúdo de Asp e por não terem a sua atividade aumentada em presença de Zn^{2+} (BRODGEN et al., 2003). Infelizmente, ainda se desconhece como eles desencadeiam sua atividade antimicrobiana.

A maximina H5 é outro representante deste grupo de peptídeos, que foi isolado da pele do sapo *Bombina maxima* e apresenta atividade contra *S. aureus* (LAI et al., 2002). Já a dermicidina, que faz parte do sistema imune inato de muitas espécies de vertebrados e é produzida pelas glândulas de sudoríparas, é ativo contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *C. albicans*, mesmo em diferentes pH e altas concentrações de sal (SCHITTEK et al., 2001).

É sabido que os peptídeos que apresentam α -hélices hidrofóbicas ou pouco aniônicas são mais seletivos para células de mamíferos do que para as microbianas (EPAND; VOGEL., 1999). É o caso da alameticina, um peptídeo que se estrutura em α -hélice hidrofóbica carregada negativamente que forma poros membranares através dos

quais passam íons (SANSOM, 1991). Igualmente, a gramicidina A age formando hélices seletivas a cátions que atravessam a membrana celular (KETCHUM et al., 1993).

AMPs catiônicos lineares com estruturas em α -hélice

Os peptídeos que formam α -hélices anfipáticas catiônicas são os mais estudados. Estes exibem toxicidade seletiva aos micróbios. A cecropina, isolada da pupa do bicho da seda *Hyalophora cecropia* (BOMAN, 1991), foi o primeiro AMP descoberto que apresentava este tipo de estruturação. Posteriormente, foram descobertos outros em insetos, intestino de porco e nas células do sangue de um protocordado marinho. A magainina, por exemplo, foi isolada da secreção da pele de *Xenopus laevis* e contém 23 aminoácidos (ZASLOFF, 1987).

A importância da estruturação em α -hélice anfipática na atividade antimicrobiana da magainina foi demonstrada quando, pela substituição de alguns dos seus resíduos de aminoácidos pelos isômeros D, os análogos resultantes apresentaram conteúdo helicoidal e atividade antimicrobiana inferiores àqueles do peptídeo original (CHEN et al., 1988). Por outro lado, tal importância foi questionada em outros estudos, tais como aquele referente à pardaxina (AMP isolado do peixe *Pardachirus marmoratus* com atividade citotóxica em micróbios e células de mamíferos), no qual a incorporação de D-aminoácidos na sequência fez com que a estruturação fosse alterada de α -hélice para folha- β e a sua atividade hemolítica fosse reduzida com manutenção da atividade antimicrobiana (OREN et al., 1999).

AMPs aniônicos e catiônicos que contêm Cys em pontes dissulfeto.

Eles se caracterizam por apresentar atividade antifúngica e antibacteriana, porém pouco é conhecido sobre o modo pelo qual eles danificam as membranas celulares-alvo (EPAND; VOGEL, 1999).

As defensinas são os representantes principais desta classe. Elas contêm 29-40 aminoácidos, 6 cisteínas que formam 3 pontes dissulfeto. Dependendo do arranjo das pontes dissulfeto, elas se subdividem em α - e β -defensinas e são bastantes ativas contra bactérias, fungos e vírus com envelope (GANZ et al., 1985; LEHRER et al., 1983). São produzidas nos grânulos dos neutrófilos (pelos leucócitos, células epiteliais do intestino, rins

e trato genito-urinário feminino), fazendo parte do sistema imune inato (HANCOCK; LEHRER, 1998). Os insetos e as plantas são as fontes de defensinas, sendo as vegetais chamadas de tioninas. Geralmente, as defensinas apresentam uma estrutura β anfipática e as de plantas e insetos apresentam uma α -hélice adicional (EPAND; VOGEL, 1999).

As protegrinas e taquiplesinas, isoladas de neutrófilos de porco e hemócitos do carangueijo *Tachypleus tridentatus*, respectivamente, são peptídeos antimicrobianos que se estruturam em grampo de fitas β -antiparalelas (dobra β) estabilizado por duas pontes dissulfeto. Estes peptídeos são ativos contra bactérias, fungos e certos vírus (SHI; GANZ, 1998; HANCOCK; LEHRER, 1998). A gomesina, isolada da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, também apresenta uma estrutura semelhante e atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasítica (SILVA et al., 2000). Ainda neste grupo enquadra-se a androctonina, peptídeo antimicrobiano não hemolítico isolado do escorpião *Androctonus australis*, que apresenta duas pontes dissulfeto, inibe o crescimento de bactérias, possui um amplo espectro de ação contra fungos filamentosos e não é hemolítico (HETRU et al., 2000).

Se por um lado a taquiplesina permeabiliza membranas bacterianas e bicamadas lipídicas artificiais e se transloca através da membrana celular gerando poros transitórios de forma similar ao que ocorre com a magainina (EPAND; VOGEL, 1999), a protegrina forma dímeros na presença de micelas de fosfolípidos, sugerindo que a oligomerização frente à membrana celular-alvo seja uma etapa no seu mecanismo de ação (LEHRER; GANZ, 1999).

AMPs aniônicos e catiônicos que são fragmentos de proteínas

Estes peptídeos, derivados de processamento enzimático de proteínas de alta massa molecular, tais como lactoferrina, hemoglobina, globina, caseína, lisozima e ovoalbumina apresentam estruturas e composições similares às de outros tipos de peptídeos. O seu papel no sistema imune inato ainda não está esclarecido (BRODGEN et al., 2005). Os fragmentos derivados de lactoferrina e hemoglobina são os mais estudados (HAUG et al., 2007; MACHADO et al., 2007; MAK, 2008). Os primeiros se caracterizam por apresentar um

amplo espectro de ação (bactérias e fungos) e por possuir atividade antiviral, antitumoral e propriedades imunogênicas (GIFFORD et al., 2005). Os segundos também apresentam várias atividades biológicas (opióide, analgésica, hematopoiética, imunomoduladora e antimicrobiana, entre outras; KARELIN et al., 1998; FOGAÇA et al., 1999; DUBIN et al., 2005).

AMPs catiônicos ricos em aminoácidos específicos

Eles podem ser ricos em Pro, Gly, His, Arg e Trp.

Os AMPs ricos em Pro se caracterizam por serem específicos para bactérias Gram-negativas. O seu modo de ação ainda não é entendido. Alguns destes peptídeos apresentam glicosilações essenciais às ações biológicas (BULET et al., 1999; HOFFMANN et al., 1996). A apidecina é o protótipo desta família, tendo sido inicialmente isolado de abelha (CASTEELS et al., 1989; EPAND; VOGEL, 1999). Outros peptídeos ricos em Pro foram caracterizados de Himenópteros (abecinas), Hemípteros (pirrocoricina de *Pyrrhocoris apterus*) e Dípteros (drosocina de *D. melanogaster*). Eles apresentam um certo grau de similaridade de sequência e, por isto, foi proposto que eles poderiam derivar de um precursor comum chamado Protoabecina (LEVASHINA et al., 1995). A “metchnikowin” é um peptídeo rico em Pro isolado de *Drosophila melanogaster*. Estranhamente, ele é ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos (LEVASHINA et al., 1995).

Os AMPs ricos em Arg e His são de grande interesse no desenho de novas drogas devido à sua dupla capacidade de agir como agentes antimicrobianos e transportar DNA ao núcleo das células. Estas duas capacidades podem ser de grande utilidade no tratamento de doenças como a fibrose cística, onde o peptídeo poderia ser usado como parte da terapia gênica e, ao mesmo tempo, agir como agente antimicrobiano (MASON et al., 2006). Exemplos deles são o LAH4, o H5WYG, o MUC7 D1 e as histatinas.

Os AMPs ricos em Arg e Trp, tais como a indolicidina e a tripticinina, pertencentes à família de catelicidinas, se caracterizam por serem potentes e apresentarem amplo espectro de ação (SELSTED et al., 1992; LAWYER et al.; 1996). O Trp na sequência destes peptídeos apresenta afinidade pela interface hidrofóbica da bicamada lipídica e os resíduos

de Arg das extremidades são importantes para a interação com as cabeças polares negativamente carregadas dos fosfolípidos da membrana celular. Por outro lado, os dois aminoácidos participam de interações cátion- π que ampliam as interações membrana-peptídeo (CHAN et al., 2006).

Os AMPs ricos em Gly se caracterizam por conter na sua seqüência 10-70% deste aminoácido. Os conhecidos foram isolados de insetos dípteros (dipterocinas, atacinas e sarcotoxinas), lepidópteros (atacinas), himenópteros (himenoptaecinas), coleópteros (coleopterina, holotricina e tenecina), hemípteros (hemiptericina), aranhas (acantoscurreina) e plantas (cheferinas). Muitos só exibem atividade antifúngica como o AFP (“antifungal protein”; IJIMA et al., 1993), a holotricina 3 (LEE et al., 1995) e a tenecina (JUNG et al., 1995). Outros, como as gloverinas (AXÉN et al., 1997) e as cheferinas I e II (PARK et al., 2000), apresentam atividades antifúngica e frente a bactérias Gram-negativas. Já a armadilina, apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas (HERBINIÈRE et al., 2005). Alguns genes que codificam seqüências ricas em Gly homólogas às dos AMPs foram encontrados em uma biblioteca de “Expressed sequence tags” (ESTs) de hemócitos de *Penaeus monodon* (SUPUNGUL et al., 2004). Os peptídeos AFP, armadilina, acantoscurreina, holotricina 3, tenecina e cheferinas apresentam um conteúdo excepcional de Gly (>40%).

1.3. Antimicrobianos peptídicos ricos em glicina

Encontrados em animais, plantas e microorganismos (SACHETTO-MARTINS et al., 2000).

a) Proteínas ricas em glicina (GRPs)

Geralmente as GRPs animais estão envolvidas em interações proteína-proteína como, por exemplo, as queratinas e outras proteínas dos filamentos intermediários (JORCANO et al., 1984), as lorricinas (que são os componentes mais abundantes dos envelopes celulares córneos dos queratinócitos epidermais e contribuem como uma barreira

física da pele) e as proteínas que ligam RNA de cadeia simples envolvidos na formação de ribonucleoproteínas (HEINTZEN et al., 1994; MORTERSON; DREYFUSS, 1989; STEINERT et al., 1991).

Sequências ricas em Gly também foram encontradas nas proteínas da seda das aranhas (espidroína) e dos bichos da seda (fibroína) (XU; LEWIS, 1990; BECKWITT; ARCIDIACONO, 1994), nas proteínas da casca de ovo de *Schistosoma mansoni* (PENA et al., 1990), em uma toxina da cianobactéria *Scytonema sp.* (SATHIYAMOORTHY; SHANMUSGASUNDARAM, 1996) e em proteínas vegetais de diversas localizações e funções (OBOKATA et al., 1991; SHOWALTER, 1993). Também foram identificados alguns genes que codificam regiões ricas em Gly de proteínas do fungo *Phytophthora infestans* (PIETERSE et al., 1994). No caso da queratina, os domínios ricos em Gly são flexíveis e participam das interações proteína-proteína. De fato, a alta flexibilidade parece auxiliar as proteínas que contêm tais domínios a assumir as conformações necessárias ao estabelecimento das interações com outras proteínas.

Várias seqüências de genes *grp* que expressam GRPs em plantas e as suas localizações subcelulares já foram descritas, indicando que as GRPs estão implicadas em diversos processos fisiológicos. GRPs têm sido encontradas: 1) nos tecidos vasculares, como as GRP 1.8 e GRP 1 de feijão (*Phaseolus vulgaris*) que são expressas nas células do protoxilema e do floema (KELLER et al., 1989; CONDIT, 1993), respectivamente; 2) na epiderme, como a MA-16 localizadas nos tecidos epidermais escutelares e em células epidermais de folhas embrionárias (GÓMEZ et al., 1988); 3) nas flores, usualmente nas anteras, como os genes *ta13* e *ta29* do tabaco ou as GRPs relacionadas à oleosina expressas em *Arabidopsis* e *Brassica* (KOLTUNOW et al., 1990; DE OLIVEIRA et al., 1993; RUITER et al., 1997); 4) nos frutos, como o *Tmf-5* do tomate (expresso em todos os tecidos do fruto verde imaturo) ou o gene *grp* da orquídea associado ao óvulo (SANTINO et al., 1997; NADEAU et al., 1996); 5) nos nódulos, como as 5 GRPs de *Vicia faba* (SCHRODER et al., 1997); 6) nas raízes, como a *ZmGRP-4* do milho (MATSUYAMA et al., 1999). Porém,

os dados já obtidos não permitem uma conclusão sobre suas funções biológicas (SACHETTO-MARTINS et al., 2000).

As GRPs vegetais possuem um maior conteúdo de Gly (60-70%) do que as animais. Além disso, a maioria delas faz parte de uma classe de proteínas estruturais de parede celular (SACHETTO-MARTINS et al., 2000; RINGLI et al., 2001). Relativamente às glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) e as proteínas ricas em Pro (PRPs), pouco se sabe sobre elas (SHOWALTER, 1993).

Algumas especulações são feitas a partir da análise das sequências de aminoácidos das GRPs vegetais e sua identidade com outras proteínas. Assim, por exemplo, devido à analogia com HRGPs, se acredita que as GRPs possam se aglutinar formando agentes que permitam o acúmulo de constituintes da parede celular como a lignina. Devido à presença de tripeptídeos repetitivos compostos de Tyr, His, Arg, Asn ou Gln acredita-se que as GRPs possam interagir com a matriz extracelular de forma similar à sequência RGD das adesinas de mamíferos. Outras possíveis funções seriam as de atuar como um "linker" entre a membrana e o citoesqueleto ou entre a membrana e a parede celulares, ligar-se a RNA ou ribonucleoproteínas ou estarem envolvidas na estabilização de lipídeos (SACHETTO-MARTINS et al., 2000). A expressão em poucas linhagens celulares vegetais, particularmente em células do xilema, pode indicar que elas estariam relacionadas a propriedades específicas de algumas paredes celulares (RINGLI et al., 2001).

A expressão de alguns genes que codificam GRPs em plantas pode ser regulada por fatores biológicos, físicos ou químicos (SHOWALTER et al., 1991; LIN et al., 2005): por exemplo, uma diminuição nos níveis das auxinas causa um acúmulo de GRP, indicando que o fitohormônio exerce um efeito regulador negativo. Por outro lado, também foi observada uma correlação entre a expressão de GRPs e os níveis do ácido abscísico (ABA), que é um outro fitohormônio relacionado ao desenvolvimento das sementes e de resposta adaptativa das plantas frente a condições adversas (REDDY; POOVAIAH, 1987; SACHETTO-MARTINS et al., 2000). Os processos biológicos regulados pelo tempo (posicionamento das folhas, aberturas dos estomas e fotossíntese), também chamados de ritmo circadianos,

também influenciam a expressão das GRPs (CARPENTER et al., 1994; HEINTZEN et al., 1994). Durante o estresse por falta de água, frio, luz e ferimentos são produzidas quantidades significativas de GRPs, indicando que elas participam na proteção ou na reconstituição das paredes celulares danificadas (KELLER et al., 1989). Todas estas observações, portanto, sugerem que as GRPs participam de processos celulares importantes.

Também é sabido que durante a infecção por fungos ou vírus patogênicos muitas plantas expressam determinadas GRPs. É o caso da expressão dos genes *Hvgrp-2* e *-3* em *Hordeum vulgare* em resposta à infecção pelos fungos *Erysiphe graminis* e *Rynchosporium secalis* e da expressão de genes de GRPs no tabaco induzidas por glicanos durante a infecção pelo fungo *Phytophthora megasperma* (BRADY et al., 1993).

Algumas GRPs com atividade antimicrobiana já foram isoladas de *Capsella bursa-pastoris* e de *Triticum kiharae*. Também foram feitas especulações de que GRP 1.8 poderia formar camadas de parede celular antimicrobiana na interface protoxilema-xilema (PARK et al., 2000; EGOROV et al., 2005; RINGLI et al., 2001), observações estas que nos levam a pensar que as GRPs também teriam uma função antimicrobiana nas plantas.

b) Peptídeos ricos em glicina isolados de plantas

Vários peptídeos antimicrobianos isolados de plantas foram descritos. Em geral, eles possuem 4, 6 ou 8 Cys envolvidas em pontes dissulfetos que restringem a sua variabilidade conformacional em solução. Eles podem ser classificados em 7 famílias (EGOROV et al., 2005): peptídeos ricos em Gly (PARK et al., 2000), tioninas, defensinas, peptídeos tipo heveína ou “cystein-knot peptide” (BROEKAERT et al., 1997) e peptídeos homólogos ao MBP-1 do milho (DUVICK et al., 1992).

Existem outros peptídeos que não se encaixam nessa classificação como o Ib-AMP de *Impatiens balsamina* que possui 4 Cys (TAILOR et al., 1997) e a esnaquina da batata, que contém 12 Cys. No trigo, foram encontrados quase todos os tipos de AMPs, o que é vantajoso para o controle de patógenos porque a probabilidade de aquisição de resistência

fica reduzida (EGOROV et al., 2005). Os Ac-AMP 1 e 2 isolados das sementes de *Amaranthus caudatus* são peptídeos que apresentam 6 Cys e 7 Gly (24%), grande similaridade com proteínas que ligam quitina (tais como as quitinases, lectinas e heveínas), atividade frente aos fungos patogênicos *Alternaria brassicola*, *Ascochyta pisi*, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium culmorum* e *Verticillium dahliae* e atividade frente ao fungo saprofítico *Trichoderma hamaratum* (BROEKAERT et al., 1992). As Pn-AMP 1 e 2 são outros dois peptídeos antimicrobianos isolados das sementes de *Pharbitis nil* que exibem homologia com as heveínas, contém 8 Cys e 7 Gly (18%) e são ativos contra *Botrytis cinérea*, *Colleotrichum longenarium*, *Sclerotinia sclerotoirum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *P. parasítica*, *Pythium spp.* e *Saccharomyces cerevisiae* (CHOON KOO et al., 1998). Já o peptídeo antifúngico YTRGGRGGWKGGGGGKGGGGGKGGGGG foi isolado da semente de abóbora e é ativo contra *Alternaria brassicola*, *Chalara elegans*, *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* e *Saccharomyces cerevisiae* (VASSILIOU et al., 1998). Outros peptídeos ricos em Gly (70-80%) isolados de sementes de trigo causaram mudanças morfológicas no *Helminthosporium sativum* quando nas concentrações 100-150 µg/mL (EGOROV et al., 2005).

c) Cheferina I

A cheferina I é um peptídeo antimicrobiano isolado das raízes da planta *Capsella bursa-pastoris* ("bolsa de pastor") que são usadas pelos coreanos para tratamento de feridas. Este peptídeo é formado por proteólise de um precursor (*Shep-GRP*) que também dá origem à cheferina II (PARK et al., 2000).

A cheferina I apresenta 28 resíduos de aminoácidos, uma massa molecular de 2360,6 Da, alto conteúdo de Gly (67,9%) e His (28,6%) e um domínio de seis repetições da sequência peptídica Gly-Gly-His. Ela foi descrita como ativa frente a bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Pseudomonas pútrida*, *P. syringae* e *Serratia sp.*), leveduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*) e fungos miceliais

(*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium culmorum*). A sua carga líquida +8 em pH fisiológico indica a sua natureza altamente catiônica (PARK et al., 2000).

A comparação das cheferinas com sequências depositadas no GenBank indica que elas constituem uma nova classe de peptídeos antimicrobianos.

d) Acantoscurreina

A acantoscurreina é uma GRP isolada de hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana* (Mygalomorphae, Theraphosidae, Theraphosinae) que apresenta conteúdo de Gly (72-73%) comparável ao das GRPs de plantas (Silva; 2000). Ela foi encontrada em duas isoformas (130 e 132 aminoácidos com massas moleculares de 10,111 e 10,225 Da, respectivamente) e se caracteriza por ser catiônica (carga líquida de +8 em pH fisiológico), alto pI (10), resíduo C-terminal amidado e a sequência de 26 aminoácidos GGGLGGGGLGGGGLGGGKGLGGGGLG repetida três vezes (LORENZINI et al., 2003).

É interessante que, além de Gly, a acantoscurreina contenha 12% de Leu, 7% de Tyr, 4-5% de Lys, 2% de Arg, 1% de Val e 1% de Asp. Este peptídeo não contém His e a sua porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos é significativamente mais alta do que a de proteínas similares. Além disso, os resíduos das porções C- (104-130/132) e N-terminais (1-22) se caracterizam por serem hidrofílicos, enquanto que a porção central é significativamente mais hidrofóbica (LORENZINI et al., 2003). Nenhuma estrutura secundária clara foi deduzida a partir da sequência primária desta GRP.

A acantoscurreina é produzida e estocada nos hemócitos. Quando a aranha enfrenta uma infecção, ela é liberada para a hemolinfa (FUKUZAWA et al., 2008), apresenta atividade antibacteriana e antifúngica frente a *E. coli* SBS363 e *Candida albicans* com MIC de 2,3 e 5,6 μ M, respectivamente.

e) Estrutura dos peptídeos ricos em glicina

Pouco se sabe sobre as estruturas secundárias destes compostos.

As poliglicinas podem se estruturar em folha β pregueadas, como a poliglicina I, ou em hélice 3_{10} , como a poliglicina II (SMALL et al., 1970). Predições teóricas feitas para algumas GRPs, tais como a *pt*GRP, GRP1.8, OsGRP1 e a GRP-22, indicaram que os seus domínios ricos em Gly se estruturavam em folhas β pregueadas (CONDIT; MEAGHER, 1986; LEI; WU, 1991; BERGERON et al., 1994). Da mesma forma, foi predito para a proteína da cartilagem das lampreias e lamprina a estruturação em dobras β e folhas β alternadas (ROBSON et al., 1993). Estudos de GRPs expressas após fermento do tomate indicaram a presença de regiões com folha β -pregueada e em α -hélice (SHOWALTER et al., 1991). Infelizmente, tais dados não foram confirmados por algoritmos recentes para modelagem e dinâmica moleculares (SACHETTO-MARTINS et al., 2000).

Se por um lado, espectros de dicroísmo circular da GRP de soja também não confirmaram estruturação em folha β (MATSUI et al., 1995), por outro lado os das cheferinas I e II mostraram que elas podem apresentar estrutura em folha β (33 e 25%, respectivamente) (PARK et al., 2000).

A análise das seqüências de aminoácidos de GRPs expressas em milho via diagramas de hidrofobicidade sugerem que a primeira metade é composta de porções alternadas de α e β estruturas (GÓMEZ et al., 1988). Estudos físico-químicos usando difração de raios X e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) mostraram que a proteína da teia da aranha contém porcentagem significativa de estruturação em folhas β e que a sua elasticidade não é afetada pela troca de aminoácidos nas regiões dessas folhas β (WARWICKER, 1960). Estudo da estrutura da espidroína indicou que esta GRP é formada por regiões pseudocristalinas compostas de folhas β empilhadas derivadas de múltiplas cadeias polipeptídicas (XU; LEWIS, 1990). Outro estudo realizado com o fragmento GGAGGGYGGDGG(A)₁₂GGAGDGYGAG da fibroína do bicho da seda *Samia cynthia ricini* via espectroscopia de ressonância magnética nuclear com rotação no ângulo mágico (MAS-NMR), indicou que as Gly se dispõem nas regiões de alanina (A)₁₂ formando estruturas em folha β (NAKAZAWA et al., 2003). Finalmente, a difração de raios X

dos cristais da proteína associada ao citoesqueleto em células eucarióticas (CAPs) mostraram uma região C-terminal se estruturava em três camadas β/β nas quais algumas Gly faziam parte das dobras β do tipo II. As regiões ricas em Gly pareceram importantes para a manutenção do enovelamento das três camadas de folhas β (LI et al., 2002).

Todos estes dados indicam que as sequências peptídicas ricas em Gly estão relacionadas à estruturação em folha β .

1.4. Peptídeos ricos em histidina com atividade antimicrobiana e/ou de transferência de genes

Estes compostos são de grande interesse devido à sua capacidade de agir como agentes antimicrobianos e transportar DNA ao núcleo das células. Tais características podem ser de grande utilidade no tratamento de doenças como a fibrose cística, pois o peptídeo poderia ser usado como parte da terapia gênica e, ao mesmo tempo, agir como agente antimicrobiano (MASON et al., 2006). Seguem abaixo alguns exemplos deste tipo de peptídeo.

Histatinas

São uma família de AMPs isolados da saliva humana (OPPENHEIM et al., 1988). Foram encontradas 12 formas de histatinas, mas as 1, 3 e 5 são as três principais (TROXLER et al., 1990). Elas também apresentam atividade bactericida frente a *Streptococcus mutans*, espécies de *Actinomyces* e *Porphyromonas gingivalis* (HELMERHORST et al., 1997). A histatina-5 (DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGY) é a que foi mais estudada por apresentar a maior atividade contra *C. albicans*. (OPPENHEIM et al., 1988).

É sabido que a sua ligação às proteínas Ssa1/2 (pertencentes à família de proteínas de choque térmico 70 encontradas na parede celular) facilita o seu transporte para dentro da célula (LI et al., 2003). Lá dentro, a histatina-5 causa a liberação não lítica do ATP, NAD⁺,

AMP, ADP e de alguns íons (BAEV et al., 2004). Infelizmente, ainda não é claro como a liberação de ATP em *Candida albicans* por ação da histatina-5 leva à morte celular.

LAH4

O LAH4 (KKALLALALHHLAHLALHLALALKKA) é um modelo de peptídeo catiônico desenhado para apresentar as seguintes características (BECHINGER, 1996; VOGT; BECHINGER, 1999): i) as quatro Lys das extremidades servem para ancorá-lo na membrana e para aumentar a sua solubilidade; ii) as His no centro da seqüência permitem a alteração de sua carga líquida em função do pH do meio; iii) as Ala e Leu formam uma superfície hidrofóbica e ajudam na estruturação em α -hélice. O LAH4 (10 μ M) é ativo frente a *E. coli* em pH 5,5 e a atividade é maior em *B. subtilis* (0,2 μ M) em pH 5,5 e 7,5 (VOGT; BECHINGER, 1999). Como em pH 7,2 análogos derivados do LAH4 foram ativos frente a várias cepas de *Staphylococcus aureus*, mas inativos frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. Megaterium*, o conjunto de resultados obtidos indicou que os peptídeos ricos em His podem matar bactérias por modos diferentes (MASON et al., 2006).

A aplicação mais explorada do LAH4 é a de ser usado como uma alternativa aos métodos utilizados para a transfecção de células de mamíferos devido à sua capacidade de transportar DNA ao núcleo das células (MASON et al., 2006; KICHLER et al., 2006, KICHLER et al., 2007). Diversos estudos indicaram que as moléculas de DNA se ligam ao peptídeo catiônico e o complexo aos proteoglicanos de heparan sulfato via interações inespecíficas; posteriormente, o complexo ingressa na célula por endocitose; com o amadurecimento do endossomo, o seu interior se torna ácido e, portanto, as His do peptídeo ficam protonadas; o aumento de sua carga líquida (+9) faz com que ele interaja com os lipídeos carregados negativamente causando a desestabilização da membrana do endossomo e, por conseguinte, a liberação das moléculas de DNA no meio intracelular (KICHLER et al., 2006; MASON et al., 2007).

Domínio 1 da MUC7 (MUC7-D1)

É um peptídeo correspondente à porção N-terminal da mucina de baixa massa molecular MUC7 (conhecida também como mucina MG₂). Ele possui 51 resíduos, apresenta

uma porção de 15 resíduos (R³ERDHELRRHHHQ¹⁷) semelhante à histatina-5, é ativo contra *Candida albicans* e *C. glabrata* resistentes não resistente a azóis e é ativo contra *Cryptococcus neoformans* sensível e resistente a anfotericina B (SITU; BOBEK, 2000). Experimentos de dicroísmo circular indicaram que em 80% TFE este peptídeo apresenta uma estrutura em α -hélice (GURURAJA et al., 1999).

H5WYG

É um análogo da porção N-terminal da subunidade HA-2 da hemaglutinina do vírus influenza (GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYG), em que os resíduos onde os resíduos Gly⁴, Gly⁸, Gln¹¹, Thr¹⁵ e Asp¹⁹ foram trocados por His e a Met¹⁷ foi mudada por Leu para torná-lo um peptídeo capaz de ter a sua carga líquida alterada em função do pH do meio (MIDOUX et al., 1998), pois como citado acima, esta característica é de grande utilidade na permeabilização de membranas e translocação de genes. O H5WYG já foi utilizado com êxito na transfecção de DNA em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), melanoma murino, musculatura vascular lisa de coelho (Rb-1) (MIDOUX et al., 1998; 2002).

O Zinco (Zn²⁺) é um metal essencial para a saúde humana que atua como cofactor de muitas enzimas ou desempenha papel importante em vários processos biológicos como a expressão dos genes, digestão de alimentos, estocagem de insulina, formação do colágeno e crescimento (ATKINS; JONES, 2005). A maioria das zinco-endopeptidases, entre elas as astacinas dos venenos das cobras, adamalinas, as serralisinas e as matrixinas se caracterizam por apresentar um motivo conservado (HEXXHXXGXXH) que coordena com este metal (BODE et al., 1993). A maioria das histatinas também apresenta este motivo conservado (MELINO et al., 2006). Por isso, foram realizados estudos para tentar entender a influência do Zn²⁺ em suas atividades antimicrobianas. De fato, inicialmente foi observado que 10 μ M de Zn²⁺ induz a atividade fusogênica de vesículas pequenas unilamelares (SUV) da histatina-5 (MELINO et al., 1999). Posteriormente, também foi observada uma atividade nucleásica da histatina-5 quando ela estava complexada ao Zn²⁺ (MELINO et al., 2006).

Por outro lado, alguns estudos realizados com (i) análogos dos peptídeos que apresentam os motivos Cardin e Weintraub [(AKKARA)₄ e (ARKKAAKA)₃ responsáveis da ligação com a heparina] e que tiveram os seus aminoácidos básicos substituídos por His, (ii) fragmentos correspondentes ao domínio 5 do cininogênio humano de alto peso molecular que possui um alto conteúdo em His e (iii) histatina-5, mostraram que as suas atividades antimicrobianas contra cepas de *Enterococcus faecalis* eram aumentadas em meio que continha 50 µM de Zn²⁺ (RYDENGARD et al., 2006). Estudos realizados com uma glicoproteína rica em His, que é abundante no plasma e trombócitos e que liga heparina, apresentou atividade lítica sobre *Enterococcus faecalis* na presença de Zn²⁺ (RYDENGARD et al., 2007). Também foi descrito que a kapacina, um peptídeo correspondente ao fragmento 106-169 da κ-caseína bovina (DASHPER et al., 2005) e algumas proteínas humanas que reconhecem peptidoglicanos (PGLYRP-1, PGLYRP-3, PGLYRP-4, PGLYRP-3:4; WANG et al., 2007) têm suas atividades antibacterianas aumentadas na presença do íon metálico.

1.5. Métodos de detecção e quantificação da internalização de AMPs em células

Como já citado, existem AMPs que se caracterizam por serem catiônicos e terem um alvo intracelular. Por outro lado, existem peptídeos que se translocam através da membrana celular, mas apresentam ação antimicrobiana (PARK et al., 1998; VYLKOVA et al., 2007). Eles são chamados de peptídeos penetrantes de células (CPPs).

Várias são as técnicas que permitem o estudo dos mecanismos de internalização desses peptídeos. Estes estudos podem ser realizados *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* empregam modelos simplificados de membranas celulares, tais como as vesículas unilamelares gigantes (GUVs), as grandes (LUVs) e as pequenas (SUVs); estes dois últimos modelos são muito utilizados devido à sua maior estabilidade (PERSSON et al., 2004). Com estas vesículas pode-se realizar experimentos de detecção do posicionamento do peptídeo na membrana ou na fase aquosa interna e do escape de peptídeo encapsulado que utilizam apagadores de fluorescência ("quencher") ou se baseiam na transferência de energia de

ressonância de fluorescência (FRET) (HENRIQUES et al., 2007). Já os estudos da internalização dos AMPs ou CPPs *in vivo* usualmente envolvem o uso de fluoróforos livres ou a derivatização dos peptídeos estudados. A derivatização do peptídeo pode alterar as propriedades dele, devido à natureza hidrofóbica dos fluoróforos empregados, levando ao aumento ou diminuição de sua atividade (SZETO et al., 2005).

A quantificação da concentração do peptídeo internalizado e, portanto, presente no citoplasma é usualmente realizada por medida direta da emissão de sua fluorescência. Uma das técnicas mais usadas para tal é a citometria de fluxo (FACS-Fluorescence-Activated Cell Sorter, HELMERHORST et al., 1999; RUISSEN et al., 2001; KIM et al., 2001), na qual são realizadas as quantificações da fluorescência das células que contém o peptídeo internalizado e das células sem peptídeo (padrão). Para eliminar o excesso de peptídeo marcado que não translocou as membranas celulares são usados vários procedimentos que podem incluir tripsinização e centrifugação (RICHARD et al., 2003) ou o uso de apagadores de fluorescência ("quenching", HENRIQUES et al., 2005).

Uma outra técnica usada para quantificar o peptídeo no citoplasma é a espectrometria de massas MALDI-TOF. Nesta metodologia, as células são expostas aos peptídeos que possuem um padrão interno na extremidade N-terminal (p. ex., quatro Gly em sequência) e biotina e, após a sua internalização, elas são lavadas e tripsinizadas para eliminar o excesso de peptídeo marcado. Posteriormente, as mesmas são expostas a uma quantidade de peptídeo de concentração conhecida com biotina e as quatro Gly deuteradas. Logo, as células são rompidas e os peptídeos translocados são capturados por grãos magnéticos que contém streptavidina. Posteriormente, a quantificação do peptídeo internalizado é realizada por comparação dos espectros de MALDI-TOF-MS do peptídeo não deuterado e do deuterado de concentração conhecida (BURLINA et al., 2005).

Também é possível visualizar o peptídeo que translocou as membranas celulares por microscopia de fluorescência ou microscopia confocal de varredura a laser. Nestes casos, os peptídeos podem estar marcados com biotina ou fluoróforos, tais como a fluoresceína, o "Texas Red", a rodamina, entre outros. A vantagem de usar microscopia confocal de

varredura a laser ao invés da microscopia de fluorescência é a possibilidade de aquisição de várias seções ópticas (plano a plano) que geram uma imagem tridimensional, permitindo co-localizar o peptídeo internalizado com organelas marcadas com fluoróforos específicos (KIM et al., 2001; RUISSEN et al., 2001; TAKESHIMA et al., 2003).

A translocação do peptídeo também pode ser inferida através de alterações ou danos intracelulares ou com a ajuda de técnicas de eletrofisiologia transmembranar, pois o processo de translocação através da membrana celular pode induzir a sua desestabilização ou de alguns de seus canais iônicos (DESHAYES et al., 2004).

1.6. A importância da síntese química no estudo de peptídeos antimicrobianos

Como discutido anteriormente, já foram descritas centenas de AMPs obtidos de várias fontes naturais. Entretanto, boa parte destas fontes fornece estes compostos em quantidade pequeníssimas. O primeiro passo, portanto, é obter o sintético em quantidade e qualidade suficientes aos experimentos necessários para a investigação de seus espectros e mecanismos de ação, bem como do seu comportamento conformacional em solução. Em paralelo, se pode desenhar, sintetizar e testar análogos para explorar a relação estrutura-ação antimicrobiana, encontrar compostos peptídicos mais potentes e/ou seletivos contra os microorganismos e/ou menos suscetíveis à força iônica do meio e/ou menos hemolíticos e/ou mais estáveis em meios fisiológico. Invariavelmente, o objetivo final destes estudos é desenvolver novos agentes farmacológicos ou antibióticos (YEAMAN; YOUNT, 2003; MIRANDA et al.; NO PRELO).

Estudos realizados com peptídeos antimicrobianos que assumem estrutura em α -hélice indicam que existem pelo menos 7 parâmetros que podem influenciar a potência e o espectro de atividade de um composto deste tipo: tamanho, seqüência, grau de estruturação (% de α -hélice), carga líquida, hidrofobicidade, anfipaticidade e espessura da hélice formada (TOSSI et al., 2000). A modulação destas características tem sido considerada no desenho de análogos e correlação entre mecanismos de ação de AMPs, tais como

cecropina, apidecina, taquiplesinas, polifemusinas, magainina, fragmento precursor da caeruleina e PGLa2 (MALOY; KARI; 1995; TAM et al., 2001).

Fica evidente, portanto, que da mesma forma que para outros peptídeos biologicamente ativos, a síntese de peptídeos tornou-se uma ferramenta essencial à geração de conhecimento relativo aos peptídeos antimicrobianos (FOGAÇA et al., 1999; SFORÇA et al., 2005; FAZIO et al., 2006; MACHADO et al., 2007). A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é o método mais empregado para a obtenção do peptídeo nativo e dos seus análogos, já que ela permite a inserção de D-aminoácidos e aminoácidos não usuais nas seqüências, além de ciclizações que levem à restrição conformacional (KIYOTA et al., 2003; MACHADO et al., 2004).

1.7. Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)

a) Passo a passo

O fundamento básico da metodologia da SPFS é o uso de um suporte polimérico ao qual se ligam sequencialmente os aminoácidos de um peptídeo desejado na direção C → N terminal (MERRIFIELD, 1997; ALBERICIO, 2004). Resumidamente, um derivado de aminoácido (protegido no grupo α -amina e na sua cadeia lateral reativa) correspondente ao resíduo C-terminal do peptídeo de interesse é ligado a um suporte sólido insólvel ou resina via uma ligação covalente (**acilação**). Em seguida, a aminoacil-resina tem o protetor do grupo α -amina removido para liberar este grupo (**desproteção**) e, se necessário, a aminoacil-resina formada é neutralizada. Um outro derivado de aminoácido pré-ativado ou ativado *in situ* na sua carboxila α por um reagente químico é acoplado à aminoacil-resina (**acoplamento**). As desproteções e os acoplamentos se repetem até se completar a seqüência desejada. Finalmente, a peptidil-resina é clivada da resina para obter o peptídeo com a sua carboxila terminal livre ou amidada (**clivagem da resina**) totalmente desprotegido (**desproteção total**) (BORGIA; FIELDS, 2000; BENOITON, 2005; **Figura 2**). Os peptídeos brutos obtidos deverão ser purificados e devidamente caracterizados.

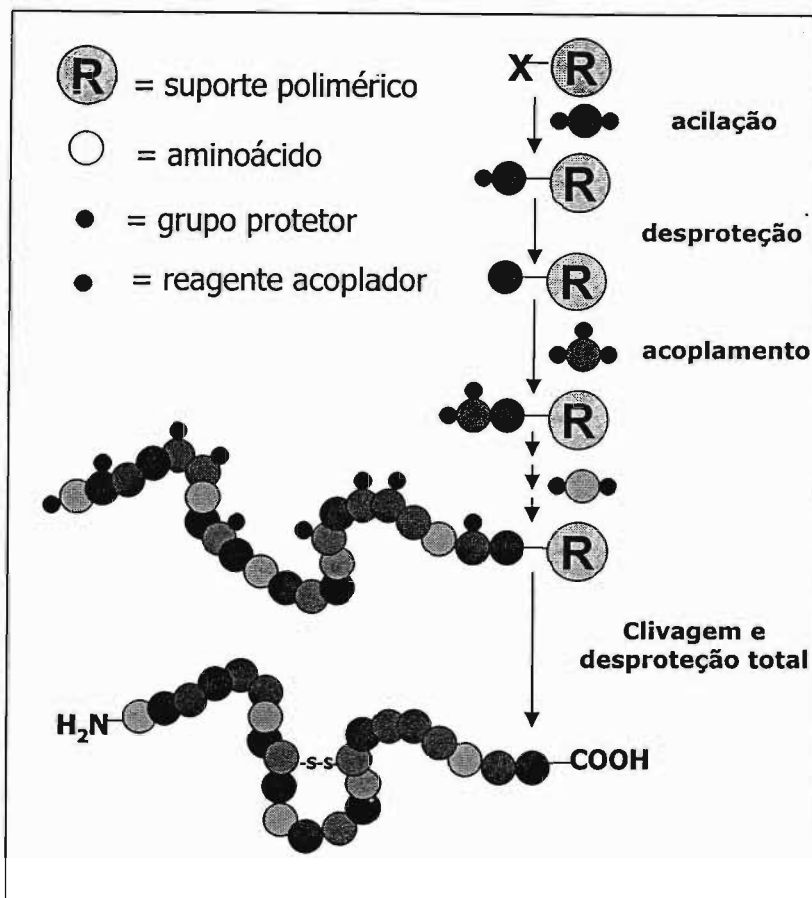


Figura 2: Síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo

A SPFS passo a passo mostra-se vantajosa em relação à síntese clássica em solução devido à sua simplicidade e rapidez, já que ela dispensa o isolamento e a caracterização dos produtos de cada etapa sintética (MERRIFIELD, 1997; ALBERICIO, 2004). Sendo o suporte polimérico insolúvel em todos os solventes orgânicos usados, o peptídeo em crescimento também se torna insolúvel sendo facilmente filtrável e separado do meio reacional. Assim, as reações de acoplamento podem ser realizadas em presença de excesso molar de aminoácidos protegidos. As lavagens minuciosas com grandes volumes de solventes podem remover os excessos de reagentes e os produtos solúveis eficientemente, possibilitando uma purificação rápida parcial em cada etapa do processo (MERRIFIELD, 1997).

Apesar da sua popularidade, versatilidade e rapidez, a SPFS passo a passo apresenta problemas que são inerentes a ela: 1) a ocorrência de enantiomerização do

aminoácido que está sendo incorporado na seqüência provocada pela necessidade de ativar a sua carboxila α em meio básico (FUJIWARA et al., 1994); 2) a ocorrência de reações químicas envolvendo as cadeias laterais dos aminoácidos presentes na seqüência em construção que levam a subprodutos contaminantes (BODANSZKY, 1979; STEWART; YOUNG, 1984; MERRIFIELD, 1997); 3) a ocorrência de aminoacilações incompletas devido à formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias em crescimento ligados à resina (agregação; MILTON et al.; 1990; HYDE et al., 1994). Estes problemas fazem com que a SPFS passo a passo de seqüências agregantes, de peptídeos longos e de pequenas proteínas seja muito difícil e leve a rendimentos baixíssimos. Por essa razão, existem centenas de laboratórios ao redor do mundo, incluindo o nosso, realizando pesquisas relacionadas aos diferentes aspectos e problemas dessa importante metodologia (ALBERICIO, 2004; NAKAIE et al., 2007; PROTI; MIRANDA, 2007; REMUZGO et al., 2008).

A SPFS pode ser realizada manual ou automaticamente de forma individual ou múltipla usando a estratégia *tert*-butiloxicarbonil (Boc) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Estas duas estratégias estão baseadas no sistema de proteção ortogonal em que se usam duas ou mais classes de grupos protetores estáveis ou lábeis nas diferentes condições reacionais empregadas (ALEWOOD et al., 1997; BENOITON, 2005).

Na primeira estratégia, o Boc protetor do grupo α -amina é estável a base e nucleófilos e lábil a ácidos orgânicos (geralmente TFA; BARANY; MERRIFIELD, 1979). A clivagem do peptídeo da resina e a remoção dos protetores de cadeia lateral de aminoácidos derivados do benzil, estáveis a TFA, são realizadas usando HF a 0°C ou TFMSA a 25°C na presença de reagentes captadores dos carbocátions formados ("scavengers") (STEWART; YOUNG, 1984; BENOITON, 2005; **Figura 3A**). Na segunda estratégia, o Fmoc protetor do grupo α -amina (protetor temporário) é removido com base (usualmente piperidina) e a clivagem do peptídeo da resina e remoção simultânea dos protetores de cadeia lateral derivados do *t*-butil (protetores permanentes) são realizados usando TFA a 25°C (ATHERTON; SHEPPARD, 1989; BENOITON, 2005; **Figura 3B**).

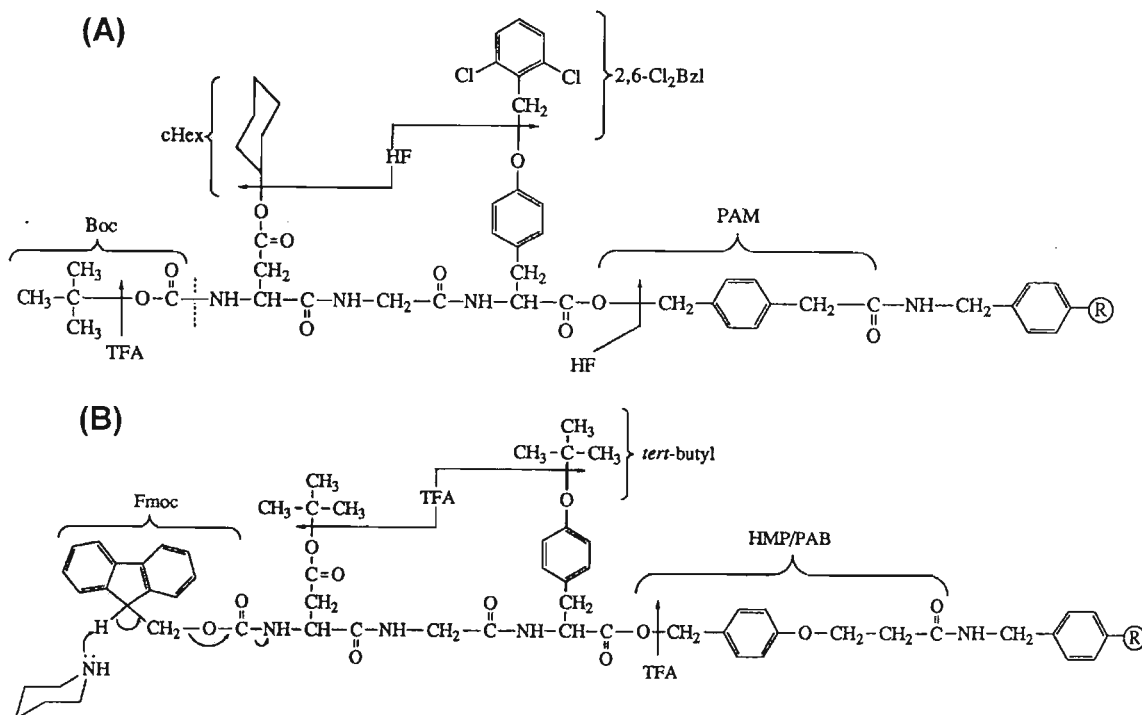


Figura 3: Esquema de proteção das estratégias Boc/Bzl (A) e Fmoc/t-Bu (B) (extraído de Fields et al., 1992).

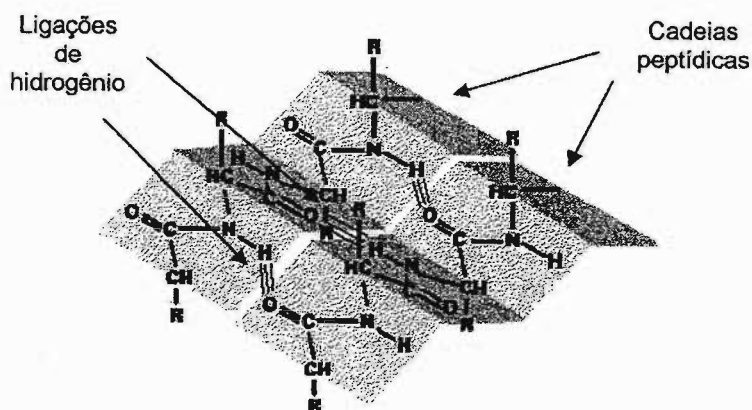
b) Agregação na síntese de peptídeos

As seqüências que apresentam este problema são chamadas de seqüências agregantes ou “difficult sequences” e são reconhecidas pelas seguintes características (MILTON et al., 1990):

1. Repetitivas aminoacilações (ou reações de acoplamento) incompletas.
2. Melhoramento limitado após reacoplamentos ou acetilações.
3. 1 e 2 independentemente do tipo de resina ou estratégia química empregadas.
4. 1 e 2 agravados em resinas altamente substituídas ou pela presença de aminoácidos estericamente impedidos na seqüência.
5. Intumescimento reduzido da peptidil-resina em crescimento.
6. Fraca ou nenhuma correlação com a natureza do resíduo N-terminal da peptidil-resina em crescimento.

A agregação é, portanto, dependente da seqüência peptídica, sendo produto da formação de folhas β entre as cadeias peptídicas em crescimento. Este fenômeno

compromete a difusão dos reagentes aos sítios reativos da peptidil-resina podendo impedir a continuação da síntese ou provocar a formação de subprodutos deletados em um ou em vários aminoácidos, os quais dificultam enormemente a purificação do peptídeo desejado (ZINIERIS et al., 2006; BACSA et al., 2008). Segue abaixo uma representação deste tipo de agregado.



Inúmeros esforços têm sido feitos para contornar este problema. Como nos primórdios da SPFS passo a passo empregava-se quase exclusivamente o DCM como solvente, se tentou substituí-lo por outros solventes polares apróticos com propriedades de aceptor de hidrogênios, tais como DMF, dimetilacetamida, NMP e DMSO, para maximizar a solvatação da peptidil-resina em crescimento e reduzir a rigidez das estruturas em folhas β (BAGLEY et al., 1990). A mistura 20% TFE/DCM usada no estudo do peptídeo modelo KKKKKEEELLW(Nps)F fez aumentar o rendimento do acoplamento do derivado de Lys para 99,7%, pois nela a peptidil-resina teve intumescimento 2 vezes maior do que em DCM (YAMASHIRO et al., 1976). A mistura 10% HFIP/DCM, que se mostrou melhor do que o DMSO na solubilização de peptídeos que possuem folhas β na sua estrutura (NARITA et al., 1988), foi utilizada com sucesso na síntese de um análogo do peptídeo precursor do fator liberador da gonadotropina (MILTON et al., 1992).

Posteriormente, vários estudos foram realizados para entender a correlação entre as propriedades do solvente e a solvatação das peptidil-resinas na síntese de seqüências agregantes. Usando como modelo o tridecapeptídeo [Lys₉]- α -conotoxina G I de *Conus*

geographus a correlação foi estudada, tendo sido demonstrado que a solvatação da peptidil- (copoliestireno/1% divinilbenzeno) era dependente da seqüência peptídica em crescimento e do tipo de grupo protetor de cadeia lateral empregado (FIELDS; FIELDS, 1991).

A agregação também foi minimizada usando misturas de solventes formada por componentes polares e apolares, tais como 20% TFE/DCM e 35% THF/NMP (FIELDS, FIELDS, 1991).

Outros estudos correlacionaram as propriedades do solvente e a solvatação das peptidil-resinas derivadas dos fragmentos VVLGAAIV da proteína carregadora de acila e ING da proteína H-2K, respectivamente, à quantidade total de grupos NH electrofílicos e C=O nucleofílicos [mediante a somatória dos números de aceptores (AN) e doadores (DN) de elétrons; CILLI et al., 1996]. Foi encontrado que a melhora nos acoplamentos tem a ver com a mobilidade da cadeia em crescimento, o que é determinado pelo intumescimento da peptidil-resina (CILLI et al., 1999).

Outra variável estudada que parecia influenciar a agregação é a neutralização do grupamento α -amina durante a síntese via estratégia Boc, pois era sabido que o fenômeno ocorre quando o grupamento α -amino está desprotonado. Por isso, foram sugeridos protocolos de neutralização *in situ* do grupamento α -amina que minimizam a agregação (SCHNÖELZER et al., 1992). Através de estudos sistemáticos o nosso grupo propôs o uso de protocolos específicos a 60°C para agilizar e aumentar a eficiência das reações de todas as etapas da SPFS passo a passo de seqüências agregantes (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2002; 2004; LOFFREDO et al., 2008; REMUZGO et al., 2008). Recentemente, a irradiação de microondas a 60°C foi usada com sucesso na SPFS passo a passo de seqüências agregantes (BACSA et al., 2008).

O efeito dos sais caotrópicos na solubilização de peptídeos em certos solventes e nas mudanças de conformação de peptídeos por complexação (SEEBACH et al., 1989) já tinha sido observado. Assim, LiCl, LiBr, KSCN, NaClO₄, que desestruturam as folhas β , foram empregados na SPFS passo a passo da seqüência Fmoc-(Ala)₅-Phe, conhecida por

ser muito agregante, sobre as resinas de poliestireno (PS), de poli(N,N-dimetilacrilamida) em "Kieselgur"(PDMAA-KG) e de poli(óxido de etileno) em poliestireno (PEO-PS) em vários sistemas de solventes. Os resultados indicaram que os sais de lítio incrementaram o inchamento das peptidil-resinas melhorando os rendimentos das reações (THALER et al., 1991).

Como o polietilenoglicol (PEG) havia se mostrado interessante na síntese de seqüências agregantes em solução graças a sua capacidade de atuar como grupo protetor da carboxila α , ele foi incorporado na resina de poliestireno para dar origem à resina PEG-PS que apresenta bom inchamento em solventes próticos (MERRIFIELD, 1995). Posteriormente, outras resinas baseadas no uso do PEG foram desenvolvidas, tais como Tentagel® (que também possui poliestireno na sua estrutura), CLEAR® (não possui poliestireno na sua estrutura; KEMPE; BARANY, 1996) e a ChemMatrix (que também não possui poliestireno na sua estrutura; GARCIA-MARTIN et al., 2006).

A seguir são relatados esforços no sentido de evitar a agregação na SPFS passo a passo através da proteção do hidrogênio do NH da ligação peptídica envolvida na formação das pontes de hidrogênio que levam à estruturação em folha β (BLAAKMEER et al., 1991, JOHNSON et al., 1993, WÖHR et al., 1996).

c) O uso de protetores do grupo NH do esqueleto peptídico para evitar agregação na SPFS

No início dos anos 80 foi proposta tal idéia (NARITA et al., 1984; ECKERT et al., 1986). O primeiro trabalho descrito refere-se ao estudo conformacional em solução de oligoleucinas e análogos contendo Pro e (Dmb)Gly-Leu usando espectroscopia de infravermelho, que mostrou que em solventes inertes (como CCl_4 e tolueno) ocorreu estruturação em folha β e em solventes polares como THF e MeOH os peptídeos se comportaram de forma randômica (NARITA et al., 1984). Posteriormente, foi descrita a síntese em solução do fragmento 24-31 da β -endorfina humana (KNAYKKGE) usando o

grupo ferrocenilmetil (FEM) (caracterizado por ser altamente lipofílico; ECKERT et al., 1986) como protetor dos N-H das ligações peptídicas envolvendo Asn e Gly.

A aplicação dessa idéia na SPFS usando discos de celulose ocorreu em 1992, quando metiloximetil (Mom), benziloximetil (Bom), etiloximetil (Etm) e feniltiometil (Ptm) foram usados para exercer o mesmo papel na síntese via estratégia Fmoc da conhecida seqüência agregante (Ala)₁₃. O Ptm se mostrou o mais eficiente para contornar o problema da agregação (BARTL et al., 1992). Nesse mesmo ano, foi descrito que a incorporação de sarcosina (N-metilglicina) na SPFS da oligo(Ala)-Val evitava a agregação intercadeias produzindo um efeito de longo alcance (4 resíduos; BEDFORD et al., 1992).

Em 1993, foi descrito o uso do 2-hidroxi-4-metoxibenzil (Hmb) na SPFS usando a estratégia Fmoc das seqüências agregantes como o fragmento 65-74 da proteína carregadora de acila e o peptídeo (Ala)₁₇-Val-OH (JOHNSON et al., 1993). Foi observado um efeito de longo alcance (6 resíduos) durante estas sínteses, o que tornaria flexível a escolha da posição do aminoácido N^α-substituído (JOHNSON et al., 1993) desde que eles não fossem β-ramificados (HYDE et al., 1994). Sínteses dos tridecapeptídeos relacionados às proteínas TAT do HIV2 e miosina 1 de *Arabidopsis thaliana*, assim como a uma seqüência de 24 resíduos relacionada à proteína amilóide, foram realizadas utilizando a mesma abordagem experimental para fornecer produtos brutos de boa qualidade (HYDE et al., 1994).

Sendo o uso de Hmb restrito à estratégia Fmoc, foi desenhado o grupo 2-hidroxibenzil (Hbz), que é estável ao TFA e lábil ao TFMSA e pode ser utilizado tanto na estratégia Fmoc quanto na Boc. De fato, a síntese do fragmento 65-74 da proteína carregadora de acila usando a Fmoc-(Hbz)Ala-OH foi realizada com sucesso (JOHNSON; QUIBELL., 1994). Posteriormente, outros protetores de N-H de ligações peptídicas foram testados na síntese de Fmoc-(X)Ala-Gly-Val-resin ou Fmoc-Ala-(X)Gly-Val-resin, sendo X = 5-metilfurfuril, 5-metiltienilmetil, 5-metoxitienilmetil, 3-metoxitienilmetil, 2,4-dimetoxibenzil (Dmb) ou 2,4,6-trimetoxibenzil (Tmb). O Tmb foi o que levou aos maiores rendimentos de acoplamento (90%, JOHNSON et al., 1995).

Em 2000, foi descrito o uso do 2-hidroxi-6-nitrobenzil (Hnb), que pode ser incorporado mais facilmente do que o Hmb e removido por fotólise (MIRANDA et al., 2000). Recentemente, foram relatados os usos de derivados de oxazolidina e tiazolidina (que apresentam uma conformação similar à da Pro, e por isso, foram chamados de pseudoprolinas) nas sínteses de sequências agregantes (WOHR et al., 1996; GARCIA-MARTIN et al., 2006).

O Hmb é o protetor mais utilizado para evitar a agregação em SPFS. Com ele, foram sintetizadas várias “difficult sequences”, tais como: fragmento 368-379 da “aggrecan”, fragmento 985-1004 da subunidade α_{1E-3} do canal de cálcio humano (SIMMONDS, 1996), fragmento 1-40 do peptídeo A β (CLIPPINGDALE et al., 1999), fragmento 106-126 da proteína prion humana (JOBBLING et al., 1999). Embora menos usado que o Hmb, o Dmb tem levado à algumas sínteses bem sucedidas (ZAHARIEV et al., 2005). Por outro lado, as pseudoprolinas têm se mostrado superiores ao Hmb; infelizmente, porém, o seu uso é restrito a sequências que apresentam Ser, Thr ou Cys na sequência (SAMPSON et al., 1999; GARCIA-MARTIN et al., 2006).

d) O uso da espectroscopia Raman e a agregação na síntese em fase sólida de peptídeos

Várias técnicas espectroscópicas tem servido aos químicos de peptídeos para a identificação de sequências agregantes. Dentre elas podemos citar, as ressonância paramagnética eletrônica (EPR, CILLI et al., 1999), ressonância magnética nuclear com rotação no ângulo mágico (MAS-NMR, DHALLUIN et al., 1997), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, HENKEL; BAYER, 1998) e espectroscopia Raman com transformada de Fourier (NIR-FT-Raman, LARSEN et al., 1993; RYTTERSGARD et al., 1997). Infelizmente, as outras técnicas espectroscópicas não são aplicáveis ao estudo peptidil-resinas e não permitem a reutilização de amostras.

A NIR-FT-Raman dispensa a preparação prévia de pastilhas e não danifica a amostra, tendo sido usada anteriormente para realizar monitoramento da síntese individual de peptídeos em resinas PepSynGel® e Tentagel® (LARSEN et al., 1993; RYTTERSGARD et al., 1997), ou na síntese combinatória de compostos orgânicos e peptídeos na resina (RAHMAN et al., 1998; YAN et al., 1999). Esta técnica espectroscópica se baseia no efeito Raman descoberto por C.V. Raman e K.S. Krishnan em 1928, o qual consiste na ocorrência de um tênue fenômeno de espalhamento devido às colisões inelásticas produzidas entre os fótons de luz incidente e as moléculas da substância irradiada, de tal modo que as energias dos fótons espalhados são aumentadas ou diminuídas em relação à energia dos fótons da luz incidente. Assim, os fótons espalhados inelasticamente proporcionam informações sob as vibrações moleculares, as quais são sensíveis a características da simetria molecular, bem como às peculiaridades do ambiente químico circundante às moléculas estudadas (RAMAN; KRISHNAN, 1928, COLTHUP et al., 1990).

e) SPFS convergente de peptídeos em fase sólida (SCPFS)

Muitas vezes durante a SPFS passo a passo ocorrem problemas, tais como os que foram citados anteriormente, que podem se agravar dependendo do tamanho e seqüência do peptídeo-alvo. Assim, a SCPFS foi concebida como uma possibilidade de solução desses problemas (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997). Esta metodologia consiste na síntese de fragmentos peptídicos protegidos pertencentes à seqüência do peptídeo-alvo que serão acoplados sequencialmente a um fragmento já ligado à resina (**Figura 4**).

Para o sucesso da SCPFS é necessário considerar vários aspectos como: estratégia química, grupos protetores, tamanho dos fragmentos protegidos, resíduo C-terminal do fragmento e suporte a ser usado (ALBERICIO et al., 1997; REMUZGO, 2003).

Tipo de resina e/ou espaçadores: É necessário saber que estratégia se vai utilizar para escolher o tipo de resina. Atualmente, existem vários tipos de resinas que permitem a obtenção de fragmentos peptídicos com carboxila livre (LLOYD-WILLIAMS et al., 1993;

ALBERICIO et al., 1997). É o caso da resina oxima de Kaiser (DeGrado e Kaiser, 1980), resina 2-clorotritil (BARLOS et al., 1989), resina 3-nitro-4-bromometilbenzilidrilamido-poliestireno (Nbb, GIRALT et al., 1982), etc. Também são descritos vários espaçadores que conectam o peptídeo a ser sintetizado ao suporte polimérico como: ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxiacético (HMPA, SHEPPARD; WILLIAMS, 1982) e ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)butírico (HMPB, RINIKER et al., 1993).

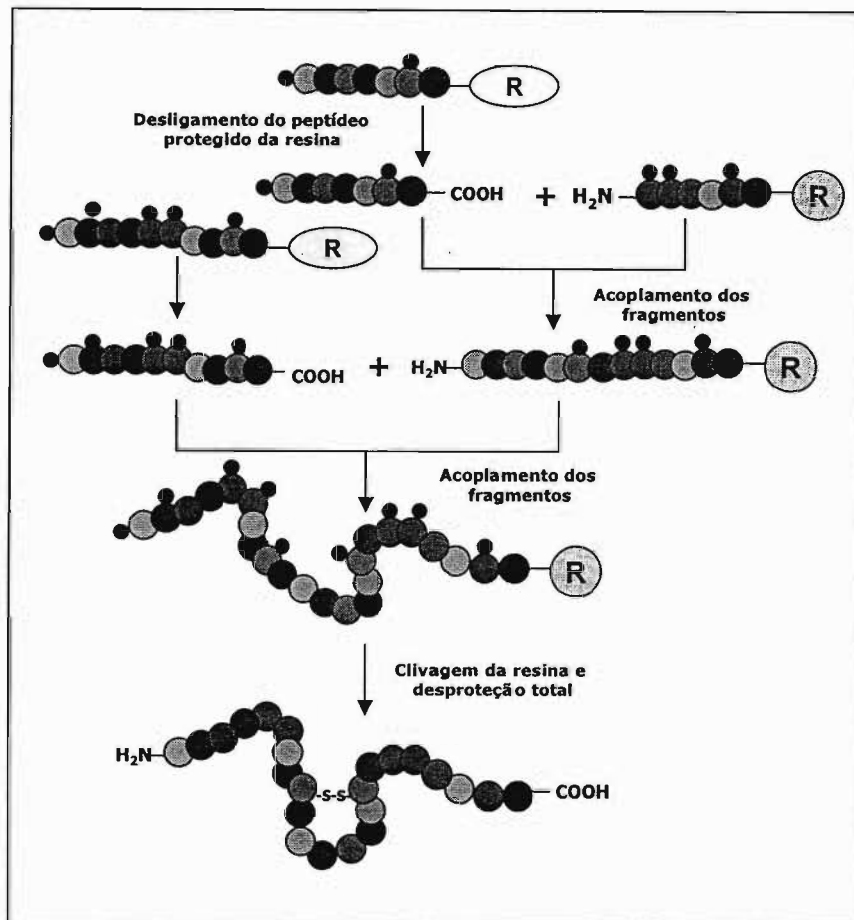


Figura 4: Síntese convergente de peptídeos em fase sólida (SCPFS)

Resíduo C-terminal dos fragmentos: Durante a ativação química do resíduo C-terminal do fragmento doador de acila existe a possibilidade de este aminoácido sofrer enantiomerização (BENZ, 1994). Por isso, os fragmentos doadores de acila geralmente contêm a Gly ou a Pro como aminoácidos C-terminais (ALBERICIO et al., 1997, BORGIA;

FIELDS, 2000). Se a seqüência não contém estes aminoácidos, deve-se escolher o aminoácido que possua a menor cadeia lateral não funcionalizada (BENZ, 1994).

Tamanho do fragmento: Se insolúveis, os fragmentos protegidos não são acoplados com sucesso. No geral, quanto maior for o fragmento protegido, menor é a sua solubilidade nos solventes orgânicos comumente empregados na SCPFS. Talvez por isso, existem poucos exemplos de acoplamentos bem sucedidos usando fragmentos de mais de 15 resíduos (GISIN et al., 1969; 1981; KAISER et al., 1989; KUBIAK et al., 1987). É sabido que o uso de protetores de N-H de ligações peptídicas ou de pseudoprolinas como grupos protetores da Ser, Thr e Cys (WÖHR et al., 1996) facilitam a solubilização dos fragmentos em solventes de media e alta polaridade.

No geral, os acoplamentos entre fragmentos são bem mais demorados que os acoplamentos entre aminoácidos. Assim, algumas abordagens experimentais têm sido propostas e empregadas com sucesso, tais como: a abordagem chamada "volume de inchamento" (RINNOVA et al., 1999), o uso da mistura clorofórmio:fenol (3:1, v/v) como solvente e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazol (HODhbt) como agentes ativadores (MIHALA et al., 2001) e o uso de temperatura alta (60 °C) nos acoplamentos (REMUZGO, 2003).

Algumas seqüências agregantes foram sintetizadas utilizando a SCPFS. São os casos (i) do fator inibitório de migração de macrófagos de camundongo (mMIF) utilizando a estratégia Fmoc e TBTU/DIPEA como reagentes acopladores (KAISER; WOLFGANG, 1997), (ii) dos peptídeos β -amilóides usando a mistura clorofórmio e fenol (3/1, v/v; INUI et al., 2001) e (iii) da metodologia usada pela Roche na preparação comercial do Fuzeon®, inibidor de fusão do HIV (BRAY, 2003).

2. OBJETIVOS

Diante da importância biológica das proteínas e dos peptídeos ricos em Gly e da escassez de informação sobre as suas sínteses, estruturas, relações estrutura-atividade e modos de ação, realizamos o presente trabalho que objetivou:

- 1) Estudar a relação estrutura-atividade antifúngica e modo de ação da cheferina I (*Chef I*), AMP rico em Gly de origem vegetal;
- 2) Estudar a SPFS de fragmentos da acantoscurreina, uma GRP de origem animal com ação antimicrobiana.

Para tanto, teríamos que:

- a. Sintetizar, purificar e caracterizar quimicamente a *Chef I* e análogos;
- b. Determinar a atividade antibacteriana e antifúngica da *Chef I* e análogos sintéticos;
- c. Investigar as propriedades de *Chef I* e do análogo mais e/ou igualmente potente, tais como atividade hemolítica, capacidade de permeabilizar células de fungos e atividade fungicida;
- d. Determinar o efeito da força iônica e do Zn^{2+} sobre a atividade antifúngica da *Chef I* e/ou análogo(s);
- e. Marcar quimicamente a *Chef I* e o análogo mais e/ou igualmente potente para acompanhar a sua possível internalização na célula microbiana;
- f. Caso ocorresse a internalização do análogo marcado, examinar a influência da temperatura e da força iônica no processo, bem como a demanda por energia celular;
- g. Sintetizar os fragmentos N- e C- terminais e a porção central repetitiva da acantoscurreina;
- h. Monitorar o processo sintético através de análises das peptidil-resinas em crescimento por teste de ninidrina, determinação de seus graus de substituição e espectroscopia NIR-FT-Raman.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Resinas

Os suportes poliméricos e aminoacil-resinas utilizadas nas sínteses dos peptídeos foram os seguintes: resina 4-metilbenzilhidrilamina (MBHA, 0,67 mmol/g) e Boc-His(Tos)-resina fenilacetamidometila (PAM, 0,69 mmol/g), baseadas no copolímero de poliestireno e divinilbenzeno e obtidas da Bachem Califórnia, Inc., EUA; resina CLEAR amida (0,35 mmol/g) e Fmoc-Gly-CLEAR ácida (0,48 mmol/g), baseadas no polietilenoglicol formado por ligações cruzadas de acrilato e etoxilato e obtidas da Peptide International, Inc., EUA. Todas elas foram de 100 a 200 mesh.

3.2. Derivados de aminoácidos

Os derivados de aminoácidos utilizados nas sínteses foram os seguintes:

Boc-Gly-OH, Boc-Tyr(2BrZ)-OH, Boc-His(Tos)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Tyr(But)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Val-OH. Eles foram adquiridos da Bachem Califórnia, Inc., EUA e da Novabiochem (EUA).

3.3. Reagentes ativadores do grupo carboxila dos derivados de aminoácidos ou reagentes acopladores

Os TBTU e BOP foram adquiridos, da Advanced Chemtech (EUA), o HATU da Millipore, Inc. (EUA), e os HOBt, DIC e EDC da Sigma Chemical Co. (EUA).

3.4. Solventes e outros reagentes

O anisol, m-cresol, TFA, TEA, piperidina, DIPEA, DMAP/DMF, NMP, ácido pícrico, TIS, DBU, TFE, HFIP, Triton X-100, carbonato de etila e anidrido acético empregados eram

de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou da Applied Biosystems (EUA) e foram empregados sem purificação prévia.

Os sais caotrópicos NaClO_4 e LiCl eram de grau analítico e proveniente da LABSYNTH Produtos para Laboratório Ltda (São Paulo, Brasil).

O HF era proveniente da Quirios Produtos Químicos Ltda (São Paulo, Brasil). O sistema ao qual o cilindro for conectado era da Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japão).

Os solventes empregados nas sínteses dos peptídeos DCM, DMF, MeOH seco (máximo 0,005 % de água), isopropanol, etanol 96% extrapuro, éter diisopropílico, DMSO, tolueno e THF eram procedentes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA) ou da Applied Biosystem (EUA). Todos eram de grau analítico ou de síntese, tendo sido empregados sem qualquer tratamento prévio.

Para o monitoramento dos acoplamentos por meio do teste de Kaiser ou de ninidrina (KAISER et al. 1970) foram empregadas as misturas comerciais [Applied Biosystems, EUA]: fenol/etanol 76% (v/v) (monitor 1), cianeto de potássio/piridina 0,0002 M (monitor 2), ninidrina/etanol 0,28 M (monitor 3)] de grau síntese.

As hidrólises ácidas das peptidil-resinas foram realizadas em presença da mistura HCl fumegante 37% (Merck KGaA, Alemanha)/ácido propiônico 99% (1:1, v:v; Aldrich Chemical Co., EUA). As hidrólises ácidas dos peptídeos purificados foram realizadas em presença de HCl 6N (Sigma Chemical Co., EUA).

Na preparação dos eluentes para RP-HPLC e LC/ESI-MS foram utilizados ACN (Vetec Química Fina Ltda., Brasil) e TFA (Merck KGaA, Alemanha) de grau espectroscópico.

A 5(6)-carboxifluoresceína utilizada para a marcação dos peptídeos foi obtida da Novabiochem, EUA.

Nos ensaios de permeabilidade celular foi utilizado o "kit" de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD Bac Light (Molecular Probes, Invitrogen, Inc., EUA). Nos experimentos de microscopia de fluorescência, microscopia confocal de varredura a laser e citometria de

fluxo foram utilizados os marcadores fluorescentes Mitotracker orange CMTMRos e iodeto de propídeo adquiridos da Molecular Probes, Invitrogen, Inc., EUA.

3.5. Microorganismos

Bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* SBS 363, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, *Enterobacter cloacae* K12

Bactérias Gram positivas: *Micrococcus luteus* A270, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Serratia marcescens* CDC 4124.

Fungos: *Candida albicans* MDM8, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida albicans* HU168 resistente a fluconazol, *Candida tropicalis* Squibb 1600, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Aspergillus fumigatus* NCPF 2109, *Aspergillus flavus* NCPF 2109.

3.6. Síntese manual das peptidil-resinas

Os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida (SPFS) em temperatura alta (60 °C, MIRANDA et al., 1993; VARANDA; MIRANDA, 1997; SOUZA et al., 2004; REMUZGO, 2008) utilizando a estratégia *tert*-butiloxicarbonil/benzil (Boc/Bzl, STEWART; YOUNG, 1984) ou 9-fluorenilmetiloxicarbonil/*tert*-butil (Fmoc/But, ATHERTON; SHEPPARD, 1989) e um frasco jaquetado acoplado a um banho de circulação de água da PolyScience, modelo 8001.

a) Procedimento geral para a síntese das peptidil-MBHA e peptidil-PAM

No caso da resina MBHA, esta foi lavada seqüencialmente com DCM, MeOH, DCM, TEA, DCM, MeOH, DCM e submetida a um teste de ninidrina (o qual se mostrou positivo, já que a resina MBHA apresenta um grupo amino livre). As etapas de desproteção, lavagem, neutralização e acoplamento na resina MBHA ou na aminoacil-resina Boc-His(Tos)-PAM foram realizados segundo o protocolo descrito na **Tabela 1**. Introduzido o último derivado de aminoácido (N-terminal da seqüência), a N α -Boc-peptidil-resina foi seca sob vácuo,

caracterizada e estocada a 4°C.

Tabela 1: Protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo em temperatura elevada (60°C) usando a estratégia *t*-Boc

Etapa de desproteção	Etapa de acoplamento
Solução 50% TFA/tolueno por 10 min.	Boc-aminoácido (2,5 vezes de excesso) + HOBt + 1M DIC/DCM ou TBTU + DIPEA em 25% DMSO/tolueno por 30 min.
Lavagem pós-desproteção	Lavagem pós-acoplamento
1% anisol/isopropanol	25% DMSO/tolueno
25% DMSO/tolueno	MeOH
10% TEA/tolueno	tolueno
25% DMSO/tolueno	MeOH
MeOH	Tolueno
tolueno	Teste de ninidrina
Teste de ninidrina	

b) Procedimento geral para a síntese das peptidil-Rink amida

Inicialmente, a resina foi submetida à desproteção do Fmoc usando uma solução de 20% piperidina/DMF por 5 minutos. Em seguida, a resina foi lavada com lavada com 25% DMSO/tolueno, MeOH, 25% DMSO/tolueno, MeOH, 25% DSMO/tolueno e submetida a um teste de ninidrina. As etapas de desproteção, lavagem e acoplamento foram realizados segundo o protocolo descrito na **Tabela 2**. Introduzido o último derivado de aminoácido (N-terminal da seqüência), a $N\alpha$ -Fmoc-peptidil-Rink amida foi seca sob vácuo, caracterizada e estocada a 4°C.

c) Procedimento geral para a síntese das peptidil-CLEAR ácida e amida

A resina CLEAR amida foi submetida à desproteção do Fmoc em 20% piperidina/NMP por 5 minutos. Em seguida, ela foi lavada com 20% DMSO/NMP e submetida a um teste de ninidrina. As etapas de desproteção, lavagem e acoplamento na resina CLEAR amida ou na aminoacil-resina Fmoc-Gly-CLEAR ácida foram realizados segundo o protocolo descrito na **Tabela 3**. Introduzido o último derivado de aminoácido (N-terminal da seqüência), a $N\alpha$ -Fmoc-peptidil-CLEAR amida ou ácida foi seca sob vácuo,

caracterizada e estocada a 4°C.

Tabela 2: Protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo na resina Rink amida em temperatura elevada (60°C)

Etapa de desproteção Solução 20% piperidina/DMF por 5 min.	Etapa de acoplamento Fmoc-aminoácido (2,5 vezes de excesso) + HOBt + 1M DIC/DCM ou TBTU + DIPEA em 25% DMSO/tolueno por 30 min.
Lavagem pós-desproteção 25% DMSO/tolueno MeOH 25% DMSO/tolueno MeOH tolueno Teste de ninidrina	Lavagem pós-acoplamento 25% DMSO/tolueno MeOH 25% DMSO/tolueno MeOH tolueno Teste de ninidrina

Tabela 3: Protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo na resina CLEAR ácida ou amida em temperatura elevada (60°C)

Etapa de desproteção Solução 20% piperidina/NMP por 5 min.	Etapa de acoplamento Fmoc-aminoácido (2,5 vezes de excesso) + HOBt + 1M DIC/DCM ou TBTU + DIPEA em 20% DMSO/NMP até cobrir a resina por 30 min.
Lavagem pós-desproteção 20% DMSO/NMP Teste de ninidrina	Lavagem pós-acoplamento 20% DMSO/NMP Teste de ninidrina

d) Procedimento geral para a síntese das peptidil-HMPB-CLEAR amida

Acoplamento do linker HMPB na resina CLEAR amida

O linker ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butírico (HMPB) foi acoplado na resina CLEAR amida como se fosse um simples derivado de aminoácido. Para isso, a um frasco que continha 700 mg de resina CLEAR amida, foram adicionados 2,5 equivalentes de

HMPB (200 mg), HOBt (114 mg), DIC (0,84 mL) e 20% DMSO/NMP. A mistura reacional foi deixada para reagir por 30 minutos. Passado este tempo foram feitas lavagens da resina com DCM e teste de ninidrina. Quando necessário foi feita reação de reacoplamento do linker HMPB à resina.

Aminoacilação da HMPB-CLEAR amida

Num frasco que continha 1 equivalente de HMPB-CLEAR amida (700 mg) foram adicionados 2,5 equivalentes de Fmoc-aminoácido, DIC e HOBt dissolvidos em 0,25 equivalentes de DMAP e volume de DMF necessário para cobrir a resina. A mistura foi deixada para reagir por 4 h. Passado este tempo, ela foi filtrada num funil de placa sinterizada e lavada com DMF. Para garantir o acoplamento do primeiro aminoácido foi realizado um reacoplamento por 3 horas.

Posteriormente, a aminoacil-HMPB-resina CLEAR amida foi seca sob vácuo e alíquotas dela foram utilizadas para obter o grau de aminoacilação utilizando os dados obtidos na análise de aminoácidos (item 3.11.b.)

Alongamento da cadeia peptídica

O alongamento do peptídeo foi feito conforme descrito na **Tabela 3**. Foram realizados reacoplamentos dos Fmoc-aminoácidos sempre que os acoplamentos não foram completos (teste de ninidrina da peptidil-resina negativo). Introduzido o último derivado de aminoácido (N-terminal da seqüência), a N α -Fmoc-peptidil-HMPB-CLEAR amida foi seca sob vácuo, caracterizada e estocada a 4°C.

e) Marcação da cheferina I e seu análogo amidado com 5(6)-carboxifluoresceína

A marcação foi realizada durante o processo sintético. Para isso, 302 mg de Fmoc-peptidilresina-CLEAR amida foram pré-solvatados em 20% DMSO/NMP por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a desproteção do grupo Fmoc em solução 20% piperidina/NMP por 10 minutos. Passado este tempo, a peptidil-resina foi lavada com 20% DMSO/NMP e suspensa nesta mistura de solventes. À ela foram adicionados 5 equivalentes de 5(6)-

carboxifluoresceína (269 mg), BOP (309 mg), HOBt (38 mg) e DIPEA necessária para atingir pH 8-9. A mistura resultante foi deixada para reagir por 2 horas. A peptidil-resina foi separada do meio reacional por filtração e lavada com 20% DMSO/NMP. A reação foi repetida usando as mesmas quantidades citadas acima para garantir a marcação. A peptidil-resina marcada foi separada do meio reacional por filtração, lavada com 20% DMSO/NMP, DCM e seca a vácuo.

3.7. Quantificação de grupamentos α -aminas livres nas peptidil-resinas

A porcentagem de grupamentos aminos livres nas peptidil-resinas foi determinado por meio do teste do ácido pícrico realizado em um frasco de placa porosa (GISIN, 1972) empregando 10 mg de peptidil-resina. A peptidil-resina foi lavada com DCM, solução de 10% de TEA em DCM e DCM. Ao material lavado foi adicionada uma solução 0,15M de ácido pícrico em DCM. A suspensão resultante foi deixada em repouso por 5 minutos. Esta operação foi repetida por mais 4 vezes. Finalmente, o excesso de ácido pícrico foi eliminado com lavagens da resina com etanol e DCM alternadamente, até que a solução de lavagem ficasse incolor. O picrato ligado aos grupamentos aminos livres foi extraído com uma solução 10% de TEA em DCM e DCM. A solução de extração foi coletada num balão e levada a 100 mL com etanol. A concentração de picrato de trietilamônia e, portanto, dos grupos aminos livres foi determinada por leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 358 nm ($\epsilon_{358} = 14\ 500\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$).

3.8. Desproteção total e clivagem dos peptídeos das resinas

a) Estratégia Boc/Bzl (STEWART; YOUNG, 1984; VARANDA; MIRANDA, 1997).

Resumidamente, 300 mg de peptidil-MBHA ou peptidil-PAM e 1 mL de anisol foram colocados em um frasco conectado a um sistema de HF mantido sob alto vácuo. Após resfriamento deste frasco a $-70^{\circ}C$, foram transferidos a ele 10 mL do gás condensado. A

reação ocorreu por 90 minutos a 4°C, quando o HF foi totalmente transferido para um “trap” de CaCO₃. O peptídeo bruto foi então precipitado com éter diisopropílico e filtrado juntamente com a resina. Em seguida, este foi extraído usando uma solução A (0,1% TFA em água) e uma solução B (50% ACN em água contendo 0,09% de TFA). O peptídeo bruto resultante foi liofilizado e o material seco resultante foi pesado.

b) Estratégia Fmoc/But (ATHERTON; SHEPPARD, 1989, MIRANDA et al., 1993)

Resumidamente, 300 mg de peptidil-CLEAR ácida ou amida foram colocados em um tubo Falcon e 3 mL de uma solução de 95% TFA/2,5% TIS/2,5% água foi adicionada. A mistura foi deixada a reagir por 2 - 4h num shaker a 37°C. Terminada a reação, foram adicionados ao meio reacional 10 mL de éter diisopropílico para precipitar o peptídeo. A suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. Posteriormente, o peptídeo bruto foi extraído usando uma solução A (0,1% TFA em água) e uma solução B (50% ACN em água contendo 0,09% de TFA). O peptídeo bruto foi liofilizado e o material seco resultante foi pesado.

3.9. Clivagem dos peptídeos das resinas (BARLOS et al., 1991; PROTI et al., 2007)

Resumidamente, em um frasco foram colocados 400 mg de peptidil-HMPB-CLEAR amida e 4 mL de uma solução de 1% TFA/DCM. A mistura resultante foi deixada para reagir num shaker por 2 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi separado por filtração em um funil de sinterizado. Este procedimento foi repetido por mais 4 vezes. Ao final, os sobrenadantes foram misturados e secos em um rotaevaporador. A peptidil-resina remanescente foi lavada com DCM e MeOH, seca e submetida à hidrólise total para a determinação do seu conteúdo de aminoácidos (porcentagem de desligamento do peptídeo).

3.10. Purificação dos peptídeos brutos

Os peptídeos brutos foram purificados por RP-HPLC utilizando um sistema da Waters modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C₁₈, 10 µm, 300 Å, 2,2 x 25 cm). As condições experimentais empregadas estão resumidas nas **Tabelas 5 e 9** de Resultados e Discussão.

3.11. Análise das peptidil-resinas e peptídeos obtidos

a) Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC; MANT; HODGES, 1991)

As análises foram feitas RP-HPLC utilizando um cromatógrafo da marca Waters, o qual era composto de duas bombas Waters 510, um detector Waters 486, um injetor Rheodyne 7125, um integrador Waters 745B Data Module e uma coluna Vydac C₁₈ analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å).

b) Análise de aminoácidos (SMILLIE; NATTRIS, 1991)

Hidrólise total das peptidil-resinas

As peptidil-resinas (1 mg) foram colocadas frasco específico numa estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore) contendo 600 µl de ácido clorídrico-ácido propiônico (1:1, v/v) a 130°C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram secas utilizando-se uma bomba de alto vácuo acoplada a um dessecador contendo KOH para neutralizar os vapores ácidos.

Hidrólise gasosa de peptídeos

Os peptídeos foram colocados em frasco específico numa estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore) e expostas a vapor proveniente de 150 µL de ácido clorídrico 6N a 110°C por 24 h. Posteriormente, as amostras foram secas utilizando-se uma bomba de alto

vácuo acoplada à estação de trabalho Pico-Tag.

Determinação do conteúdo de aminoácidos

Os hidrolisados foram analisados em um dos seguintes equipamentos:

1) Analisador de aminoácidos da Beckman (“Series 6300 High Performance Amino acid analyzer”) que emprega o método de derivatização pós-coluna. Neste, os aminoácidos livres são separados por HPLC de troca iônica e detectados como produtos de reação com ninidrina (NIN-RX™, Beckman, EUA) a 440 nm e 570 nm.

2) Analisador de aminoácidos da Dionex BioLC® Chromatography System (Dionex, EUA) que emprega um método de detecção por amperometria integrada com detector electroquímico ED50. Neste, os aminoácidos livres são separados também por HPLC de troca iônica utilizando uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm) da Dionex.

c) Espectroscopia Near infrared-Fourier transformed (NIR-FT) Raman

Os espectros foram coletados pelo Dr. Gustavo F. S. Andrade e Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini (Departamento de Química Fundamental do IQ-USP) a partir dos grãos secos das peptidil-resinas em um espectrômetro Raman RFS 100/S da Bruker Optics Inc. equipado com um detector de germânio refrigerado com nitrogênio líquido. Como fonte de excitação foi utilizado um laser Nd/YAG de 1064 nm com uma saída máxima de 200 mW. A configuração do espalhamento do laser foi de 180° (back scattering) e a resolução do espectro foi de 4 cm⁻¹. Foram realizadas um total de 4096 aquisições por amostra. Os espectros foram analisados com o software GRAMS AI da Thermo Galactic Corporation.

d) Análise por RP-HPLC acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS)

Os peptídeos dissolvidos em 0,1% TFA/água foram injetados no equipamento multiusuário do Departamento de Bioquímica (espectrômetro de massas de triplo quadrupolo modelo Quattro II da Micromass com fonte de ionização por electrospray e acoplado a um sistema de RP-HPLC Shimadzu VP Series composto por duas bombas

Shimadzu LC-10AD, um detector Shimadzu SDP-10AV e um injetor Rheodyne 7125). Os espectros obtidos foram analisados com o software MassLynx™ para Windows NT.

3.12. Ensaio biológicos com os peptídeos purificados

a) Atividade antibacteriana

Este tipo de atividade foi determinada segundo o método de ensaio de inibição de crescimento em meio líquido em microplaca (BULET et al.,1993). Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram colocados 90 µl de uma suspensão de bactérias ($Abs_{600\text{ nm}} = 0,001$) em meio bactopectona sem sal (1% de peptona sem NaCl) e 10 µl de água (controle positivo) ou de cada solução de uma série de diluições do peptídeo purificado (1000 – 1,95 µM). Nos poços de controle negativo de meio e água foram colocados 100 µL de meio bactopectona ou água. A placa foi mantida em uma estufa a 30 °C por 18 h sob agitação constante. O crescimento microbiano foi quantificado pelo incremento da absorbância a 595 nm em um leitor de ELISA (Labsystem iEMS Analyser). O valor da MIC corresponde à menor concentração do peptídeo que causa 100 % de inibição do crescimento bacteriano após incubação.

b) Atividade antifúngica na ausência e presença de NaCl e ZnCl₂

Esta foi medida segundo o método de ensaio de inibição de crescimento em meio líquido em microplaca (FEHLBAUM et al.,1994): em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram colocados 10 µL de água destilada, 80 µl de uma suspensão de bactérias ($Abs_{600\text{ nm}} = 0,001$) em caldo batata dextrose (PDB; 1,2 g/L) e 10 µl de água (controle positivo) ou cada solução de uma série de diluições do peptídeo purificado (1000 – 1,95 µM). Nos poços de controle negativo de meio e água foram colocados 100 µL de meio PDB ou água. A placa foi mantida em uma estufa a 30 °C por 24 horas, sem agitação e sob uma atmosfera úmida. O crescimento microbiano foi quantificado pelo incremento da absorbância a 595 nm em um leitor de ELISA (Labsystem iEMS Analyser). O valor da MIC corresponde à

menor concentração do peptídeo que causa 100 % de inibição do crescimento bacteriano após incubação.

O efeito da concentração de sal sobre a atividade antifúngica foi determinada utilizando uma solução de NaCl ao invés de água destilada para obter concentrações finais de 4,2 mM; 8,6 mM; 17,1 mM; 34,2 mM; 68,5 mM e 137,0 mM.

Também foram realizados testes de atividade antifúngica utilizando uma solução de $ZnCl_2$ para obter concentrações finais de 1,0 μM ; 5,0 μM ; 10,0 μM ; 25,0 μM ; 50,0 μM e 100,0 μM .

c) Ação fungicida

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10 μL de água destilada, 80 μl de uma suspensão de bactérias ($Abs_{600\text{ nm}} = 0,001$) em caldo batata dextrose (PDB; 1,2 g/L) e 10 μl de cada solução de uma série de diluições do peptídeo purificado (1000 – 1,95 μM). A placa foi mantida em uma estufa a 30°C por 24 horas, sem agitação e sob uma atmosfera úmida. Passado este tempo, alíquotas (100 μL) das suspensões que apresentaram visualmente uma inibição de crescimento foram usadas para plaqueamento em ágar Sabouraud. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado após incubação em uma estufa a 37° C por 24 h (BULET et al., 1993).

d) Cinética de morte celular

Em sete poços de uma placa de 96 poços foram colocados com 10 μl de *Chef Ia* (5 MIC; 62,5 μM), 10 μL de água e 80 μl de uma suspensão de células de *Candida albicans* MDM8 na fase log de crescimento (concentração final de 1×10^4 células/mL em meio PDB isento de NaCl). Também foram preparados controles para cada uma das sete amostras em outros poços da placa, aos quais foram adicionados 10 μL de água destilada e deionizada estéril ao invés da solução de peptídeo. A placa foi mantida por 4 horas em uma estufa a 30 °C, sob agitação constante. Alíquotas de 10 μL dos controles foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30 min, 1h, 2h e 4h e diluídas (100x, 1000x e 10.000x) em meio PDB. Da mesma forma, alíquotas de 50 μL das amostras correspondentes a cada tempo foram retiradas e

diluídas (5x, 10x ou 80x) em meio PDB. Amostras de 50 µL de cada uma destas diluições foram usadas para plaqueamento em Agar Sabouraud e incubados por 24 h a 37°C foi realizada a contagem das colônias formadas.

e) Ensaio hemolítico (MACHADO et al., 2007)

Amostras de aproximadamente 8 mL de sangue foram coletados de doadores saudáveis em tubos heparinizados a vácuo. Os tubos foram centrifugados em 4°C a 300g por 5 minutos para separar os eritrócitos do plasma, o sobrenadante (plasma) foi retirado e descartado e o precipitado (eritrócitos) foram lavados 3 vezes com tampão fosfato (PBS 10 mM Na₂PO₄ contendo 140 mM de NaCl e 2,7 mM de KCl, pH 7,4 a 313 mOsm/kg de água). O concentrado de eritrócitos foi suspenso em PBS e depois diluído até uma concentração de 0,44% em PBS ou tampão glicose fosfato isotônico (IGP, 1 mM de tampão de fosfato potássio suplementado com 287 mM de glicose, pH 7,4 a 314 mOsm/kg de água; HELMERHORST et al., 1999a).

Posteriormente, 20 µL de peptídeo (diluído em PBS ou IGP para a obtenção de soluções de concentrações na faixa 0,19 - 100 µM) foram incubados com 180 mL da suspensão 0,44% de eritrócitos em PBS ou IGP por 1 h a 37°C. Como controle negativo foi usado tampão PBS e como controle positivo foi usado 0,1% SDS em PBS ou IGP.

As porcentagens de hemólises foram calculadas usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{[(\text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ peptídeo} - \text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ controle negativo})]}{[(\text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ controle positivo} - \text{Abs}_{405 \text{ nm}} \text{ controle negativo})]}$$

3.13. Interação da cheferina I amidada com membranas biológicas

a) Permeabilização de membrana citoplasmática de *C. albicans*

Foi utilizado o Kit *Live/Dead bacLight viability* L-7007 (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, The Netherlands) que mede a viabilidade celular. Este kit se baseia na utilização de dois corantes de ácido nucléico: o SYTO 9 (fluorescência verde) e o iodeto de propídio

(fluorescência vermelha). O primeiro cora todas as leveduras de uma população e o segundo penetra somente em bactérias com a membrana danificada causando uma leve redução na fluorescência do SYTO 9. Para o teste do peptídeo, uma cultura de bactérias foi crescida até a metade da sua fase exponencial, quando, foi centrifugada e ressuspensa em meio PDB. As células suspensas foram expostas a diferentes concentrações de peptídeo por 1h a 30°C. Posteriormente, elas foram lavadas 2 vezes com meio PDB e ressuspensas no mesmo meio. À suspensão foi adicionada uma solução contendo os dois corantes (concentração final = 0,3%). Após 15 minutos em temperatura ambiente as células foram examinadas em um microscópio de fluorescência multiusuário do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. Para a preparação das lâminas foram utilizadas lamínulas recobertas de poli-L-lisina.

b) Análises por microscopia confocal de varredura a laser

Estas foram realizadas em um equipamento Carl Zeiss, modelo LSM 510, em colaboração com a Profa. Dra. Gláucia Machado-Santelli (Departamento de Biologia Celular do ICB-USP). A cultura de *Candida albicans* foi crescida durante a noite em meio Sabouraud (3 mL) sob agitação a 37°C. No dia seguinte, 100 µL desta cultura foram adicionados a 10 mL de meio Sabouraud e a absorbância da mistura foi lida em 600 nm (valor entre 0,085 e 0,120). A nova cultura foi deixada crescer até a metade da sua fase logarítmica ($Abs_{600\text{ nm}} = 0,400$; equivalente a 10^7 células/mL), quando as células foram diluídas com meio Sabouraud até a concentração de 2×10^6 células/mL, em seguida, lavadas três vezes com meio PDB. À suspensão obtida foi adicionado 20 µL de 25 nM Mitotracker Orange em PBS e a mistura foi incubada por 45 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com meio PDB e incubadas com 3,13 µM de FAM-Chef Ia por 15 minutos a 30°C. Posteriormente, elas foram lavadas três vezes com meio PDB e fixadas por 15 minutos com 3,7% de formaldeído em PBS. Finalmente, a amostra foi lavada três vezes com PBS e dissolvidas em 20 µL de tampão PBS.

Na montagem das lâminas, foram utilizadas lamínulas cobertas com poli-L-lisina, as

quais foram adicionados 5 μL de amostra celular e 8 μL de Vecta Shield (Vector Laboratories, UK).

c) Análises por FACS

Estes foram realizadas no citômetro de fluxo Cytomics FC500 da Beckman Coulter do departamento de Bioquímica do IQ-USP. A cultura de *Candida albicans MDM8* em meio Sabouraud (3 mL) foi crescida sob agitação a 37°C. Após 16 h, 100 μL desta cultura foram adicionados a 10 mL de meio Sabouraud e a absorbância da mistura foi lida em 600 nm (valor entre 0,085 e 0,120). A nova cultura foi deixada crescer até a metade da sua fase logarítmica ($\text{Abs}_{600\text{ nm}} = 0,400$ equivalente a 10^7 células/mL), quando as células foram diluídas com meio Sabouraud até a concentração de 2×10^6 células/mL e, em seguida, lavadas três vezes com meio PDB. A suspensão obtida (1mL) foi incubada com 3,13 μM de FAM-*Chef Ia* por 15 minutos a 0°C e a 30° C na ausência e presença de NaN_3 (0,05%) ou em concentrações variáveis de NaCl. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com meio PDB e, finalmente, elas foram dissolvidas em 1 mL de tampão PBS. A fluorescência da fluoresceína foi monitorada no canal FL1-H e os resultados foram analisados usando o software WinMDI 2.8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da relação estrutura-atividade antimicrobiana da Cheferina I

A primeira etapa do estudo foi a realização de uma análise comparativa da seqüência do polipeptídeo *Shep-GRP* que contém a seqüência da cheferina I com outras seqüências disponíveis em várias bases de dados.

A cheferina (*Chef I*) é produzida a partir de um único gene chamado *shep-grp*, que gera um polipeptídeo imaturo caracterizado por possuir 5 domínios (**Esquema 1**): i) um peptídeo sinal putativo, ii) a seqüência da cheferina I, iii) um dipeptídeo espaçador, iv) a seqüência da cheferina II (um outro peptídeo antimicrobiano) e v) um peptídeo C-terminal (PARK et al., 2000).

M A S K T L I L L G L F A I L L V V S E V S A A R E S G M V K P E S E E T V Q P E
G Y G G H G G H G G H G G H G G H G G H G G H G G G G H G L D G Y H G G H G
G H G G G Y N G G G G H G G H G G G Y N G G G H H G G G G H G L N E P V Q T
Q P G V

Esquema 1. Seqüência de aminoácidos deduzida do polipeptídeo imaturo *Shep-GRP* codificado a partir do gene *shep-grp* (PARK et al., 2000).

Inicialmente, a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo imaturo *Shep-GRP* foi comparada com seqüências que se encontram no Pfam, uma base de dados que divide as proteínas por famílias e domínios (<http://pfam.sanger.ac.uk>, FINN et al., 2008). Os resultados nos indicaram que o polipeptídeo pertence à superfamília das GRPs (pfam07172), que compreende algumas GRPs, a nodulinas 16 e a nodulina 24, sendo muitas dessas proteínas produzidas em resposta a vários tipos de estresse (MARCHLER-BAUER et al., 2007). As nodulinas 16 e 24 são proteínas contidas na membrana peribacteróide dos nódulos da raiz de certas plantas, que são necessários na simbiose com as bactérias fixadoras de nitrogênio (SANDAL et al., 1992; NIRUNSUKSIRI; SENGUPTA-

GOPALAN, 1990).

A conservação de seqüência de aminoácidos de GRPs nos indicaria que estas proteínas têm a mesma localização e/ou função (SANDAL et al., 1992). Portanto, foi feito o alinhamento do peptídeo sinal putativo do polipeptídeo imaturo *Shep-GRP* com 15 seqüências de peptídeo sinais de GRPs (pfam07172) usando o software CLUSTAL W (**Esquema 2**), bem como a análise comparativa da seqüência de aminoácidos do polipeptídeo *Shep-GRP* com seqüências de proteínas do banco de dados de seqüências não redundantes do NCBI usando o algoritmo PSI-BLAST (**Esquema 3**; ALTSCHUL et al., 1990; 1997). O resultado foi a observação de que a seqüência do polipeptídeo *Shep-GRP* apresenta uma alta homologia com várias GRPs pertencentes a *Arabidopsis thaliana*, uma outra planta da Família *Brassicaceae*, tal como aquela codificada pelo gene *AtGRP9* (gi |30678191|, **Esquema 3**) de tolerância à sal e a ácido abscísico expresso na raiz de *A. thaliana* (principalmente no tecido vascular, como ocorre para o polipeptídeo *Shep-GRP*). De fato, os alinhamentos mostraram que o peptídeo sinal putativo e o peptídeo C-terminal destas proteínas são altamente conservados (**Esquema 3**).

Relatos de análise do gene *AtGRP9* usando duplo híbrido em levedura propõem que ele interage com *AtCAD5*, a principal cinnamil-álcool desidrogenase envolvida na síntese de lignina, e que, portanto, a proteína codificada pelo *AtGRP9* poderia estar associada à síntese de lignina induzida em resposta por estresse salino (CHEN et al.; 2007). Entretanto, tal proposição não foi confirmada por experimentos de precipitação co-imunológica (Co-Ip), pois a obtenção da proteína *AtGRP9* expressa em *E. coli* foi dificultada possivelmente pela alta proporção de códons raros na forma de clusters no marco de leitura (ORF, ~35%) ou pela alta porcentagem de motivos repetitivos de Gly (~50%). Assim, é possível que as cheferinas I e II participem do mecanismo de síntese de lignina induzida em resposta por estresse salino, já que *Capsella bursa-pastoris* pertence à mesma família que *A. thaliana* (AKSOY et al., 1998).


```

gi|9957568|Shep-GRP de C. bursa-pastoris          107
gi|30678191|GRP de A. thaliana                  125
gi|15224540|GRP de A. thaliana                  101
gi|79321851|GRP de A. thaliana                  105
gi|79321960|GRP de A. thaliana                  107
gi|79321868|GRP de A. thaliana                  118
gi|79321992|GRP de A. thaliana                  101
gi|79321894|GRP de A. thaliana                  111
gi|79321923|GRP de A. thaliana                  100
gi|15224547|GRP de A. thaliana                  114
gi|79322008|GRP de A. thaliana                  91
gi|79322055|GRP de A. thaliana                  77
gi|21536606|GRP putativa de A. thaliana         101
GGHGGG|NCGGG|GGHGGG--YNGGG|HGGG|----- 107
GGGGG|GGGGG|YGGGGHYGGGGG|YGGGGHYGGGGG|HGGGGHYGGG|125
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGG|----- 101
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGGHYGG|----- 105
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGGHGGG|HYGGGG|----- 107
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGGHYGGGGG|HGGGGHYGG 118
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGG|----- 101
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGGHGGG|-----HYGG 111
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGG|----- 100
GGGG--YGGGG|-----HYGGGG|----- 114
GGGG--YGGGG|-----HYGGGG|----- 91
GGGG--YGGGG|-----HYGGGG|----- 77
GGGGG|YGGGGG|YGGGGG|YGGGGG|-----HYGGGG|----- 101
** * *.****
*:****

```

```

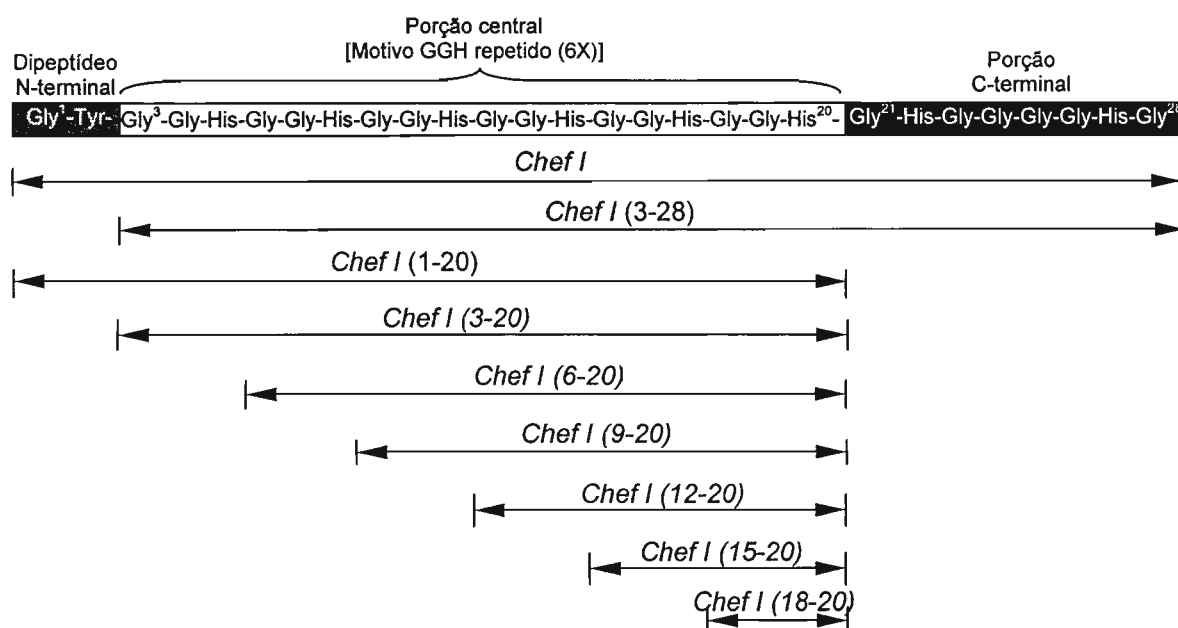
gi|9957568|Shep-GRP de C. bursa-pastoris          120
gi|30678191|GRP de A. thaliana                  154
gi|15224540|GRP de A. thaliana                  127
gi|79321851|GRP de A. thaliana                  131
gi|79321960|GRP de A. thaliana                  133
gi|79321868|GRP de A. thaliana                  147
gi|79321992|GRP de A. thaliana                  114
gi|79321894|GRP de A. thaliana                  140
gi|79321923|GRP de A. thaliana                  113
gi|15224547|GRP de A. thaliana                  127
gi|79322008|GRP de A. thaliana                  104
gi|79322055|GRP de A. thaliana                  90
gi|21536606|GRP putativa de A. thaliana         127
-----MGLNEP|VQ|T|P|G|V| 120
GGG|Y|G|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 154
---G|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 127
---G|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 131
---G|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 133
GGG|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 147
-----MGLNEP|V|Q|T|K|P|G|V| 114
GGG|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 140
-----MGLNEP|V|Q|T|K|P|G|V| 113
-----MGLNEP|V|Q|T|K|P|G|V| 127
-----MGLNEP|V|Q|T|K|P|G|V| 104
-----MGLNEP|V|Q|T|K|P|G|V| 90
---G|Y|G|G|G|G|H|G|G|G|G|G|L|N|E|P|V|Q|T|K|P|G|V| 127
*****:****

```

Esquema 3: Múltiplo alinhamento da seqüência de Shep-GRP e de algumas seqüências homólogas encontradas na análise por PSI-BLAST usando o software CLUSTAL W (1.83). * indica um aminoácido conservado; : indica um grupo de aminoácidos conservados.

4.1.1. Síntese, purificação, caracterização química e atividade antimicrobiana da *Chef I* e análogos truncados

As considerações acima, o interesse em estudar novos peptídeos com ação antimicrobiana (AMPs), a sequência atípica da cheferina I (formada apenas de His, Gly e uma única Tyr) e o pouco conhecimento sobre a SPFS e estrutura secundária de AMPs ricos em Gly, despertaram o nosso interesse em realizar um estudo da relação estrutura-atividade da cheferina I. O **Esquema 4** apresenta os fragmentos que foram sintetizados e testados inicialmente com o objetivo de determinar a porção mínima ativa.



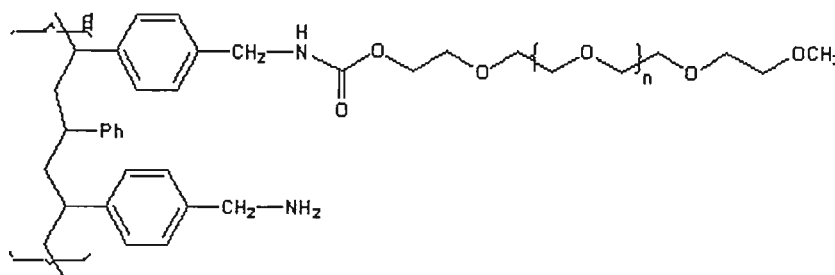
Esquema 4: Seqüência da cheferina I e dos seus análogos truncados a serem sintetizados.

a) Sínteses da *Chef I* e de *Chef I* (3-28) na resina CLEAR ácida

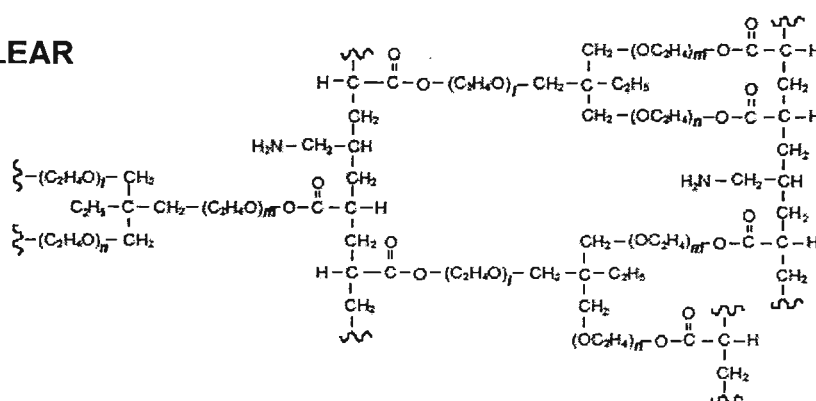
As resinas MBHA e Rink amida se caracterizam por apresentar como matriz o copolímero resultante da reação de PS com DVB (1%). A literatura sugere que a natureza apolar desta matriz pode exercer grande influência na conformação das cadeias peptídicas que estão sendo sintetizadas nessas resinas (MERRIFIELD, 1995). Assim sendo, foram desenvolvidas novas resinas, tais como PEG-PSTM, TentagelTM,

ChemMatrix e CLEAR (estruturas abaixo, BECKER et al., 1982; BAYER et al., 1983; KEMPE; BARANY, 1996; GARCÍA-MARTIN et al., 2006)

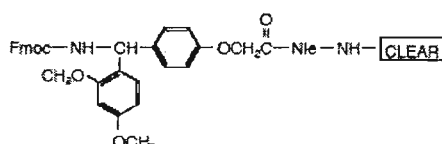
PEG-PS®



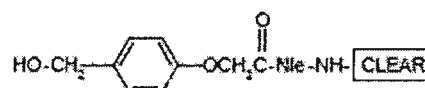
CLEAR



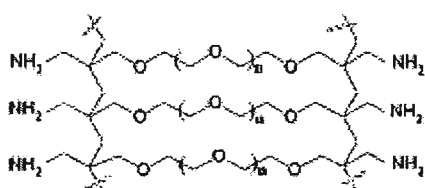
RESINA CLEAR AMIDA



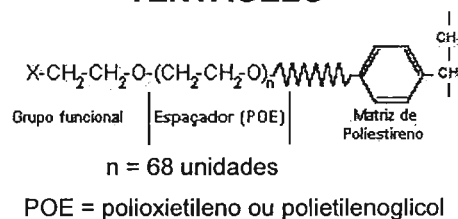
RESINA CLEAR ÁCIDA



CHEMMATRIX



TENTAGEL®



As duas primeiras (PEG-PS e Tentagel) apresentam cadeias de polietilenoglicol (PEG) acopladas como espaçadores ao núcleo de PS e DVB da resina (BECKER et al., 1982; BAYER et al., 1983). As resinas ChemMatrix e CLEAR se baseiam em um núcleo de PEG que confere a elas uma natureza hidrofílica e excelentes propriedades de

inchamento em diversos sistemas de solventes (KEMPE; BARANY, 1996; GARCÍA-MARTIN et al., 2006a). O PEG mostrou-se adequado para a SPFS passo a passo de seqüências agregantes, como comprovado na síntese de oligo- e cooligopeptídeos contendo 9-20 resíduos de aminoácidos, já que ele não influencia a conformação do peptídeo em crescimento sobre a resina que o contém (EL RAHMAN et al., 1980).

A resina CLEAR é sintetizada por copolimerização de etoxilato de trimetilolpropano com metacrilato de polietilenoglicol-etil-éter e se caracteriza por intumescer bem em solventes de diferentes polaridades, tais como DCM, DMF, THF, DMSO, MeOH e água (KEMPE; BARANY, 1996). Ela é razoavelmente estável nas condições de SPFS passo a passo via estratégia Fmoc, mas não em presença de bases orgânicas fortes (KEMPE; BARANY, 1996). A resina CLEAR foi usada com sucesso na síntese do fragmento 65-74 da proteína carregadora de acila e de H-Ala₁₀-Val-NH₂, ambos conhecidos como seqüências altamente agregantes (KEMPE; BARANY, 1996).

As sínteses foram realizadas por SPFS manual a 60°C usando protocolos estabelecidos por nós (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2001; 2004; SOUZA et al., 2004; LOFFREDO et al., 2008). Ela ocorreu a partir de 0,70 g de Fmoc-Gly-CLEAR ácida sem a necessidade de reacoplamentos. Utilizamos a combinação de DIC/HOBt nos acoplamentos das Fmoc-Gly e TBTU/DIPEA somente nos acoplamentos das Fmoc-His-OH para evitar a adição de Gly adicionais. Após o acoplamento da Gly³ à peptidil-resina em crescimento, a síntese foi interrompida e a peptidil-resina foi seca sob vácuo. Do total obtido (0,95 g), foram removidos 0,50 g. A peptidil-resina restante foi usada para a incorporação sequencial de Tyr² e Gly¹ para resultar na peptidil-resina Fmoc-G¹Y(But)GGH(Trt)GGH(Trt)GGH(Trt)GGH(Trt)GGH(Trt)GGH(Trt)GGH(Trt)GH(Trt)GGGGH(Trt)G²⁸-CLEAR ácida correspondente à *Chef I*, que foi seca sob vácuo e estocada a -4°C.

Posteriormente, 20 mg da *Chef I*-CLEAR ácida e 21 mg da *Chef I* (3-28)-CLEAR ácida foram submetidas à clivagem da resina e desproteção total como indicado no item

3.8.b para a geração dos peptídeos brutos correspondentes (3,6 mg e 4,3 mg, respectivamente). As análises por RP-HPLC (**Figura 5A**) e LC/ESI-MS (**Figura 6**) do peptídeo bruto correspondente a *Chef I* mostraram que o componente majoritário 1 corresponde ao *Chef I* desejado ($G^1YGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG^{28}-OH$) e que os diversos subprodutos formados durante a síntese correspondem a peptídeos deletados em vários resíduos de aminoácidos C-terminais e com uma ou duas Gly adicionais (2, 3, 4 e 5 nas **Figuras 5A e 6**) e ao análogo da *Chef I* com uma Tyr adicional (6 na **Figuras 5A e 6**).

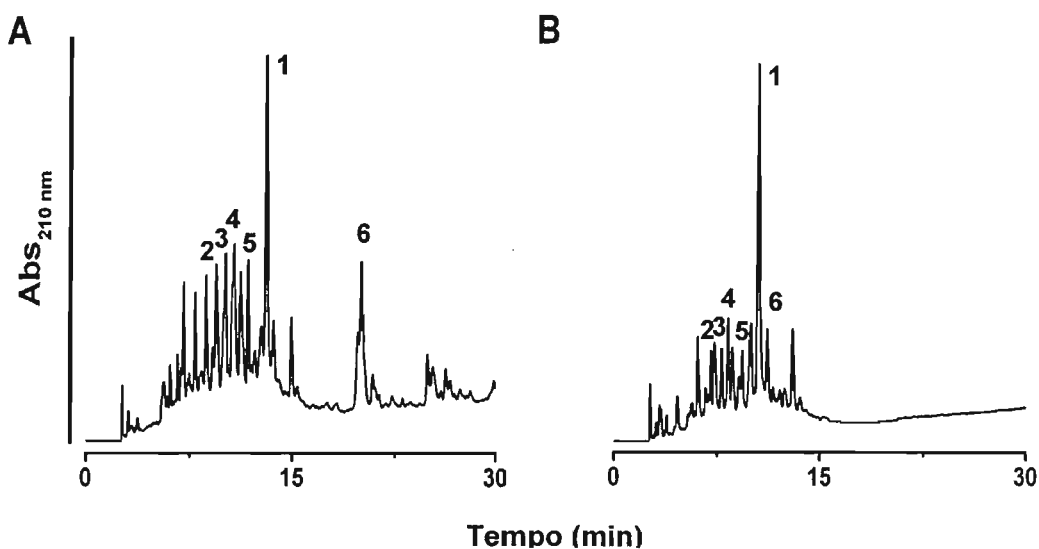


Figura 5: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultantes das clivagens da resina e desproteções totais de *Chef I-CLEAR ácida* (A) e *Chef I (3-28)-CLEAR ácida* (B). **Condições:** Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

As análises por RP-HPLC (**Figura 5B**) e LC/ESI-MS (**Figura 7**) do peptídeo bruto obtido após clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (3-28)-CLEAR ácida* mostraram que o componente majoritário 1 (**Figura 5B**) corresponde ao análogo truncado *Chef I (3-28)* desejado ($G^3GHGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG^{28}-OH$). Também foram observados muitos subprodutos produzidos durante a síntese que correspondem a

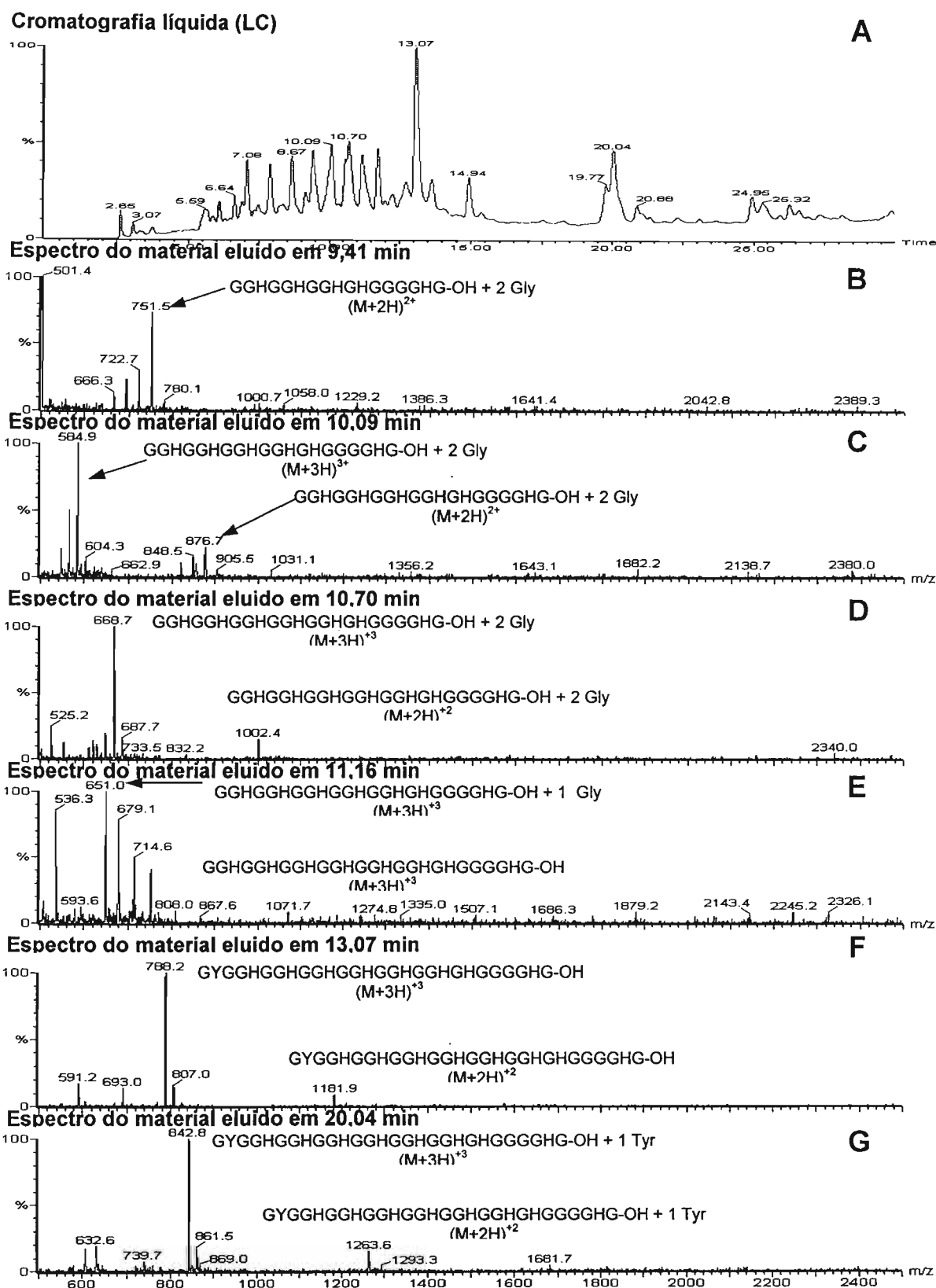


Figura 6: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I-CLEAR ácida*. Condições da LC: Injeção: 15 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

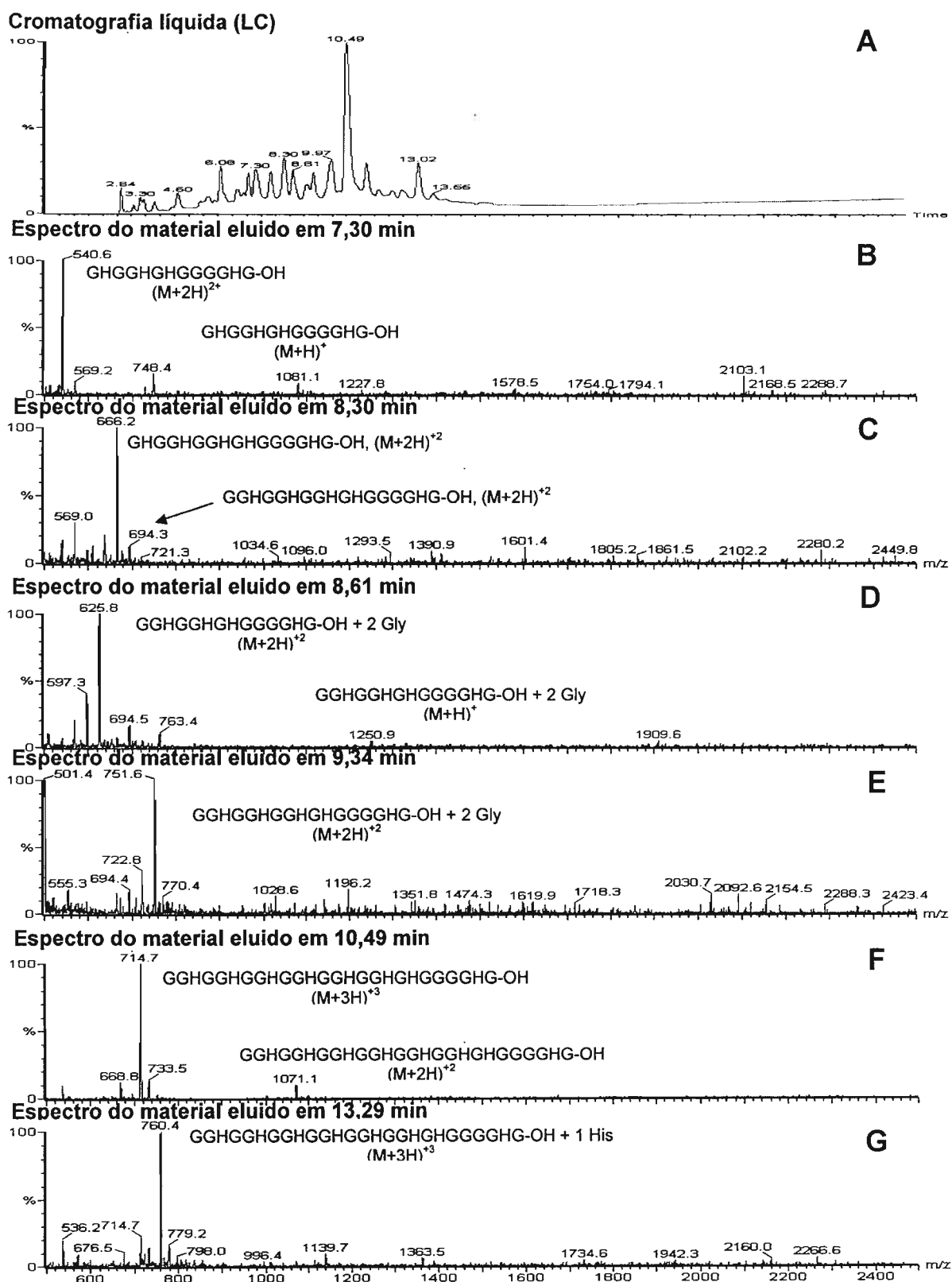


Figura 7: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I(3-28)-CLEAR ácida*. Condições da LC: Injeção: 15 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

peptídeos deletados em vários resíduos de aminoácidos (2 e 3 nas **Figuras 5B e 7**), peptídeos deletados em vários resíduos de aminoácidos contendo duas Gly adicionais (4 e 5 em **Figuras 5B e 7**) e ao análogo desejado com uma His adicional (6 nas **Figuras 5B e 7**).

Com a colaboração da Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini e do Dr. Gustavo F. S. Andrade do Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQ-USP realizamos um monitoramento das SPFS passo a passo por NIR-FT-Raman coletando espectros das peptidil-resinas que enfocavam a região amida I ($1640-1700\text{ cm}^{-1}$), onde existe contribuição majoritária do estiramento C=O e contribuição minoritária do N-H da ligação amida e, portanto, é possível obter informações da estrutura secundária de peptídeos e proteínas (MIYAZAWA, 1960).

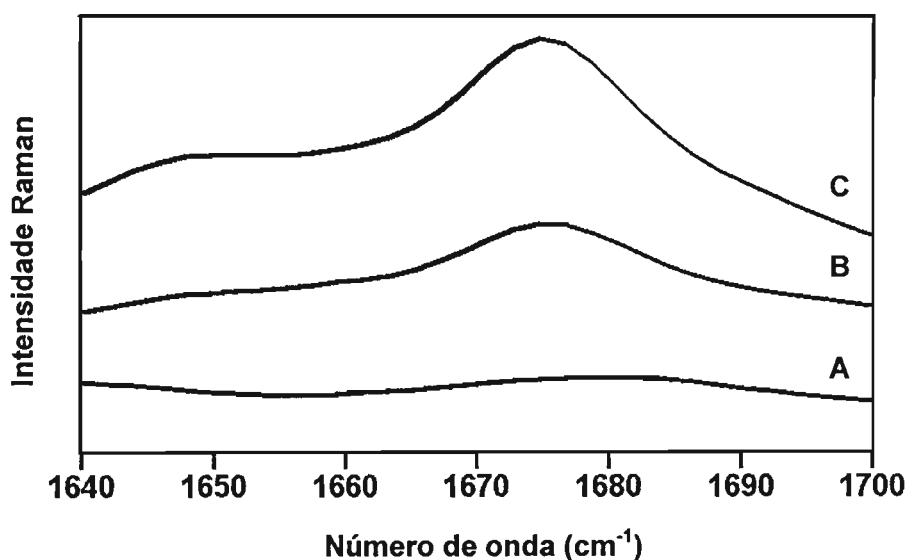


Figura 8. Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I ($1640-1700\text{ cm}^{-1}$) da resina CLEAR ácida (A) e das peptidil-resinas Fmoc-G³-G²⁸-CLEAR ácida (B) e Fmoc-G¹-G²⁸-CLEAR ácida (C).

Os espectros de *Chef I (3-28)-CLEAR ácida* contém uma banda em 1675 cm^{-1} indicativa de estruturação em folha β pregueada (**Figura 8**; SMALL et al.; 1970; COLTHUP et al., 1990) que se acentua no espectro da *Chef I-CLEAR ácida*. Estes

resultados revelaram que a sequência de aminoácidos da *Chef I* apresenta tendência de se estruturar formando agregados durante a SPFS, mas que a resina CLEAR ácida ajudou a minimizar a mesma.

b) Síntese dos análogos truncados *Chef I* (1-20), *Chef I* (3-20), *Chef I* (6-20), *Chef I* (9-20), *Chef I* (12-20), *Chef I* (15-20), *Chef I* (18-20) na resina PAM

Neste caso, empregamos a SPFS manual a 60°C, a mistura TBTU/DIPEA como reagente acoplador e a estratégia Boc/Bzl ao invés da Fmoc/But para evitar a formação de análogos indesejados contendo Gly adicionais (BODANSZKY et al., 1979). A síntese foi iniciada a partir de 2,7 g de aminoacil-resina (Boc-His-PAM) e não houve necessidade de realizar reacoplamentos. Após o acoplamento da Gly¹⁷ (terceiro resíduo acoplado à resina) a síntese foi interrompida, a peptidil-resina foi seca sob vácuo e 0,60 g de Boc-G¹⁸GH²⁰-PAM foram removidos. A peptidil-resina restante foi alongada via incorporação de três novos aminoácidos. Novamente, a síntese foi interrompida, a peptidil-resina foi seca sob vácuo e 0,45 g de peptidil-resina correspondente ao análogo truncado *Chef I* (15-20) [Boc-G¹⁵GH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM] foram removidos. Tal procedimento foi feito até o acoplamento da Gly¹ à peptidil-resina. Assim, foram obtidas as seguintes peptidil-PAM: 0,6 g de *Chef I* (18-20) [Boc-G¹⁸GH²⁰(Tos)-PAM], 0,45 g de *Chef I* (15-20) [Boc-G¹⁵GH(Tos)GGH²⁰(Tos)], 0,42 g de *Chef I* (12-20) [Boc-G¹²GH(Tos)GGH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM], 0,42 g de *Chef I* (9-20) [Boc-G⁹GH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM], 0,41 g de *Chef I* (6-20) [Boc-G⁶GH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM], 0,46 g de *Chef I* (3-20) [Boc-G³GH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM], e 0,32 g de *Chef I* (1-20) [Boc-G¹Y(2BrZ)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH(Tos)GGH²⁰(Tos)-PAM]. Parte das massas obtidas (300, 200, 211, 200, 200, 200, 211, 200 mg, respectivamente) foi submetida ao desligamento da resina e desproteção total para a obtenção dos peptídeos brutos correspondentes (43, 48, 48, 61, 67, 72 e 63 mg, respectivamente).

As análises por RP-HPLC (**Figura 9**) e LC/ESI-MS (**Figuras 10, 11 e 12**) dos peptídeos brutos correspondentes aos *Chef I (18-20)*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (12-20)* brutos mostraram que os componentes majoritários correspondiam aos peptídeos desejados ($G^{18}GH^{20}-OH$), ($G^{15}GHGGH^{20}-OH$) e ($G^{12}GHGGHGGH^{20}-OH$), respectivamente. Alguns produtos da sua fragmentação durante a ionização foram observados nos espectros de massa.

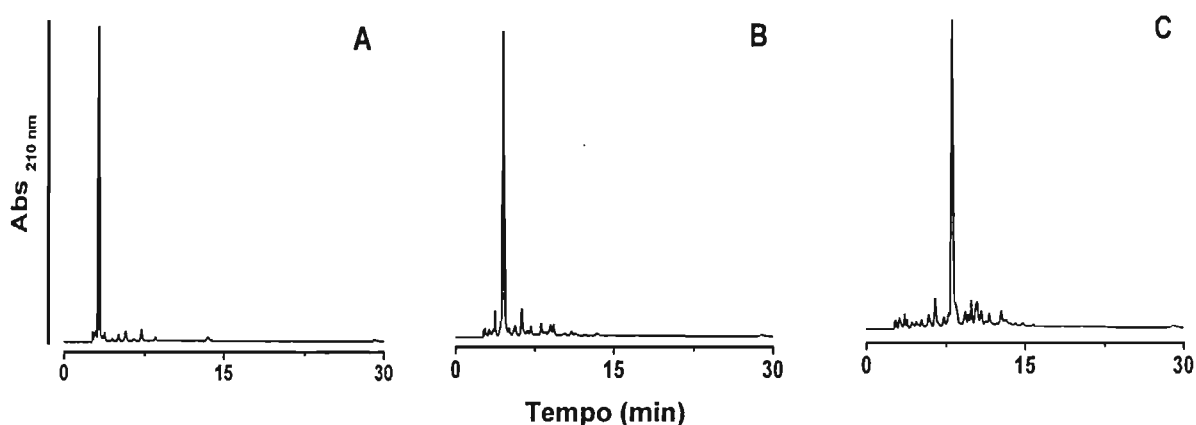
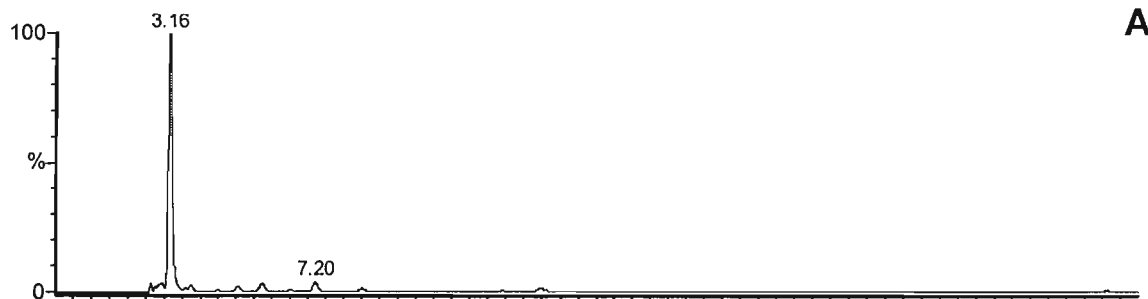


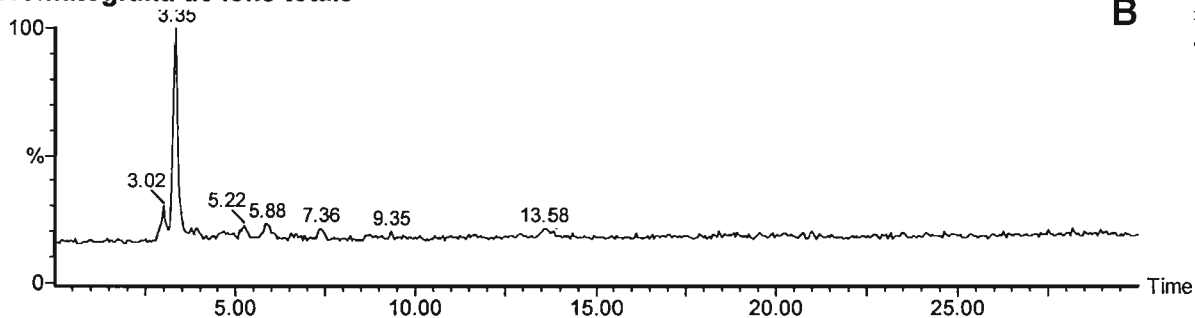
Figura 9: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultantes das clivagens da resina e desproteções totais de *Chef I (18-20)-PAM* (A), *Chef I (15-20)-PAM* (B) e *Chef I (12-20)-PAM* (C). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 10% ACN em água contendo 0,09% de TFA, condição isocrática de 100% A em 30 minutos ^(A,B) ou gradiente linear de 5-95% de B em 30 min ^(C), fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

Já as análises por RP-HPLC (**Figura 13A**) e LC/ESI-MS (**Figura 14**) do *Chef I (9-20)* bruto mostraram que o componente majoritário 1 corresponde ao peptídeo desejado ($G^9GHGGHGGHGGH^{20}-OH$). Também se observou a presença de alguns subprodutos, tais como o análogo do peptídeo desejado deletado na His C-terminal ($G^9GHGGHGGHGG^{19}-OH$) e um isômero deste (2 e 3 nas **Figuras 13A e 14**).

Cromatografia líquida (LC)



Cromatografia de íons totais



Espectro do material eluído em 3,16 min

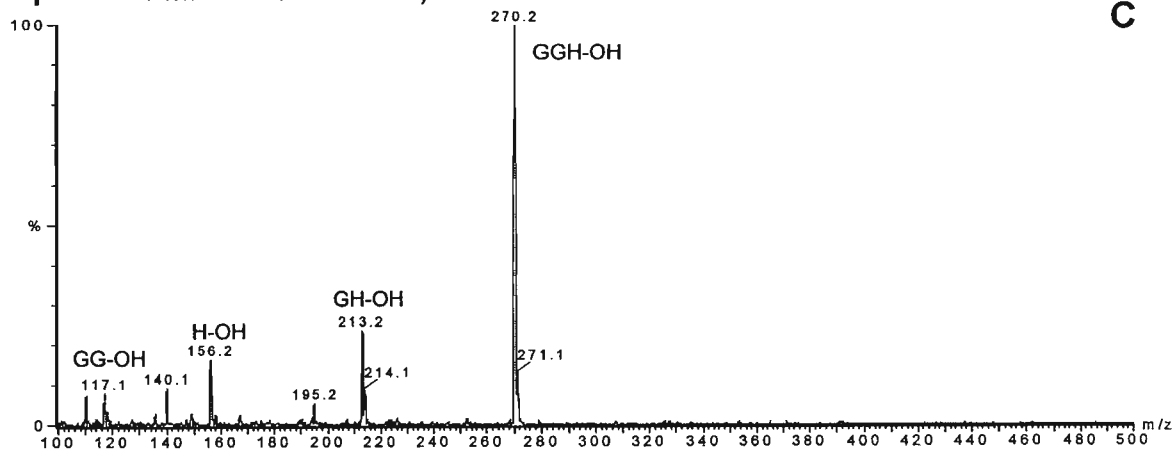
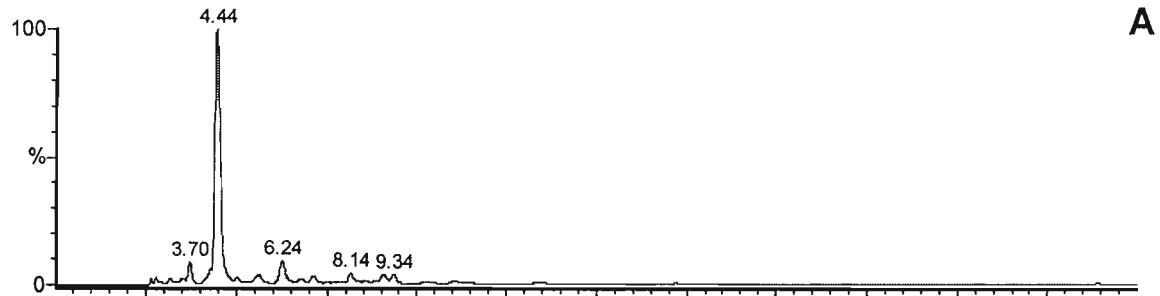


Figura 10: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (18-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, condição isocrática: 100% de A em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

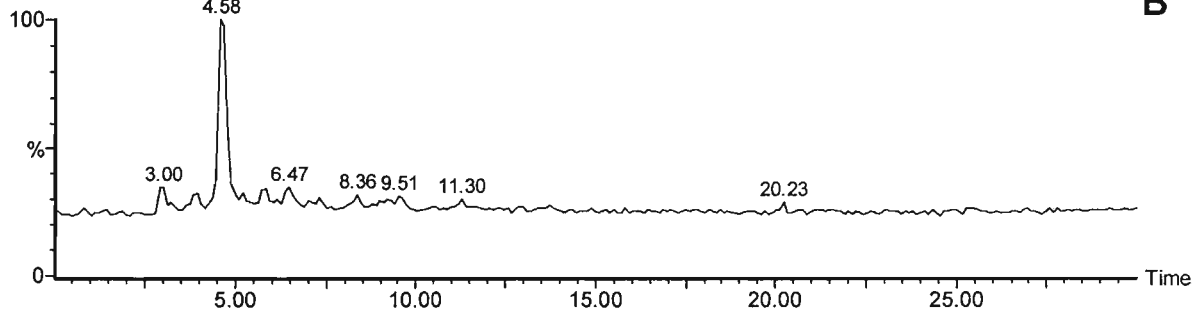
As análises por RP-HPLC (Figura 13B) e LC/ESI-MS (Figura 15) do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (6-20)-PAM* revelaram as presenças do peptídeo desejado ($G^6GHGGHG^{12}GHGGHGGH^{20}$ -OH) como componente majoritário 1 e de alguns subprodutos correspondentes aos análogos do

peptídeo deletados em duas Gly e duas His (2 nas Figuras 13B e 15) ou em uma His (3 em Figuras 13B e 15) e ao peptídeo desejado contendo uma His adicional (4 nas Figuras 13B e 15).

Cromatografia líquida (LC)



Cromatografia de íons totais



Espectro do material eluído em 4,44 min

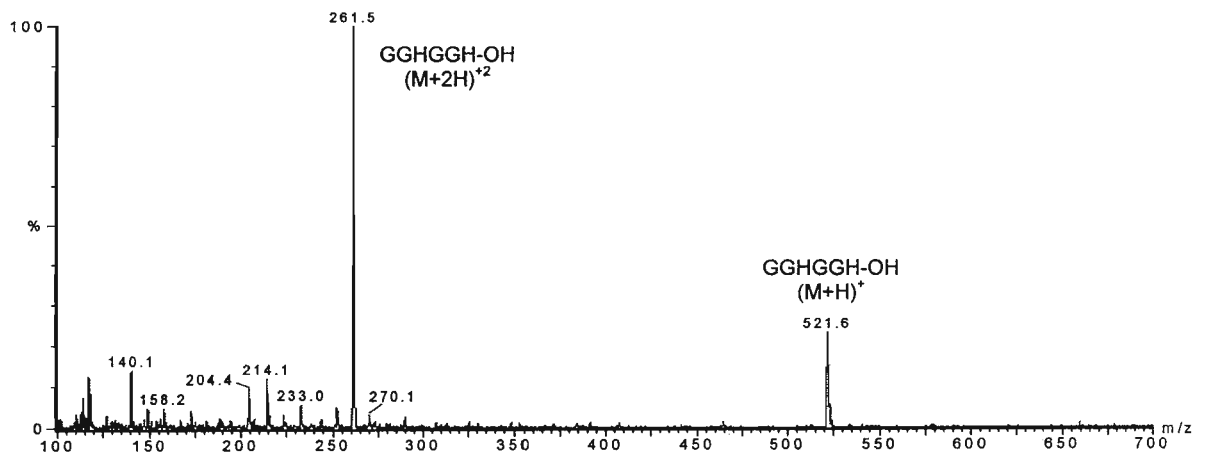
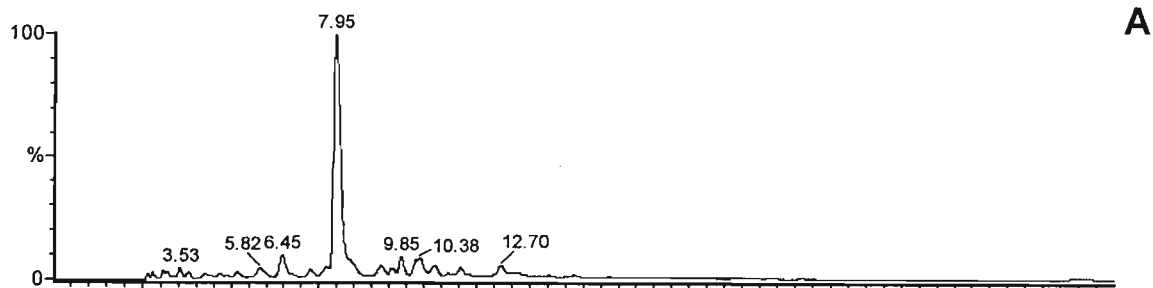
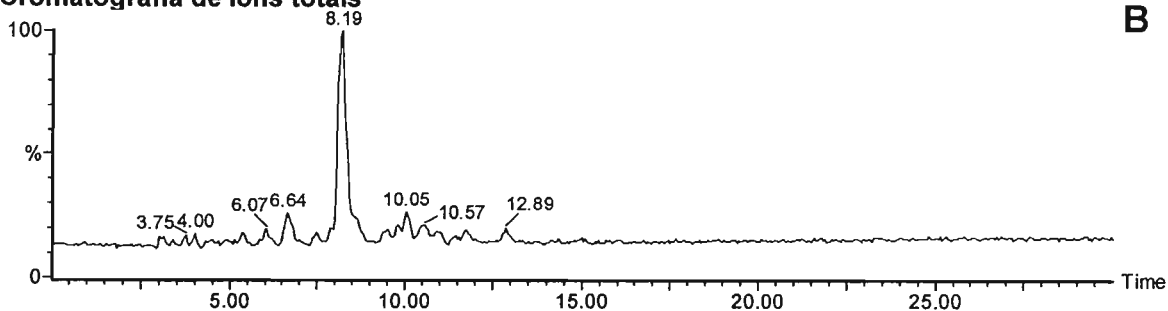


Figura 11: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (15-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 6 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, condição isocrática: 100% de A em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

Cromatografia líquida (LC)



Cromatografia de íons totais



Espectro do material eluído em 7,95 min

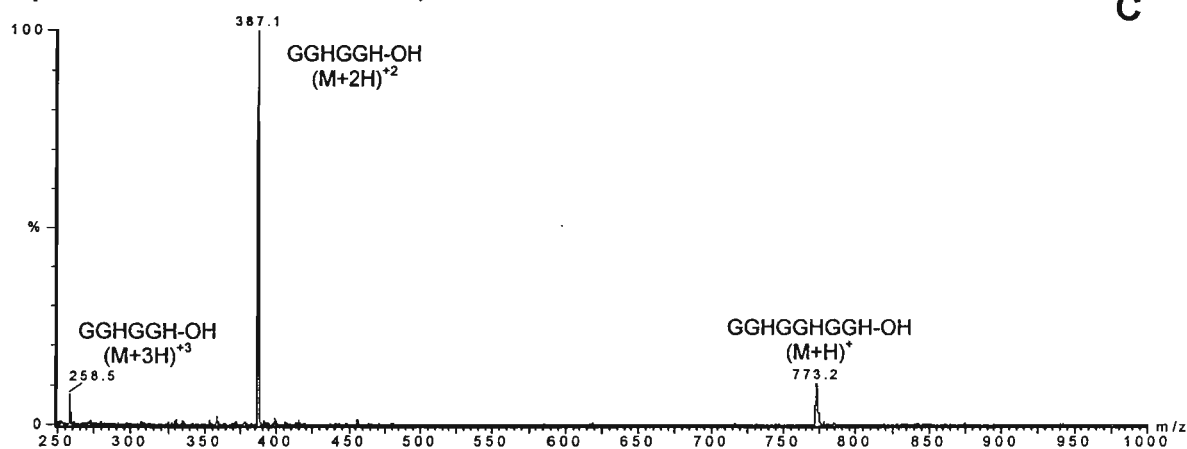


Figura 12: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (12-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

As análises por RP-HPLC (Figura 13C) e LC/ESI-MS (Figura 16) do peptídeo bruto correspondente a *Chef I (3-20)* bruto indicaram que o componente majoritário era o

peptídeo desejado ($G^3GHGGHGGHGGHGGHGGH^{20}-OH$; 1 nas Figuras 13C e 16), e que subprodutos eram $G^9GHGGHGGHGG^{19}-OH$ (2 nas Figuras 13C e 16) e $G^6GHGGHGGHGGHGG^{19}-OH$ (3 em Figuras 13C e 16) que também foram subprodutos dos brutos resultantes da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (6-20)-PAM* e *Chef I (9-20)-PAM*, análogos do peptídeo desejado deletado em uma His ($G^3GHGGHGGHGG^{12}GHGGHGG^{19}-OH$ (4 nas Figuras 13C e 16) e com uma histidina adicional (4 nas Figuras 13C e 16).

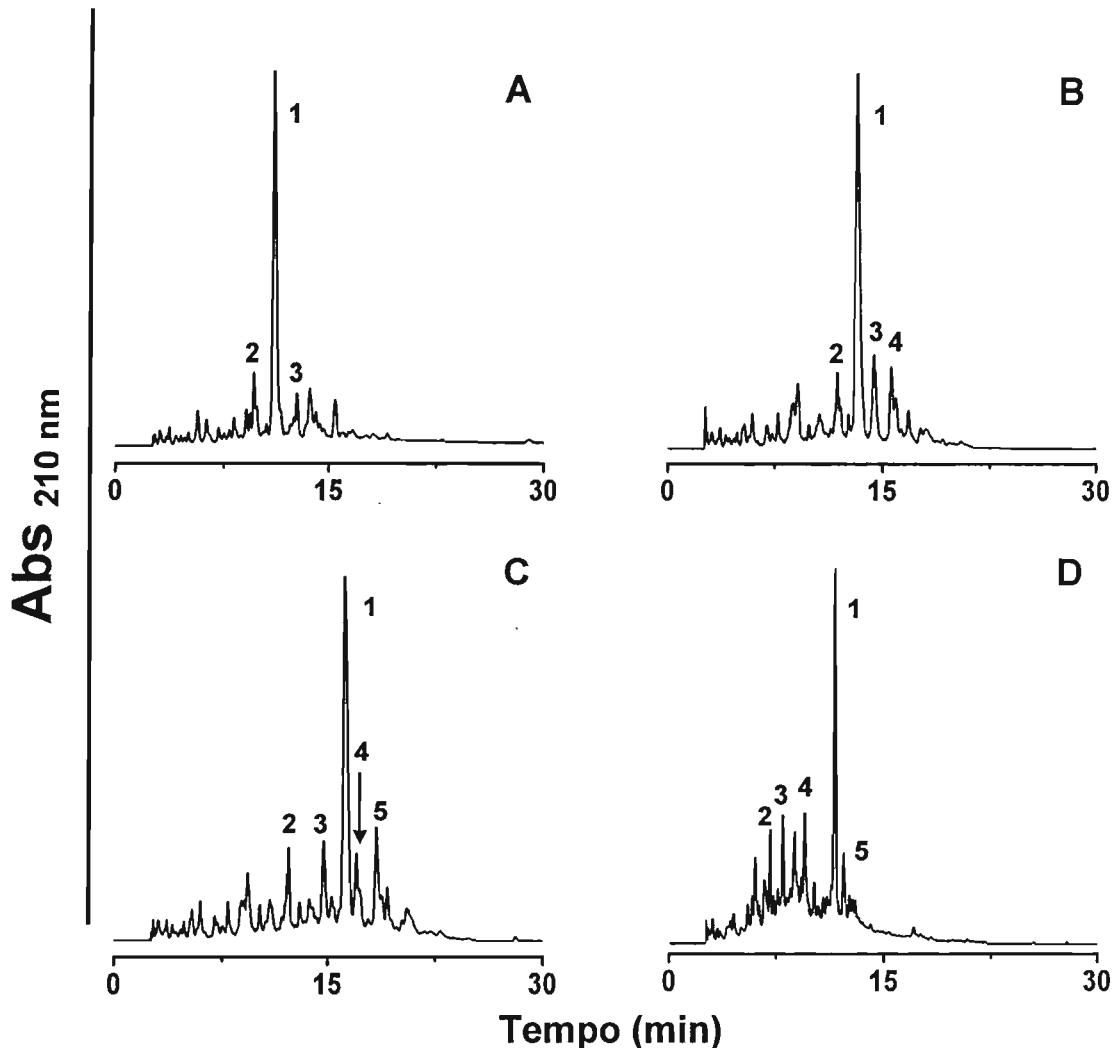
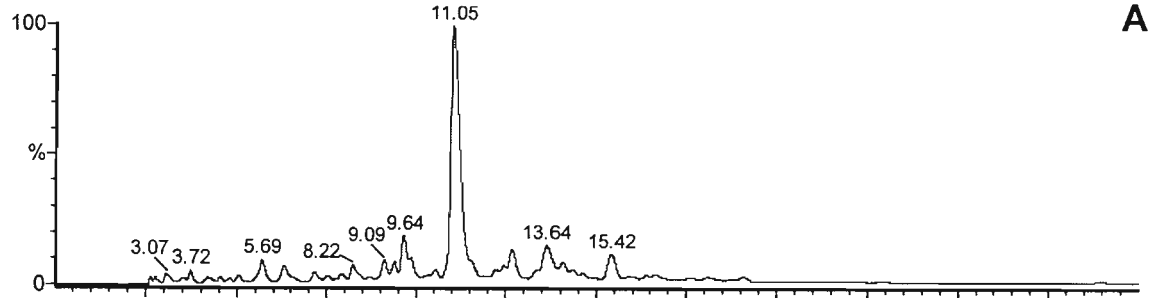
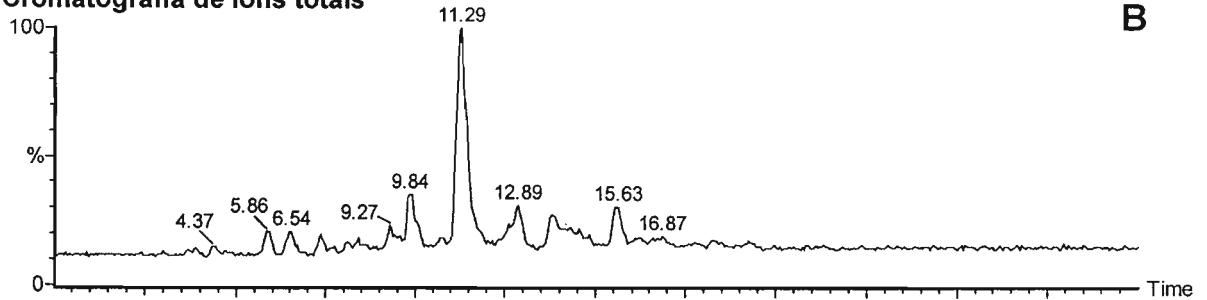


Figura 13: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultantes das clivagens da resina e desproteções totais de *Chef I (9-20)-PAM* (A), *Chef I (6-20)-PAM* (B), *Chef I (3-20)-PAM* (C) e *Chef I (1-20)-PAM* (D). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 10%^{A,B}, 30%^C ou 60%^D ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

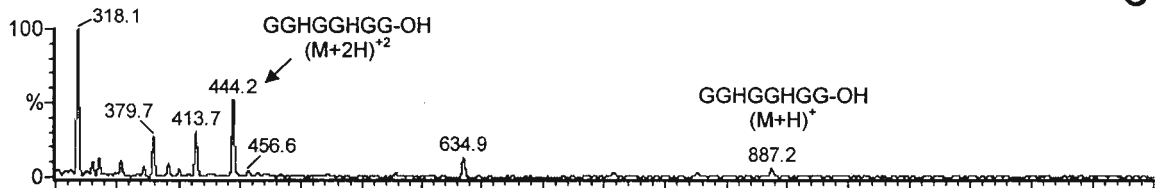
Cromatografia líquida (LC)



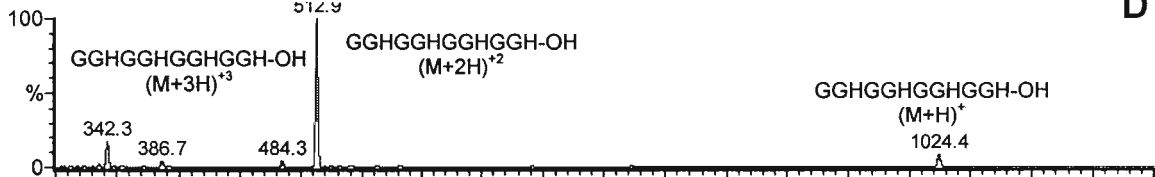
Cromatografia de íons totais



Espectro do material eluído em 9,64 min



Espectro do material eluído em 11,05 min



Espectro do material eluído em 12,89 min

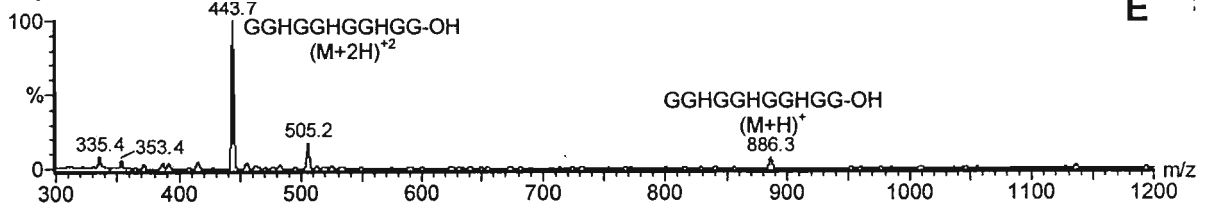
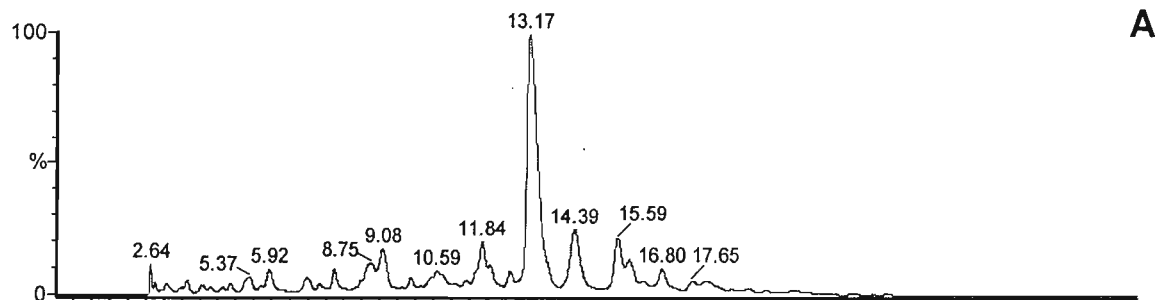
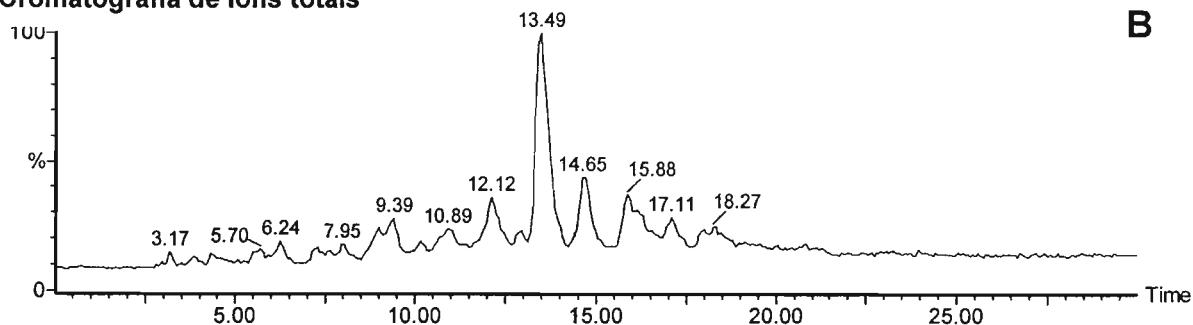


Figura 14: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (9-20)*-PAM. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

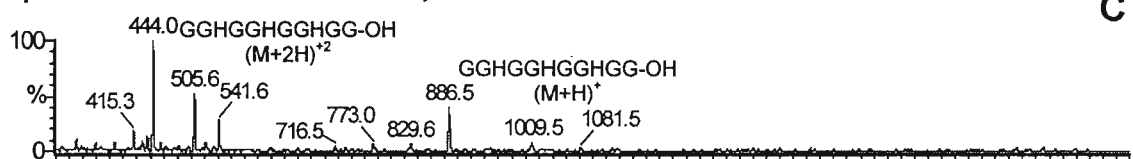
Cromatografia líquida (LC)



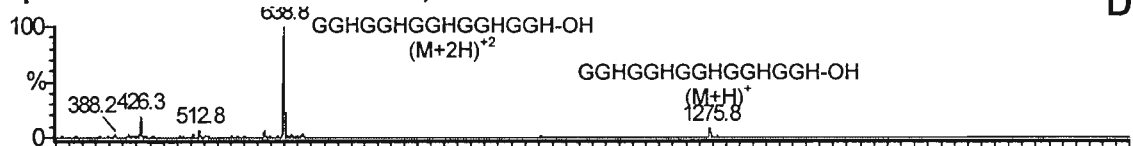
Cromatografia de íons totais



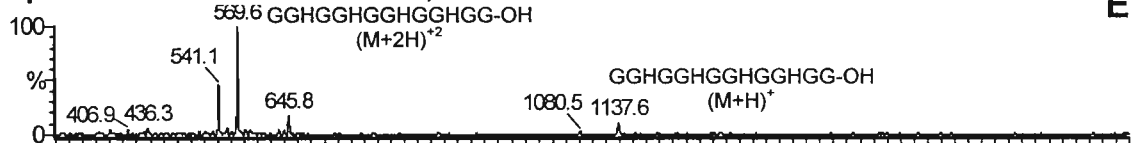
Espectro do material eluído em 11,84 min



Espectro do material eluído em 13,49 min



Espectro do material eluído em 14,39 min



Espectro do material eluído em 15,59 min

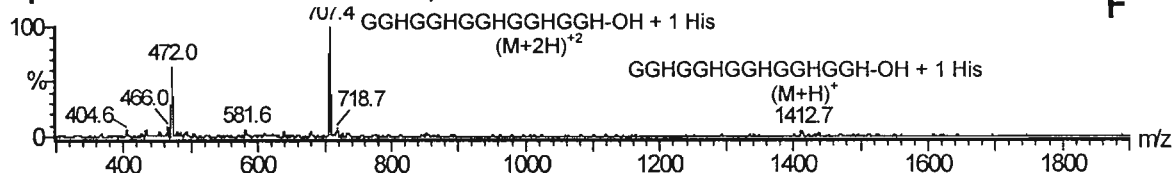


Figura 15: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (6-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ :210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

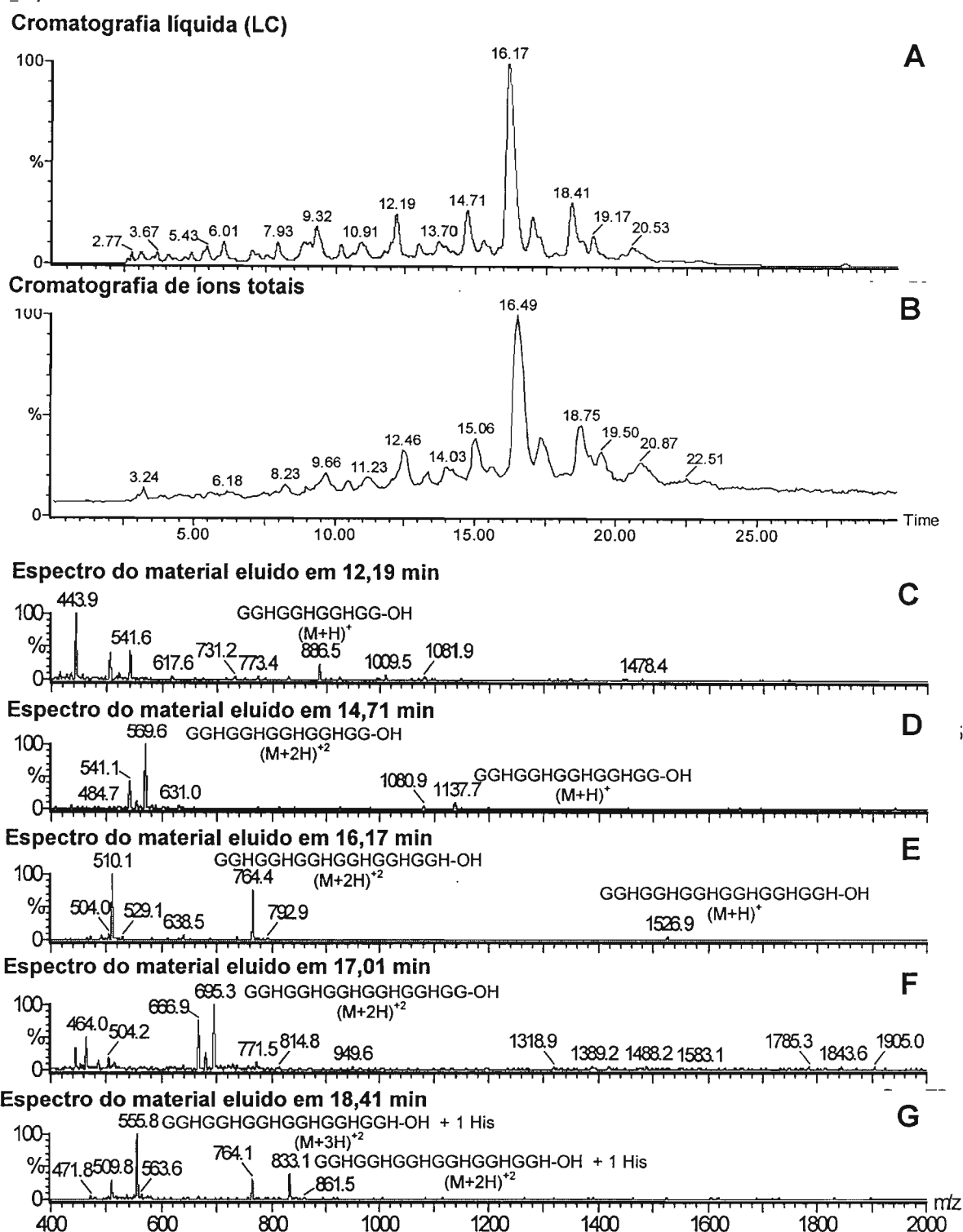
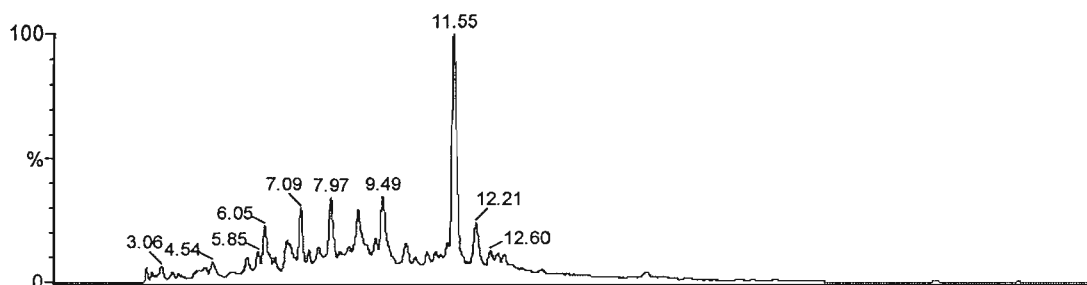


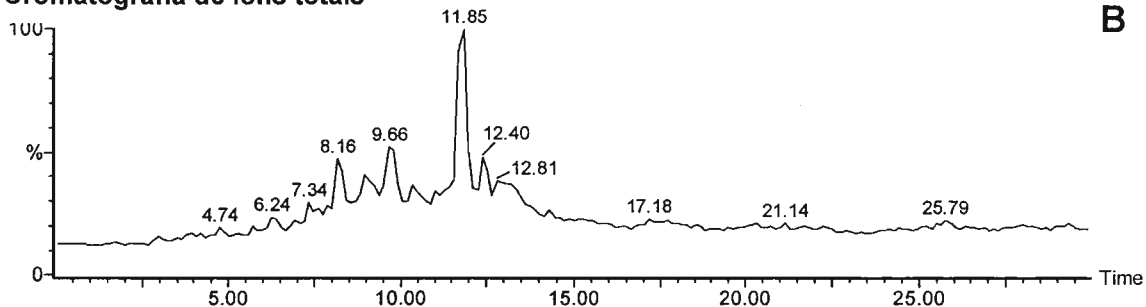
Figura 16: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (3-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

Cromatografia líquida (LC)



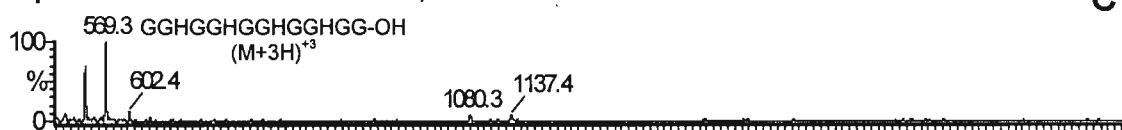
A

Cromatografia de íons totais



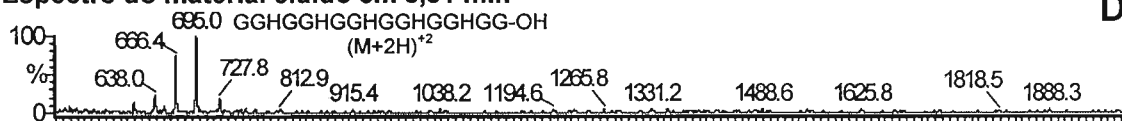
B

Espectro do material eluído em 7,97 min



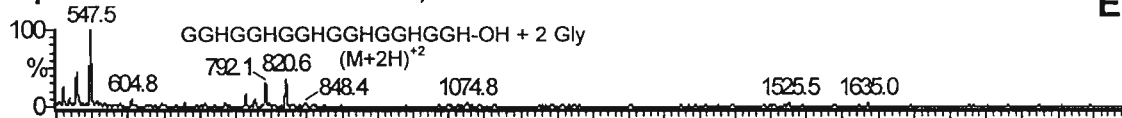
C

Espectro do material eluído em 8,81 min



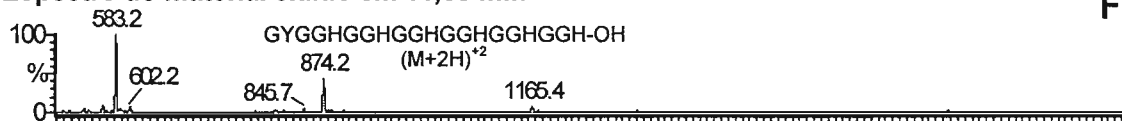
D

Espectro do material eluído em 9,49 min



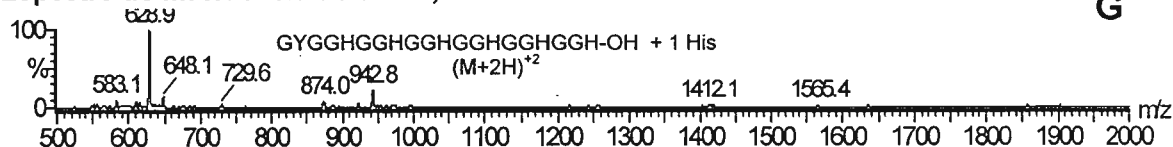
E

Espectro do material eluído em 11,55 min



F

Espectro do material eluído em 12,21 min



G

Figura 17: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (1-20)-PAM*. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 20 kV, modo de ionização: ES+.

As análises por RP-HPLC (**Figura 13D**) e LC/ESI-MS (**Figura 17**) do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina *Chef I (1-20)-PAM* mostraram um componente majoritário 1 que correspondia ao peptídeo desejado e subprodutos como os peptídeos $G^6GHGGHG^{12}GHGGHGG^{19}-OH$ e $G^3GHGGHG^{12}GHGGHGG^{19}-OH$ (2 e 3 nas **Figuras 13D e 17**), também subprodutos do bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I (3-20)-PAM*. Outros contaminantes detectados foram: o análogo do peptídeo desejado deletado em uma Tyr e com uma Gly adicional (4 nas **Figuras 13D e 17**), o análogo do peptídeo desejado contendo uma His adicional (5 nas **Figuras 13D e 17**).

c) Purificação da *Chef I* e dos análogos truncados *Chef I (3-28)*, *Chef I (1-20)*, *Chef I (3-20)*, *Chef I (6-20)*, *Chef I (9-20)*, *Chef I (12-20)*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (18-20)*

Na **Tabela 4** estão descritos as quantidades de peptidil-resinas de partida e as de peptídeos brutos obtidos a serem purificados.

Tabela 4: Quantidades de peptidil-CLEAR ácida e de peptidil-PAM que favoreceram os peptídeos brutos obtidos a partir deles.

Peptidil-resina	Massa de peptidil-resina (mg)	Massa de peptídeo bruto (mg)
<i>Chef I-CLEAR ácida</i>	251	47
<i>Chef I (3-28)-CLEAR ácida</i>	252	53
<i>Chef I (1-20)-PAM</i>	199	62
<i>Chef I (3-20)-PAM</i>	210	72
<i>Chef I (6-20)-PAM</i>	200	67
<i>Chef I (9-20)-PAM</i>	200	61
<i>Chef I (12-20)-PAM</i>	199	48
<i>Chef I (15-20)-PAM</i>	200	48
<i>Chef I (18-20)-PAM</i>	299	43

Esses peptídeos brutos foram purificados por RP-HPLC preparativa ou semi-preparativa [*Chef I (12-20)*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (18-20)*] usando as condições descritas na **Tabela 5**. Nas **Figuras 18 e 19** são mostrados os perfis de RP-HPLC da *Chef I* e de seus análogos truncados *Chef I (3-28)*, *Chef I (1-20)*, *Chef I (3-20)*, *Chef I (6-20)*, *Chef I (9-20)*, *Chef I (12-20)*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (18-20)* purificados. Na **Tabela 5** são mostrados os rendimentos de purificação e as porcentagens de pureza destes peptídeos no sistema ACN/água contendo TFA. Como se observa, segundo o critério “perfis de RP-HPLC” eles apresentaram altas porcentagens de pureza (> 95%); grau de pureza excelente para realizar ensaios biológicos com peptídeos. Tal pureza foi confirmada por LC/ESI-MS (**Tabela 5**), que também confirmou a identidade de cada um. *Chef I* e seus análogos truncados purificados são muito higroscópicos, por isso, as suas massas foram calculadas por diferença das massas do frasco vazio e o frasco contendo o peptídeo liofilizado, o que pode ter levado a erros no cálculo do conteúdo peptídico, como no caso de *Chef I*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (18-20)*.

d) Atividade antimicrobiana

A *Chef I* e os análogos truncados *Chef I (3-28)*, *Chef I (1-20)*, *Chef I (3-20)*, *Chef I (6-20)*, *Chef I (9-20)*, *Chef I (12-20)*, *Chef I (15-20)* e *Chef I (18-20)* foram testados frente as bactérias Gram negativas (*E. coli* SBS 363, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, *Enterobacter cloacae* K12, *Serratia marcescens* CDC 4124), Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* A270, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433), leveduras (*Candida albicans* MDM8, *Candida tropicalis* Squibb 1600, *Saccharomyces cerevisiae*) e fungos miceliais (*Aspergillus fumigatus* NCPF 2109, *Aspergillus flavus* NCPF 2199).

A *Chef I* e seus análogos não foram ativos contra as bactérias Gram negativas, Gram positivas e fungos miceliais testados (MICs > 100 µM). Para a nossa surpresa, a

Tabela 5: Condições de purificação, rendimentos e caracterização porcentagens da *Chef I*, *Chef I* (3-28), *Chef I* (1-20), *Chef I* (3-20), *Chef I* (6-20), *Chef I* (9-20), *Chef I* (12-20), *Chef I* (15-20) e *Chef I* (18-20) purificados.

Peptídeo	Fluxo (mL/min)	Solvente B (%) [*]	Gradiente linear em 90 min	Peptídeo injetado (mg)	Peptídeo purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Grau de pureza (%) ^{**}	Conteúdos peptídicos (%)	LC/ESI-MS (teórico/obtido)
<i>Chef I</i>	9	20	20 a 50% B	42,8	2,0	5%	96	100	788,0/788,1 (M+3H) ³⁺
<i>Chef I</i> (3-28)	9	20	15 a 45% B	50,2	4,4	9%	97	91	714,6/714,8 (M+3H) ³⁺
<i>Chef I</i> (1-20)	9	20	15 a 45% B	60,7	3,6	6%	97	79	873,4/873,5 (M+2H) ²⁺
<i>Chef I</i> (3-20)	10	10	20 a 50% B	71,1	6,1	9%	97	82	763,3/764,3 (M+2H) ²⁺
<i>Chef I</i> (6-20)	10	10	10 a 40% B	65,8	5,3	8%	100	77	637,8/637,7 (M+2H) ²⁺
<i>Chef I</i> (9-20)	10	10	5 a 35% B	58,0	2,4	4%	95	87	512,2/512,1 (M+2H) ²⁺
<i>Chef I</i> (12-20)	3	10	5 a 35% B	43,0	8,1	19%	97	64	386,7/386,7 (M+2H) ²⁺
<i>Chef I</i> (15-20)	3	10	5 a 35% B	46,8	13,0	28%	99	30	521,2/521,2 (M+H) ⁺
<i>Chef I</i> (18-20)	3	10	5 a 35% B	40,8	24,1	59%	99	42	270,1/270,1 (M+H) ⁺

* Solvente B: ACN/água contendo TFA 0,09%.

** Refere-se à análises em sistemas ACN/água contendo TFA.

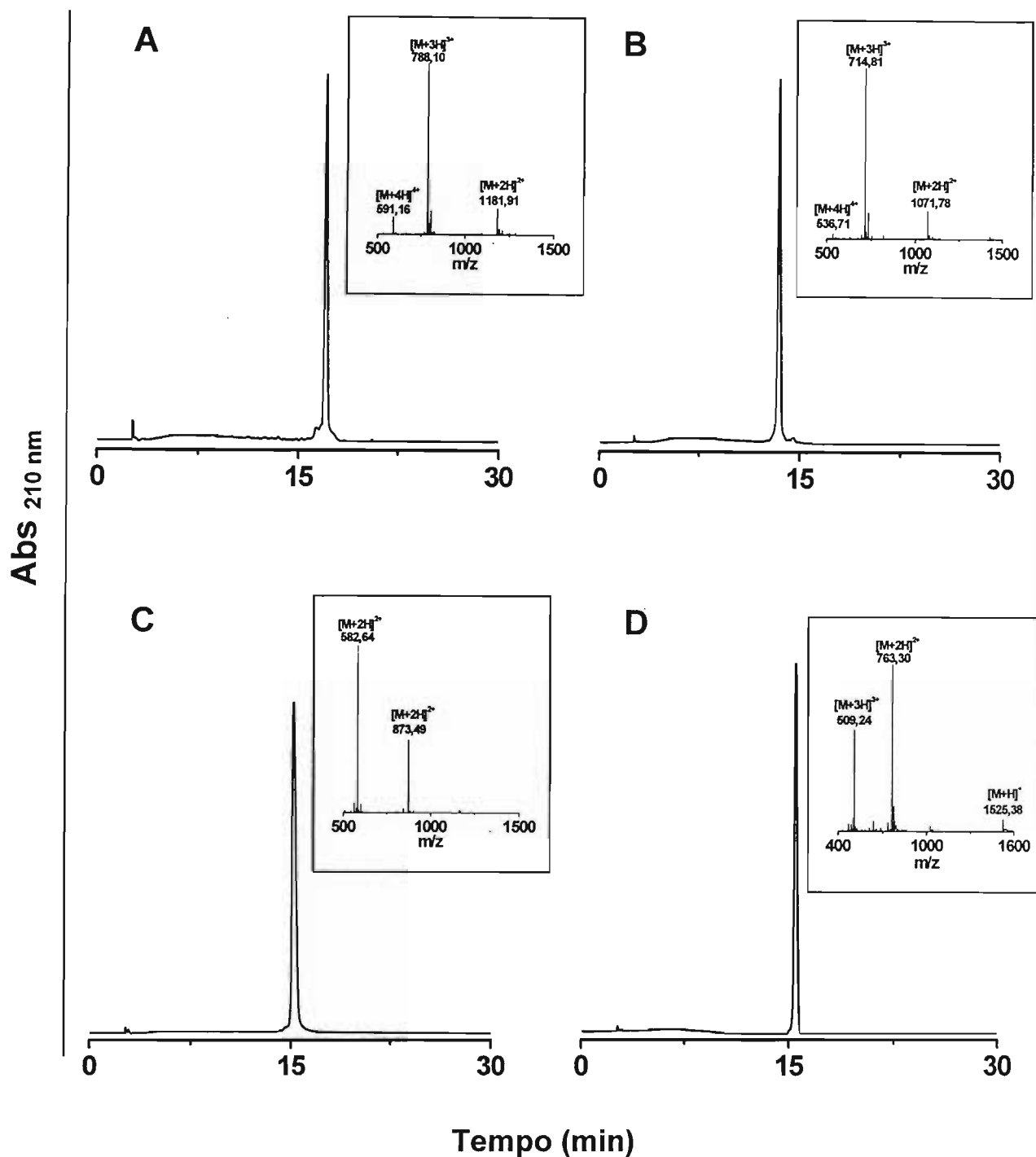


Figura 18: Análises por RP-HPLC da *Chef I* (A) e dos análogos truncados *Chef I* (3-28) (B), *Chef I* (1-20) (C) e *Chef I* (3-20) (D) purificados. Condições da LC: Injeção: 0,5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 20%^(A, C) 10%^(B, D) ou ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ :210 nm.

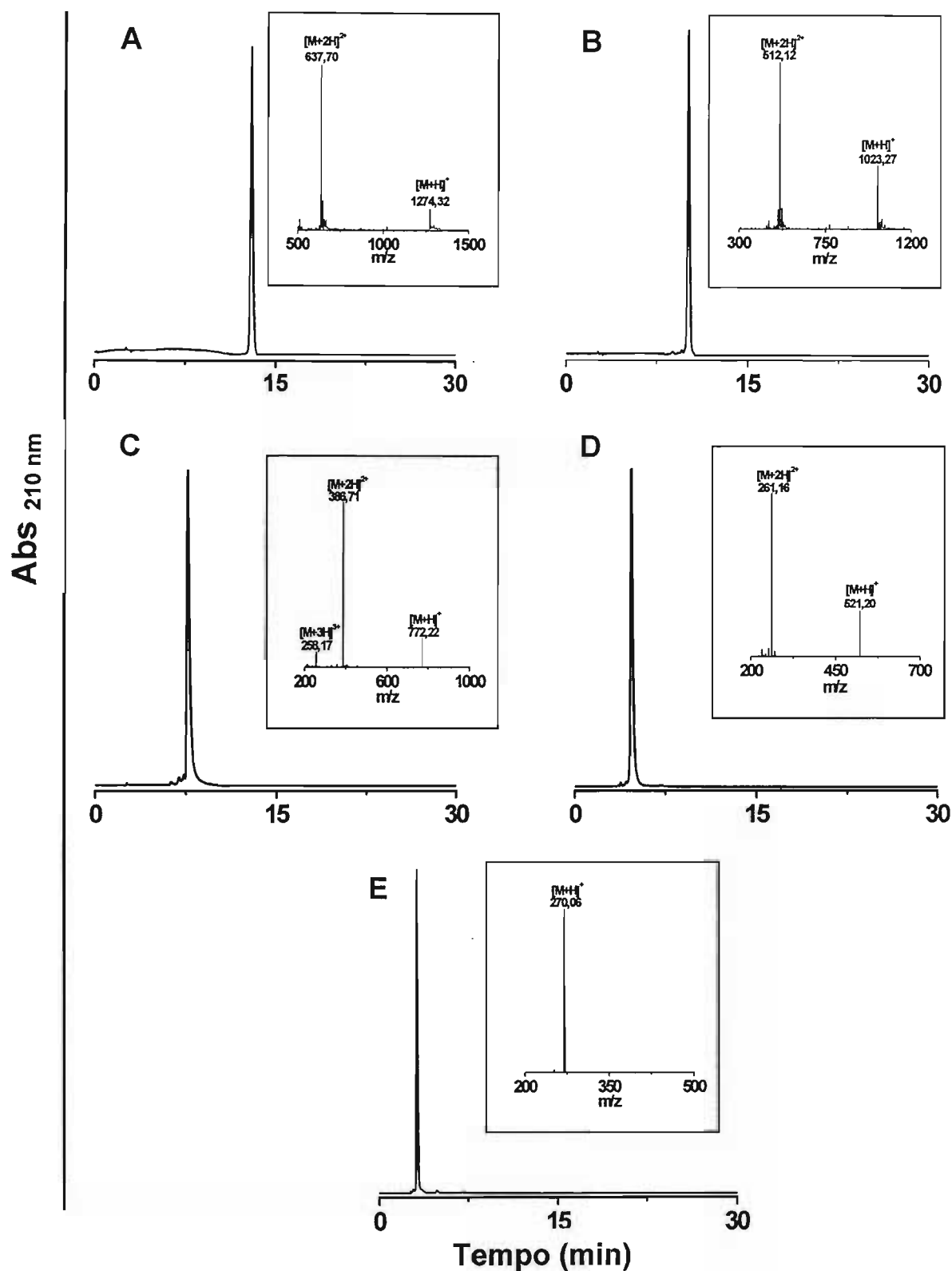


Figura 19: Análises por RP-HPLC dos análogos truncados *Chef I* (6-20) (A), *Chef I* (9-20) (B), *Chef I* (12-20) (C), *Chef I* (15-20) (D) e *Chef I* (18-20) (E) purificados. Condições da LC: Injeção: 0,5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 10% ACN em água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

Chef I também não foi ativa frente a *Aspergillus flavus* e às bactérias Gram negativas testadas, contrariando relato anterior de que: 1) a *Chef I* nativa e o análogo truncado *Chef I* (3-20) sintético apresentavam moderada atividade frente a *A. flavus*; 2) as suas atividades antibacterianas frente a bactérias Gram negativas (como *E. coli*, *Pseudomonas putida* e *P. syringae*), bem como frente a fungos miceliais (como *Aspergillus flavus*), era muito maior do que a sua atividade antifúngica (PARK et al., 2000). As diferenças entre os resultados pode ser explicada por vários fatores: i) o nosso ensaio de microdiluição é muito mais exato do que o ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias em placas de agar empregado por Park e colaboradores (PARK et al., 2000); ii) é difícil saber qual foi o pH utilizado no ensaio realizado por este autores e sabe-se que o pH influencia a atividade antimicrobiana de peptídeos, especialmente dos que possuem alto conteúdo de His (LEE et al., 1997; KACPRZYK et al., 2007); no nosso caso usamos pH 7.5, iii) são esperadas diferenças entre os MICs de um antibiotico ou peptídeo antimicrobiano frente a diferentes cepas de uma mesma espécie, pois tais cepas podem apresentar diferenças na composição proteica-lipídica das membranas celulares (RAJ et al., 1990, BENINCASA et al., 2006).

A *Chef I* apresentou atividade somente frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* (Tabela 6). A atividade frente a *C. albicans* e *S. Cerevisiae*, a deleção do dipeptídeo N-terminal (Gly¹-Tyr²) ou da porção C-terminal (Gly²¹-Gly²⁸) causou redução da atividade de duas ou quatro vezes, respectivamente; no caso da atividade frente *C. tropicalis*, a deleção do dipeptídeo N-terminal (Gly¹-Tyr²) ou da porção C-terminal (Gly²¹-Gly²⁸) diminuiu a atividade foi reduzida em duas vezes. A perda simultanea das porções N- e C-terminais citadas levam à uma redução drástica da atividade. Estes resultados sugeriram que: 1) o dipeptídeo N-terminal tem contribuição moderada na atividade de *Chef I* frente aos fungos testados; 2) a porção Gly²¹-Gly²⁸ C-terminal tem contribuição significativa nessa atividade; 3) as 6 repetições de GGH não são suficientes para exibir a atividade total da *Chef I*, como relatado por Park e colaboradores (PARK et al., 2000).

Tabela 6: Concentrações mínimas inibitórias da *Chef I* e dos análogos truncados *Chef I* (3-28), *Chef I* (1-20), *Chef I* (3-20), *Chef I* (6-20), *Chef I* (9-20), *Chef I* (12-20), *Chef I* (15-20) e *Chef I* (18-20) frente a leveduras.

Peptídeo	Seqüência	MIC (μ M)		
		<i>Candida albicans</i> MDM8	<i>Candida tropicalis</i> Squibb 1600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601
<i>Chef I</i>	GYGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG	12,5	1,6	12,5
<i>Chef I</i> (3-28)	GGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG	25,0	3,1	25,0
<i>Chef I</i> (1-20)	GYGGHGGHGGHGGHGGHGGH	50,0	3,1	50,0
<i>Chef I</i> (3-20)	GGHGGHGGHGGHGGHGGH	100,0	6,2	50,0
<i>Chef I</i> (6-20)	GGHGGHGGHGGHGGH	> 100,0	25,0	> 100,0
<i>Chef I</i> (9-20)	GGHGGHGGHGGH	> 100,0	100,0	> 100,0
<i>Chef I</i> (12-20)	GGHGGHGGH	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I</i> (15-20)	GGHGGH	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I</i> (18-20)	GGH	> 100,0	> 100,0	> 100,0

MIC = concentração que causa 100% da inibição do crescimento da levedura.

Foi intrigante observar que o análogo truncado 3-28 apresenta ação antifúngica sendo formado exclusivamente de um aminoácido neutro (18 Gly) e outro básico (8 His). De fato, a maior parte dos AMPs apresenta resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos essenciais para a permeabilização da membrana (SILVA et al.; 2000; MACHADO et al., 2007).

Após o ensaio de atividade de *Chef I* contra *C. albicans* MDM8, o total das amostras (100 μ L) que apresentaram atividade fungistática no ensaio de microdiluição, foram plaqueadas em agar Sabouraud e deixadas em incubação a 37°C por 24 h para observar se *Chef I* apresentava ação fungicida. Após a incubação, observamos que as placas de ágar Sabouraud não apresentavam colônias a partir da concentração 50 μ M (4 MIC) indicando que *Chef I* apresentava ação candidicida frente a *C. albicans* MDM8 nessa concentração.

4.1.2. Efeito da amidação sobre a atividade antifúngica da *Chef I*

Tem sido descrito que a carboxiamidação de alguns AMPs leva ao aumento de suas atividades biológicas (SHALEV et al., 2002; SFORÇA et al., 2005). É possível que o aumento decorra da alteração das propriedades ou da maior estabilização de suas conformações ativas. De fato, estudos realizados com o peptídeo PMAP-23, da família das catelicidinas, mostraram que, enquanto que a sua forma amidada pode atravessar as membranas externa e interna de *E. coli*, a sua forma não amidada (carboxila livre) só é capaz de atravessar a sua membrana externa (PARK et al., 2006). A amidação da tripticina dobrou a sua atividade contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* e *S. aureus* (YANG et al., 2006). Similarmente, a amidação dos fragmentos 33-61 e 40-61 da cadeia α da hemoglobina quadruplicou a atividade frente a *C. albicans* (MACHADO et al., 2007).

Com base nestes exemplos, decidimos sintetizar *Chef I* na sua forma amidada (*Chef Ia*) e os análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a*.

a) Tentativa inicial de síntese da *Chef I* na resina CLEAR amida

A síntese foi realizada por SPFS manual a 60°C usando protocolos estabelecidos por nós (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2001; 2004; SOUZA et al., 2004; LOFFREDO et al., 2008) (Tabela 3) e a resina CLEAR amida (KEMPE; BARANY, 1996). O TBTU foi usado como reagente acoplador visando evitar a possível epimerização das His e Tyr (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997; SOUZA et al., 2004; LOFFREDO et al., 2008). O alongamento da seqüência ocorreu sem problemas; reacoplamentos só foram necessários para a incorporação de His²⁷, Gly²⁶, Gly²⁵, Gly¹⁶ e Gly¹⁰. Foram coletadas amostras de peptidil-CLEAR amida após as incorporações da His²⁰ e da Gly¹⁰ à cadeia peptídica em crescimento para serem analisadas por espectroscopia Raman.

A clivagem da resina e desproteção total de 500 mg da peptidil-resina forneceu o peptídeo bruto (72,15 mg). As suas análises por RP-HPLC (Figura 20) e LC/ESI-MS (Figura 21) do peptídeo clivado da resina CLEAR amida e desprotegido totalmente

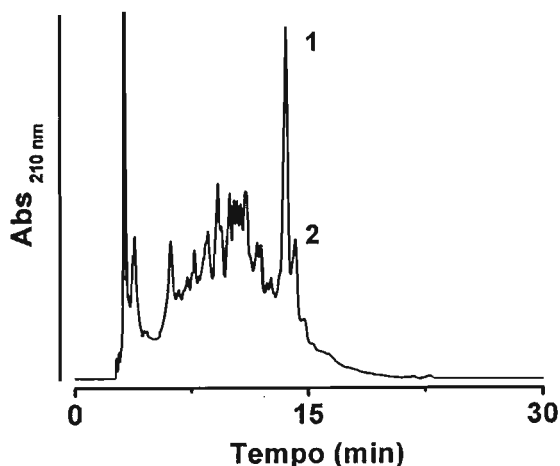


Figura 20: Análise por RP-HPLC do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *Chef I*-CLEAR amida. Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 30% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

mostraram que: 1) o componente 1 (**Figura 20**) continha o peptídeo desejado ($G^1YGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG^{28}-OH$) e análogos com até quatro Gly adicionais (**Figura 21C**); o componente 2 também continha o peptídeo desejado e análogos Gly e/ou His adicionais (**Figuras 20 e 21D**).

Estes resultados demonstraram que o uso de TBTU e DIPEA nas reações de acoplamento não é adequado à síntese de seqüências ricas em Gly via estratégia Fmoc, pois o Fmoc de Fmoc-Gly é muito lábil a bases, favorecendo a formação de peptídeos com Gly adicionais (BODANSZKY et al., 1979). Surpreendente foi a observação da presença de um peptídeo contaminante contendo uma His adicional, pois, ao contrário da Gly, a His(Trt) possui uma cadeia lateral bastante volumosa que deveria tornar o Fmoc de Fmoc-His(Trt)-OH mais estável a bases orgânicas.

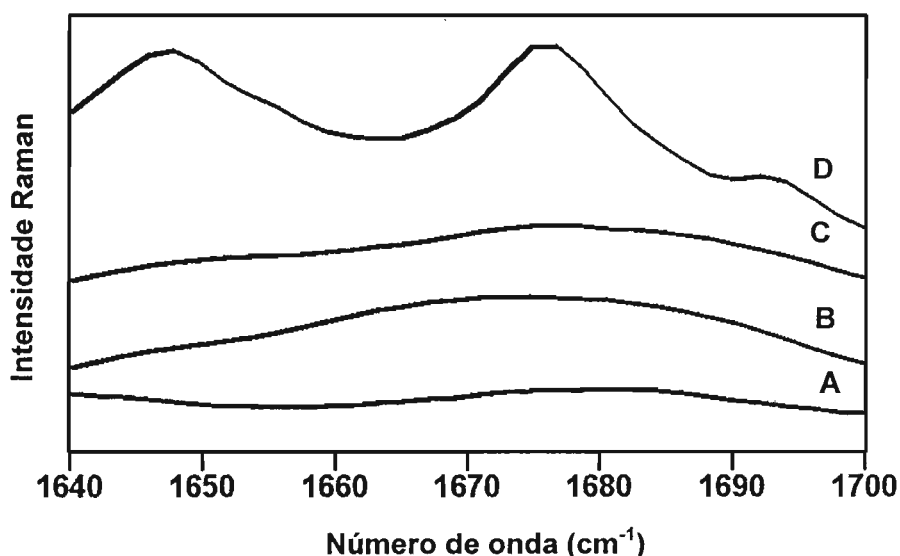


Figura 22. Espectros NIR-FT-Raman na região amida I ($1640-1700\text{ cm}^{-1}$) da resina CLEAR amida (A) e das peptidil-resinas *Chef I (10-28)-CLEAR amida* (B), *Chef I (20-28)-CLEAR amida* (C) e *Chef I-CLEAR amida* (D).

Os espectros na região amida I ($1640-1700\text{ cm}^{-1}$) das peptidil-resina *Chef I (20-28)-CLEAR amida* e a *Chef I (10-28)-CLEAR amida* revelaram a presença de banda discretas em 1675 cm^{-1} , indicativa de estrutura em folha β pregueada, que se acentua no

espectro da peptidil-resina *Chef I-CLEAR amida*. O espectro de *Chef I-CLEAR amida* também apresentou uma banda em 1648 cm^{-1} indicativa de uma hélice semelhante à da poliglicina II (**Figura 22**; GUPTA et al., 1975). Em conjunto estes resultados confirmaram que a cheferina I tem tendência à agregação durante a SPFS passo a passo e que o uso da CLEAR amida foi crucial para minimizar o fenômeno e permitir a síntese dos peptídeos desejados.

b) Síntese da *Chef Ia* e dos análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a*

Com base na experiência anterior, a síntese foi realizada manualmente a 60°C utilizando o protocolo da **Tabela 3** a partir de 1 g de resina CLEAR amida. Desta vez, os acoplamentos dos aminoácidos não apresentaram problemas, com exceção da Gly¹⁹ e Gly⁶ (décimo resíduo e vigésimo terceiro resíduos acoplados à resina) que tiveram de ser reacoplados uma e duas vezes, respectivamente. No acoplamento deste último e nos acoplamentos dos resíduos subsequentes foi usado o sistema de solvente 0,8 M LiCl em 20% DMSO/NMP, com vistas a evitar agregação intercadeias em crescimento [o uso de sais caotrópicos, tais como o cloreto de lítio (LiCl), são recomendados nestes casos (THALER et al., 1991)]. Durante a síntese, foram retiradas alíquotas de 0,65 g e 1,0 g de peptidil-resina correspondentes aos análogos truncados *Chef I (3-28)-CLEAR amida* e *Chef I (6-28)-CLEAR amida*, respectivamente. A peptidil-resina restante foi alongada com vistas à obtenção da *Chef I-CLEAR amida*. Terminado o processo ela foi seca à vácuo e pesada (1,0 g).

Todas as três peptidil-resinas obtidas foram submetidas ao desligamento do peptídeo da resina e desproteção total para a obtenção dos brutos correspondentes (**Tabela 7**). As condições usadas nas suas purificações, os rendimentos das mesmas e graus de pureza da *Chef Ia*, dos análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I(6-28)* estão mostrados na **Tabela 8**. Na **Figura 23** são mostrados os perfis de RP-HPLC de *Chef Ia* e dos análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* purificados. Eles revelam altos

graus de pureza (acima de 95%, **Tabela 9**), também confirmados por LC/ESI-MS. Os dados descritos na **Tabela 9** comprovam as identidades dos três peptídeos e descreve os seus conteúdos peptídicos.

Tabela 7: Quantidades de peptidil-CLEAR amida e de peptídeos brutos obtidos a partir delas.

Peptidil-resina	Massa de peptidil-resina (mg)	Massa de peptídeo bruto obtido (mg)
<i>Chef I-CLEAR amida</i>	508	189
<i>Chef I (3-28)-CLEAR amida</i>	506	208
<i>Chef I (6-28)-CLEAR amida</i>	403	160

Tabela 8: Condições de purificação dos peptídeos brutos correspondentes à *Chef Ia* e aos análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* e rendimentos das purificações.

Peptídeo	Gradiente linear de purificação (%B/90 min)	Peptídeo injetado (mg)	Peptídeo purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)
<i>Chef Ia</i>	15 - 45	150	64	42
<i>Chef I (3-28)a</i>	5 - 35	204	112	55
<i>Chef I (6-28)a</i>	0 - 30	155	79	47

Purificação: Solvente A: 0,1% TFA/água; solvente B: 20% ACN/água contendo TFA 0,09%; fluxo 9 mL/min, λ : 210 nm.

Tabela 9: Caracterização da *Chef Ia* e dos análogos truncados *Chef I(3-28)a* e *Chef I (6-28)a*.

Peptídeo	Grau de * Pureza (%)	LC/ESI-MS (Teórico/obtido)	Conteúdo peptídico (%)
<i>Chef Ia</i>	97	1180,5/1181,5 [M+2H] ²⁺	60
<i>Chef I (3-28)a</i>	95	1070,9/1071,3 [M+2H] ²⁺	56
<i>Chef I (6-28)a</i>	95	945,4/945,9 [M+2H] ²⁺	56

* Refere-se às análises em sistemas ACN/água contendo TFA.

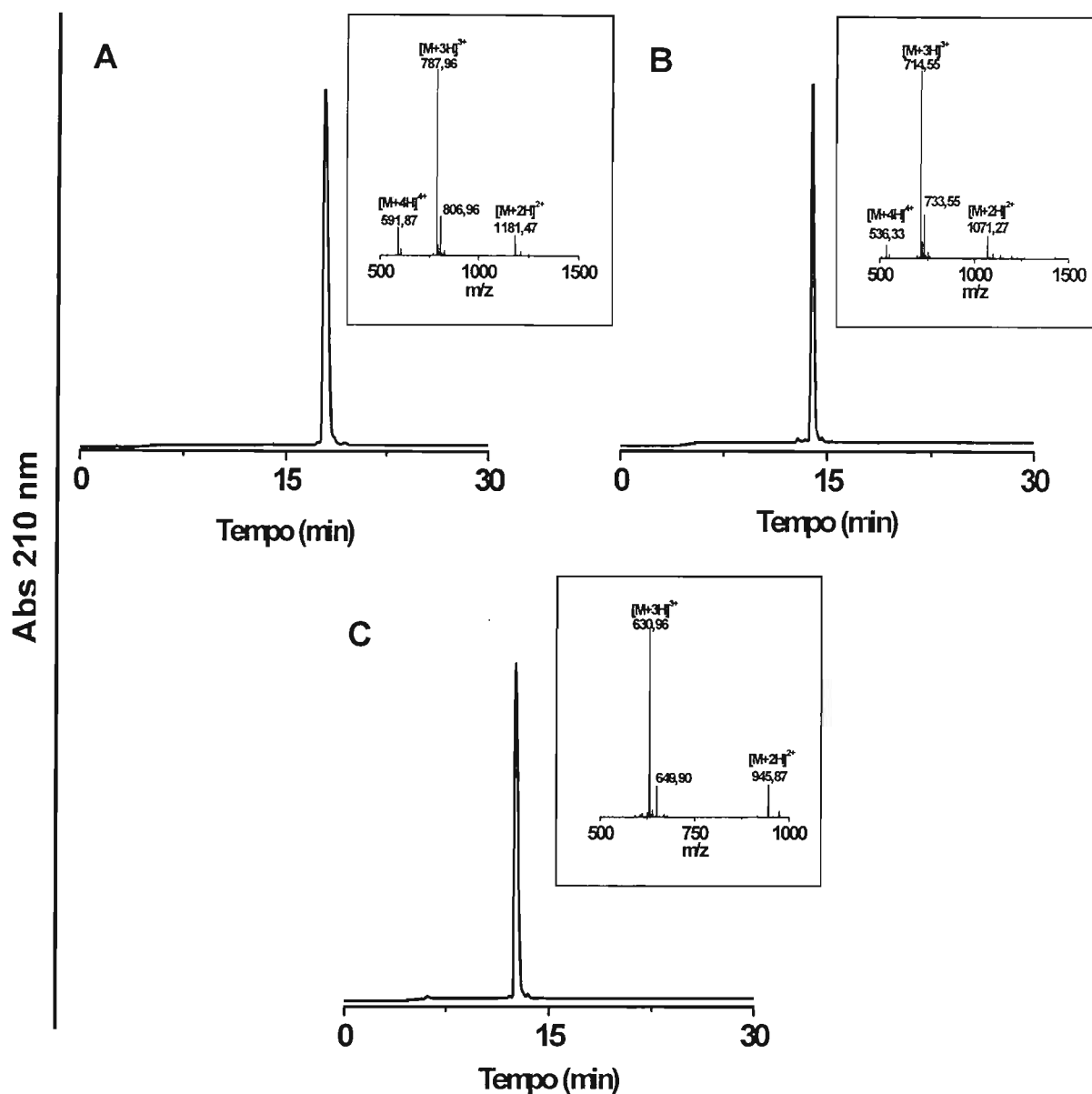


Figura 23: Análises por RP-HPLC de *Chef Ia* (A) e seus análogos truncados *Chef I* (3-28)a (B) e *Chef I* (6-28)a (C) purificados. Condições: Injeção: 2 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 10% ACN em água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

c) Atividade antimicrobiana

A *Chef Ia*, *Chef I* (3-28)a e *Chef I* (6-28)a purificados também foram testados frente as bactérias Gram negativas (*E. coli* SBS 363, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502, *Enterobacter cloacae* K12, *Serratia marcescens* CDC 4124), Gram positivas

(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* A270, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433), leveduras (*Candida albicans* MDM8, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) e fungos miceliais (*Aspergillus fumigatus* NCPF 2109, *Aspergillus flavus* NCPF 2199).

Da mesma forma que os peptídeos com carboxila livre, a *Chef Ia*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* não foram ativos frente as bactérias Gram negativas e Gram positivas e contra os fungos miceliais (MICs > 100 μ M). Foi interessante observar que frente às leveduras testadas (**Tabela 10**), os análogos truncados apresentaram a mesma atividade que a *Chef Ia* [exceto no caso de *Chef I (6-28)a* na atividade contra *S. cerevisiae*], confirmando que a porção N-terminal da molécula tem menor importância do que a porção C-terminal na expressão da atividade antifúngica, que *Chef I (3-28)a* mimetiza *Chef I* e que *Chef I (6-28)a* possa corresponder à porção mínima ativa de *Chef Ia*. Por outro lado, se tornou evidente que, apesar de a amidação não ter levado a um aumento da atividade antifúngica de *Chef I*, ela causou aumento significativo (2-4vezes) da atividade do análogo *Chef I (3-28)* (SHALEV et al., 2002, PARK et al., 2006, MACHADO et al., 2007).

Tabela 10: Concentrações mínimas inibitórias da *Chef Ia* e dos análogos truncados *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* frente a leveduras.

Peptídeo	MIC (μ M)		
	<i>Candida albicans</i> MDM8	<i>Candida tropicalis</i> Squibb 1600	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601
<i>Chef Ia</i>	12,5	1,6	6,2
<i>Chef I (3-28)a</i>	12,5	1,6	6,2
<i>Chef I (6-28)a</i>	12,5	1,6	12,5

Tendo observado que *Chef I*, seu análogo amidado *Chef Ia* e alguns de seus análogos truncados eram ativos contra *Candida albicans* MDM8 e *Candida tropicalis* Squibb 1600, todos os peptídeos sintéticos foram testados frente a outras cepas de

Candida, sendo uma delas sensível (*C. albicans* ATCC 90028) e outra resistente (*C. albicans* HU 168) a fluconazol (Tabela 11).

Tabela 11: Concentrações mínimas inibitórias (MICs) dos peptídeos sintetizados frente a outras cepas de *Candida albicans*.

Peptídeo	MIC (μM)	
	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	<i>Candida albicans</i> HU 168
<i>Chef I</i>	> 100	25
<i>Chef I (3-28)</i>	> 100	100
<i>Chef I (1-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (3-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (6-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (9-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (12-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (15-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef I (18-20)</i>	> 100	> 100
<i>Chef Ia</i>	> 100	25
<i>Chef I (3-28)a</i>	> 100	25
<i>Chef I (6-28)a</i>	> 100	50

Para a nossa surpresa, nenhum dos peptídeos foi ativo contra *C. albicans* ATCC 90028 (MICs > 100 μM). Por outro lado, a *Chef I* e seus análogos *Chef Ia* e *Chef I (3-28)a* apresentaram atividade idêntica frente a *C. albicans* resistente a fluconazol (MICs = 25 μM). *Chef I (6-28)a* e *Chef I (3-28)* apresentaram atividades duas e quatro vezes menores, respectivamente. Como já descrito na Introdução, o mecanismo inicial da ação antimicrobiana dos peptídeos catiônicos compreende a interação hidrofóbica e

eletrostática entre o peptídeo e a membrana do microorganismo alvo (LEE et al., 2003). Assim, a possível explicação para estes resultados seria o fato de que estas cepas de *C. albicans* apresentarem composições de membranas celulares diferentes e, portanto, requererem conformações diferentes para o desencadeamento de atividade dos peptídeos aos quais foram expostos (RAJ et al., 1990, BENINCASA et al., 2006).

Após o ensaio de atividade de *Chef Ia* contra *C. albicans* MDM8, o total das amostras (100 µL) que apresentaram atividade fungistática no ensaio de microdiluição, foram plaqueadas em agar Sabouraud e deixadas em incubação a 37°C por 24 h para observar se *Chef I* apresentava ação fungicida. Após a incubação, observamos que as placas de ágar Sabouraud não apresentavam colônias a partir da concentração 25 µM (2 MIC) indicando que *Chef Ia* apresenta ação candidicida frente a *C. albicans* MDM8 nessa concentração.

4.1.3. Efeito da força iônica sobre a atividade antifúngica de análogos da *Chef I*

Tem sido relatado que a atividade antimicrobiana de alguns AMPs é afetada pela presença de cátions divalentes como o Mg²⁺ e o Ca²⁺ (em concentrações fisiológicas de 1-2 mM) ou cátions monovalentes como o Na⁺ e K⁺ (em concentrações ~ 100 mM). Tal relato gerou a discussão sobre se era correto denominar estes peptídeos de antimicrobianos ou se esta denominação deveria ser reservada somente para os peptídeos que tem a capacidade de matar microorganismos em condições fisiológicas. Entretanto, tem sido descritos vários AMPs cuja atividade é afetada pela força iônica [por exemplo, a lactoferricina B (JONES et al., 1994), a histatina-5 (HELMERHORST et al., 1997) e o peptídeo NP-1, entre outros (SELSTED et al., 1985)].

Como a *Chef I* e seus análogos apresentam na sua seqüência quase que exclusivamente os aminoácidos Gly e His, sendo que este último aquele aminoácido que confere ao peptídeo as cargas necessárias para a interação eletrostática com a membrana da célula alvo, decidimos investigar se o uso de alta força iônica poderia

influenciar as suas atividades antifúngicas.

A **Tabela 12** descreve as MICs obtidas frente a *C. albicans* MDM8 em diferentes concentrações de NaCl. Apesar de as atividades antifúngicas de todos os peptídeos testados terem sido grandemente afetadas pelo aumento da força iônica do meio (a 4,5 mM três deles se tornaram inativos; a 34,2 mM todos perderam a atividade), a *Chef Ia* foi menos influenciável. É possível que isto se deva ao fato deste peptídeo conter mais His.

Tabela 12: Efeito da força iônica sobre a atividade antimicrobiana contra *C. albicans* MDM8.

Peptídeo	NaCl em meio PDB (mM)						
	Sem sal*	4,3	8,6	17,1	34,3	68,5	137,0
	MIC (μ M)						
<i>Chef Ia</i>	12,5	12,5	25,0	50,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I (3-28)a</i>	12,5	25,0	50,0	100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I (6-28)a</i>	12,5	50,0	100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I (3-28)</i>	25,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I (1-20)</i>	50,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0
<i>Chef I (3-20)</i>	100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0	> 100,0

* Condição dos ensaios anteriores

O fato de *Chef Ia* ter tido a sua atividade antifúngica influenciada pela força iônica do meio não nos causou estranheza, pois tal característica é bastante comum entre os AMPs (THEVISSSEN et al., 2007; ZAIYOU, 2007) e era esperada para um AMP rico em Gly e His, contendo apenas uma Tyr e que provavelmente por isso interage com membranas exclusivamente por interação eletrostática. Tal observação sugeriu que *Chef Ia* apresente potencialidade limitada de uso terapêutico: aplicação tópica ou controle de crescimento de fungos em água doce.

É importante informar que os resultados relatados não estão associados à insolubilidade dos peptídeos em qualquer uma das condições de ensaio empregadas.

4.1.4. Efeito do Zn^{2+} sobre a atividade antimicrobiana de *Chef I* e de seus análogos amidados

Nos últimos anos, foi descrito que o Zn^{2+} podia aumentar a atividade antimicrobiana de vários peptídeos e proteínas ricas em His (RYDENGARD et al., 2006; 2007; DASHPER et al., 2005; WANG et al., 2007), bem como o fato de que os peptídeos que apresentavam o motivo conservado (HEXXHXXGXXH) presente nas zinco-endopeptidases podiam coordenar este íon metálico graças às His presentes nas suas seqüências (BODE et al., 1993).

Tendo a *Chef I* e seus análogos várias His que poderiam coordenar metais como o Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , decidimos examinar a atividade da *Chef Ia* (análogo tão potente quanto *Chef I*, porém, resistente à ação de carboxipeptidases) sobre *C. albicans* MDM8 em concentrações variadas de $ZnCl_2$. Os testes foram realizados em meio PDB (sem NaCl) usando uma solução 100 μM do sal de zinco como controle, já que foi proposto que o Zn^{2+} poderia exibir atividade antimicrobiana devido à sua toxicidade (AARESTRUP et al., 2004). Neste caso, não ocorreu inibição do crescimento da levedura.

Na **Tabela 13** são mostrados os resultados dos testes realizados com a *Chef Ia* usando concentrações variadas de $ZnCl_2$ (5, 10, 25, 50 e 100 μM). Observa-se que em presença de 5 μM de $ZnCl_2$ a atividade contra *C. albicans* MDM8 foi 4 vezes superior àquela apresentada pelo peptídeo na ausência de Zn^{2+} . Em concentrações superiores a 10 μM $ZnCl_2$, o aumento da atividade contra *C. albicans* foi de 8 vezes.

Tabela 13: Efeito do $ZnCl_2$ sobre a atividade antimicrobiana de *Chef Ia* contra *C. albicans* MDM8.

Peptídeo MIC (μM)	Sem $ZnCl_2$	$ZnCl_2$ em meio PDB (μM)				
		5	10	25	50	100
<i>Chef Ia</i>	12,5	3,1	1,6	1,6	1,6	1,6

Posteriormente, medimos as atividades antifúngicas de *Chef I* e de seus análogos *Chef Ia*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* contra as cepas de *C. albicans* MDM8, ATCC 90028 e HU 168 na ausência e presença de $ZnCl_2$ 10 μM . Não foi examinado o efeito do Zn^{2+} na atividade frente a cepa de *S. Cerevisiae*, pois por si o metal se mostrou tóxico a ela.

Na **Tabela 14** observamos que o Zn^{2+} aumentou quatro vezes a atividade de *Chef I*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* contra *C. albicans* MDM8. Entretanto, os dois análogos foram duas vezes menos ativos do que *Chef Ia*. Com respeito à atividade contra *C. albicans* ATCC 90028, observamos que *Chef Ia* e *Chef I (3-28)a* se tornaram ativos contra esta cepa devido a que a coordenação com o Zn^{2+} estabiliza estruturas que interagem melhor com. Com respeito à atividade contra *C. albicans* HU 168 resistente a fluconazol, observamos que *Chef Ia* teve a sua atividade aumentada 8 vezes e *Chef I*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* se tornaram 4 vezes mais ativos.

Tabela 14: Efeito de $ZnCl_2$ 10 μM sobre a atividade da *Chef I* e de seus análogos amidados *Chef Ia*, *Chef I (3-28)a* e *Chef I (6-28)a* contra outras cepas de *Candida albicans*.

Peptídeo	MIC (μM)					
	<i>Candida albicans</i> MDM8		<i>Candida albicans</i> ATCC 90028		<i>Candida albicans</i> HU 168	
	sem Zn^{2+}	com Zn^{2+}	sem Zn^{2+}	com Zn^{2+}	sem Zn^{2+}	com Zn^{2+}
<i>Chef Ia</i>	12,5	1,6	> 100	6,2	25	3,1
<i>Chef I (3-28)a</i>	12,5	3,1	> 100	25	25	6,2
<i>Chef I (6-28)a</i>	12,5	3,1	> 100	> 100	50	12,5
<i>Chef I</i>	12,5	3,1	> 100	> 100	25	6,2

[$ZnCl_2$] = 10 μM

Nossos resultados indicaram que os peptídeos estudados tiveram suas atividades antifúngicas aumentadas devido a suas coordenações com o Zn^{2+} , o que invariavelmente diminui a variabilidade conformacional destes compostos em solução e propicia uma melhor interação com a membrana plasmática da levedura, auxiliando no desencadeamento da atividade (MELINO et al., 1999). De fato, nestas condições a *Chef Ia* e o análogo *Chef I (3-28)a* se tornaram ativos frente à cepa de *C. albicans* ATCC 90028.

Em vista que *Chef Ia* se mostrou como o melhor composto com atividade contra as cepas de fungos estudadas, foi mais estável à força iônica que a *Chef I* e os outros análogos e teve a sua atividade aumentada pela presença do Zn^{2+} , decidimos utilizá-lo nos estudos a serem discutidos em diante.

4.1.5. Atividade hemolítica de *Chef Ia*

A atividade hemolítica é um dos ensaios comumente usados para avaliar a toxicidade das moléculas, já que a distribuição de qualquer droga no nosso corpo é realizada através do fluxo sanguíneo. Usualmente, os ensaios hemolíticos são realizados em meios de força iônica alta que simulem as condições isotônicas necessárias à manutenção da integridade dos eritrócitos (PARK et al., 1994, IWAHORI et al., 1997, MACHADO et al., 2007). Estas podem “atenuar” a toxicidade dos compostos testados. Assim, o uso de tampão com baixa força iônica e osmolaridade corrigida com glicose (também chamado de tampão glicose-fosfato isotônico; IGP; HELMERHORST et al., 1999a), se faz necessário para avaliar a verdadeira toxicidade dos AMPs (LEHRER et al., 1983; LEE et al., 1997; SHIN et al., 2002; VELDHUIZEN et al., 2008).

A **Figura 24** mostra que *Chef Ia* não apresentou atividade hemolítica em eritrócitos suspensos em PBS. Sabendo que o peptídeo em questão é um AMP rico em Gly e His, cuja ação antifúngica é influenciada pela força iônica, a atividade hemolítica também foi medida frente a eritrócitos suspensos em IGP (meio isento de NaCl). Foi

observado apenas 8,3% e 18,0% de hemólise em 50 e 100 μM de *Chef la*, respectivamente (**Figura 24**). Portanto, no MIC da *Chef la* frente a *C. albicans* (12,5 μM), a hemólise é praticamente nula.

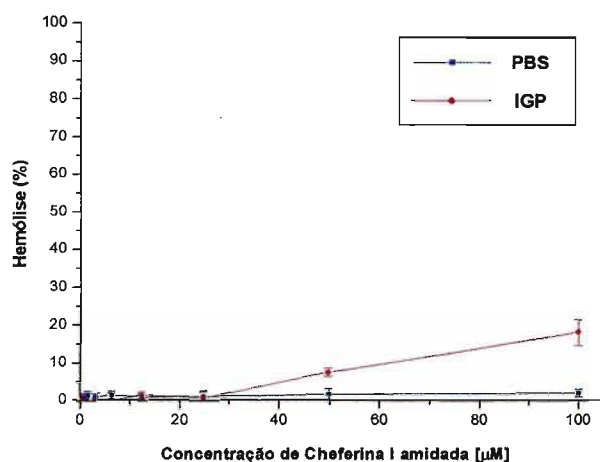


Figura 24: Atividade hemolítica da *Chef la* em tampão fosfato salino (PBS) e tampão glicose-fosfato isotônico (IGP).

4.1.6. Atividade fungicida de *Chef la*

Querendo avaliar se *Chef la* apresentava ação candidacida, decidimos realizar uma estudo da cinética de ação de *Chef la* contra *C. albicans* MDM8.

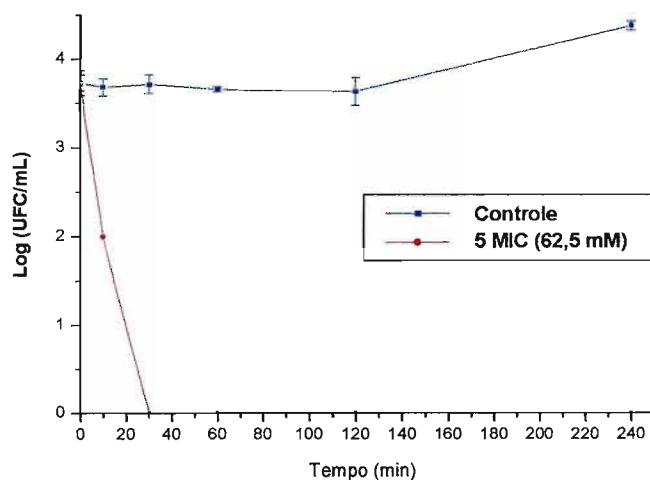


Figura 25: Cinética de morte da *Candida albicans* MDM8 frente a 5 MIC (62,5 μM) de

Chef Ia.

Na **Figura 25** observamos que *Chef Ia* na concentração de 62,5 μ M (5 MIC) apresenta atividade candidacida de ação rápida (com 20 e 30 minutos de incubação, 50 e 100% da população já se encontrava inviável, respectivamente).

Este resultado nos leva a crer que *Chef Ia* tem um alto potencial como agente antimicrobiano de uso tópico contra a candidíases devido à sua alta eficiência, boa atividade e baixa toxicidade.

4.1.7. Mecanismo de ação de *Chef Ia*

a) Permeabilização da membrana de *Candida albicans* MDM8

O teste foi realizado usando o kit *Live/Dead bacLight viability* L-7007 que comumente é usado para verificar a viabilidade celular das bactérias e fungos (MACHADO et al., 2007). Após 18 horas de incubação do peptídeo com a levedura, observamos que a quantidade de células no frasco de incubação tinha diminuído devido possivelmente à lise e morte celular. De fato, como mostra a **Figura 26**, no controle negativo (água) somente o SYTO 9 foi capaz de penetrar na célula (é sabido que este marcador fluorescente consegue atravessar a membrana plasmática íntegra e se ligar ao DNA da levedura enquanto que o mesmo não ocorre com o iodeto de propídeo que só é capaz de penetrar na célula e se ligar no DNA se a membrana plasmática já tiver sido permeabilizada). No controle positivo (isopropanol), ambos os marcadores fluorescentes penetraram e se ligaram ao DNA celular (observamos que as células possuíam maior quantidade de SYTO 9 no seu interior). Como no controle positivo, o iodeto de propídeo foi capaz de penetrar as células incubadas com 31,13 μ M (2,5 x MIC) de *Chef Ia*.

Estes resultados indicaram que em tempo prolongado de incubação e em alta concentração, a *Chef Ia* pode exibir ação antifúngica por permeabilização de membrana como fazem os AMPs melitina, magainina, cecropina, PMAP-23, indolicidina (JENSSEN et al., 2006; BECHINGER; LOHNER, 2008), tenecina-3, buforina II e histatina- 5

(HELMERHORST et al., 1999; KIM et al., 2001; TAKESHIMA et al., 2003).

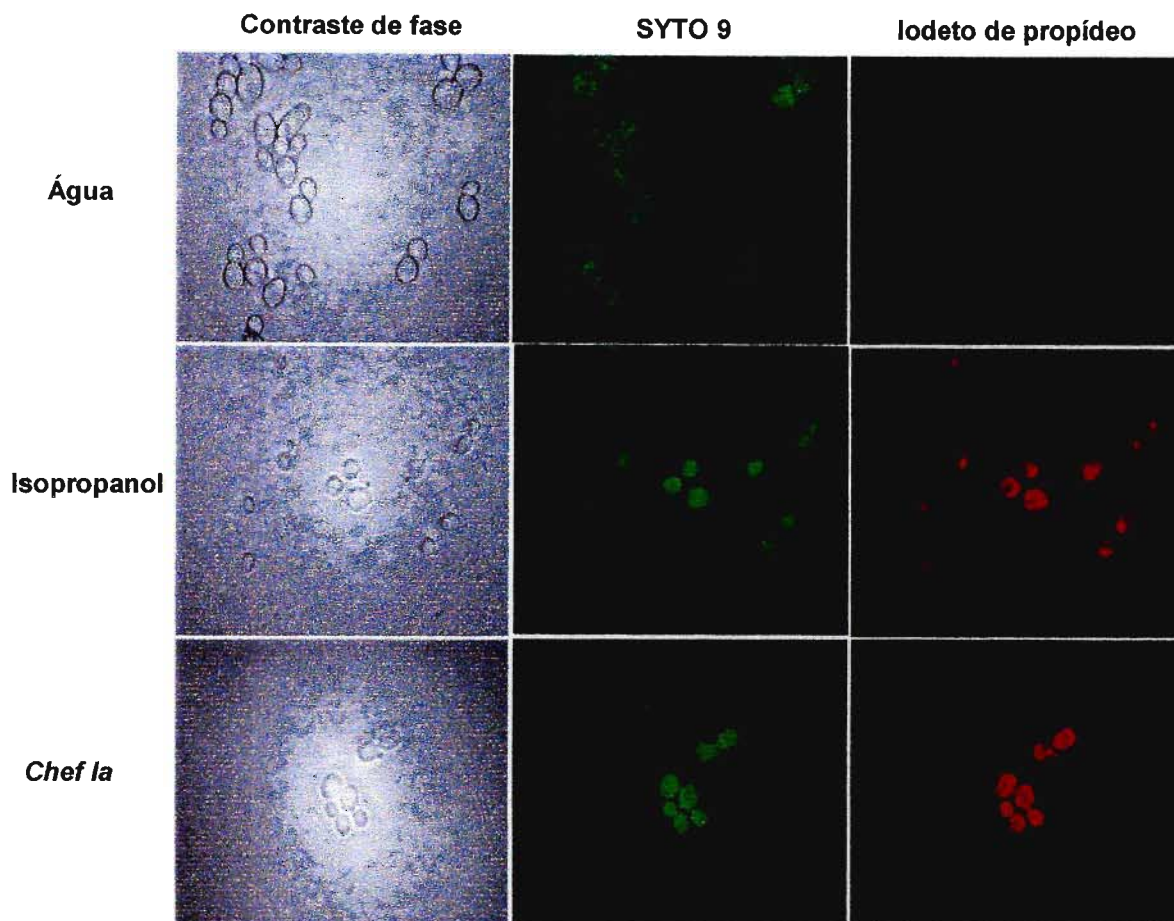


Figura 26: Permeabilização da membrana plasmática de *Candida albicans* MDM8 na presença de *Chef Ia* (2,5 x MIC).

b) Marcação de *Chef Ia* com 5(6)-carboxifluoresceína (FAM-*Chef Ia*)

Diante do resultado descrito acima, decidimos marcar a *Chef Ia* com um grupo fluorescente, pois assim poderíamos investigar se o análogo obtido teria como alvo a membrana plasmática ou se ele se translocaria através dela para atingir um alvo intracelular.

A marcação foi realizada a partir de *Chef I-CLEAR amida* usando a FAM ao invés do isotiocianato de fluoresceína (FITC; WEBER et al., 1998, FISCHER et al., 2003). A **Tabela 15** descreve os resultados obtidos na síntese, purificação e caracterização do peptídeo. O teste frente a *C. albicans* MDM8 revelou MIC 4 vezes menor (3,13 μ M) ao da

Chef Ia (12,5 μM), indicando que a alta hidrofobicidade da FAM alterou as propriedades do peptídeo original, dado que concorda com outros já descritos sobre marcados com compostos fluorescentes que tiveram as atividades alteradas (SZETO et al., 2005).

Tabela 15: Purificação e caracterização de FAM-*Chef Ia* purificada.

Peptidil-resina (mg)	Peptídeo bruto (mg)	Peptídeo purificado (mg)	Rendimento da purificação (%)	Pureza (%)	LC/ESI-MS (Teórico/obtido)	Conteúdo peptídico (%)
252	65,8	10,7	16,3	97	1360,5/1360,6 [M+2H] ²⁺	98%

Condições da purificação: Coluna: C18 preparativa, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-35% de B em 90 min, fluxo: 10 mL/min, λ : 210 nm.

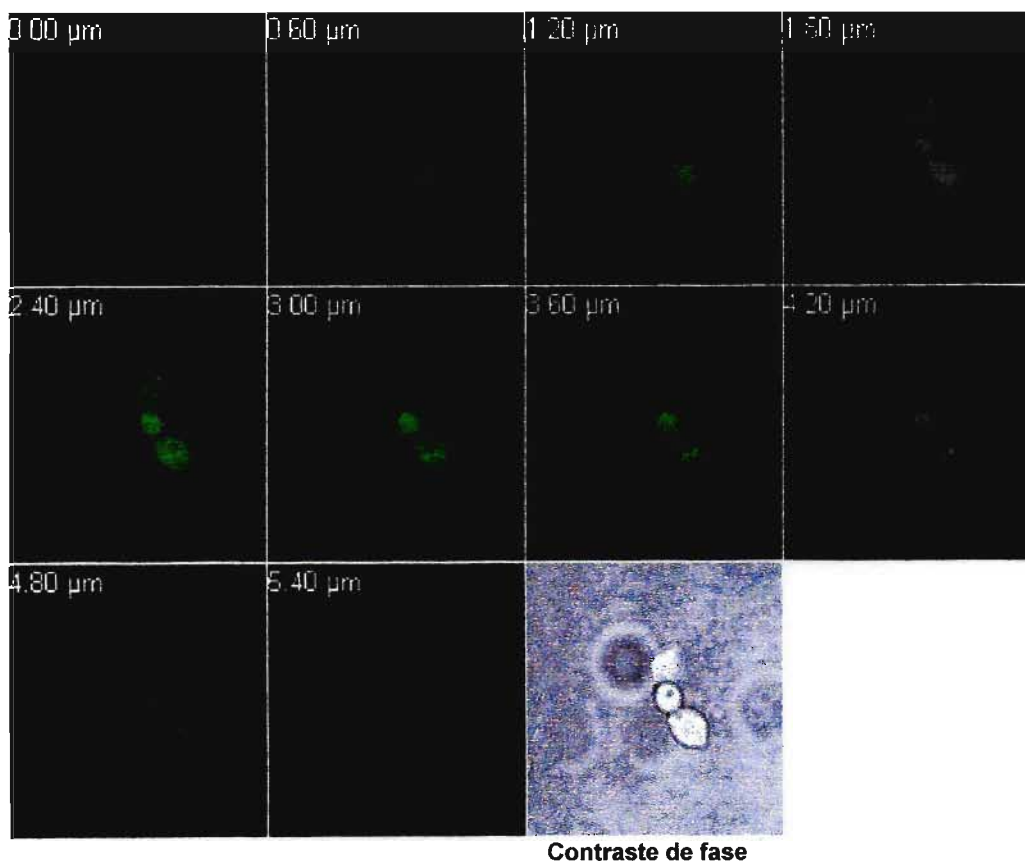


Figura 27: Distribuição do FAM-*Chef Ia* nas células de *Candida albicans* MDM8.

A distribuição da FAM-Chef Ia na célula de *Candida albicans* MDM8 pôde ser examinada usando microscopia confocal de varredura a laser, quantidade equivalente ao seu MIC (3,13 μM) e um tempo de incubação de 15 minutos. Com base nos resultados mostrados na **Figura 27** foi possível concluir que a FAM-Chef Ia é internalizada na célula, não causa ruptura da membrana plasmática e tem um alvo intracelular (possivelmente alguma organela).

Tentando identificar tal alvo, realizamos experimentos de co-localização usando marcadores específicos de organelas celulares. Com base em trabalhos realizados com a histatina-5, um outro peptídeo rico em histidina que age sobre as mitocôndrias da *Candida albicans* e induz a liberação de ATP ao citoplasma e depois ao meio extracelular (HELMERHORST et al., 1999; DIAZ et al., 2005), selecionamos o "mitotracker orange", um marcador específico de mitocôndria em respiração porque se liga aos grupos tióis das suas proteínas. O resultado negativo indicou que a mitocôndria não é o alvo do peptídeo (**Figura 28**).

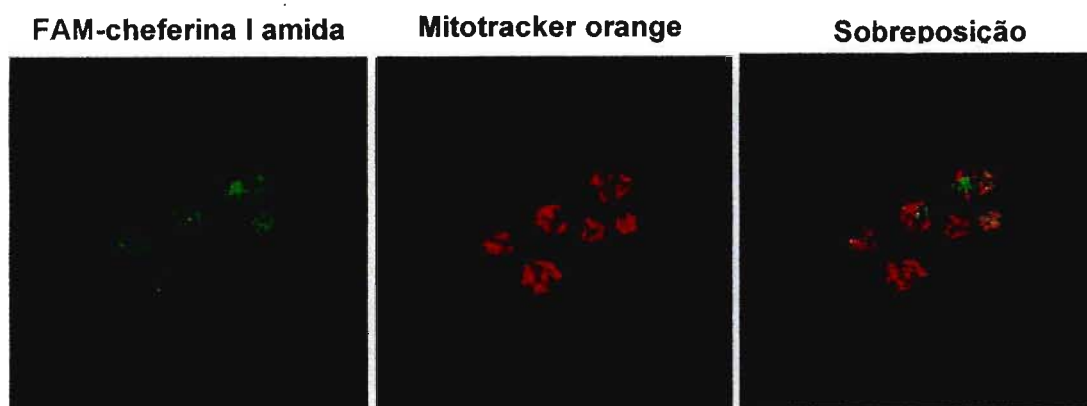


Figura 28: Colocalização da FAM-Chef Ia e "Mitotracker orange" nas células de *Candida albicans* MDM8.

Também examinamos o efeito da temperatura e de NaN_3 na translocação do FAM-Chef Ia usando como ferramenta a citometria de fluxo (FACS), pois estes

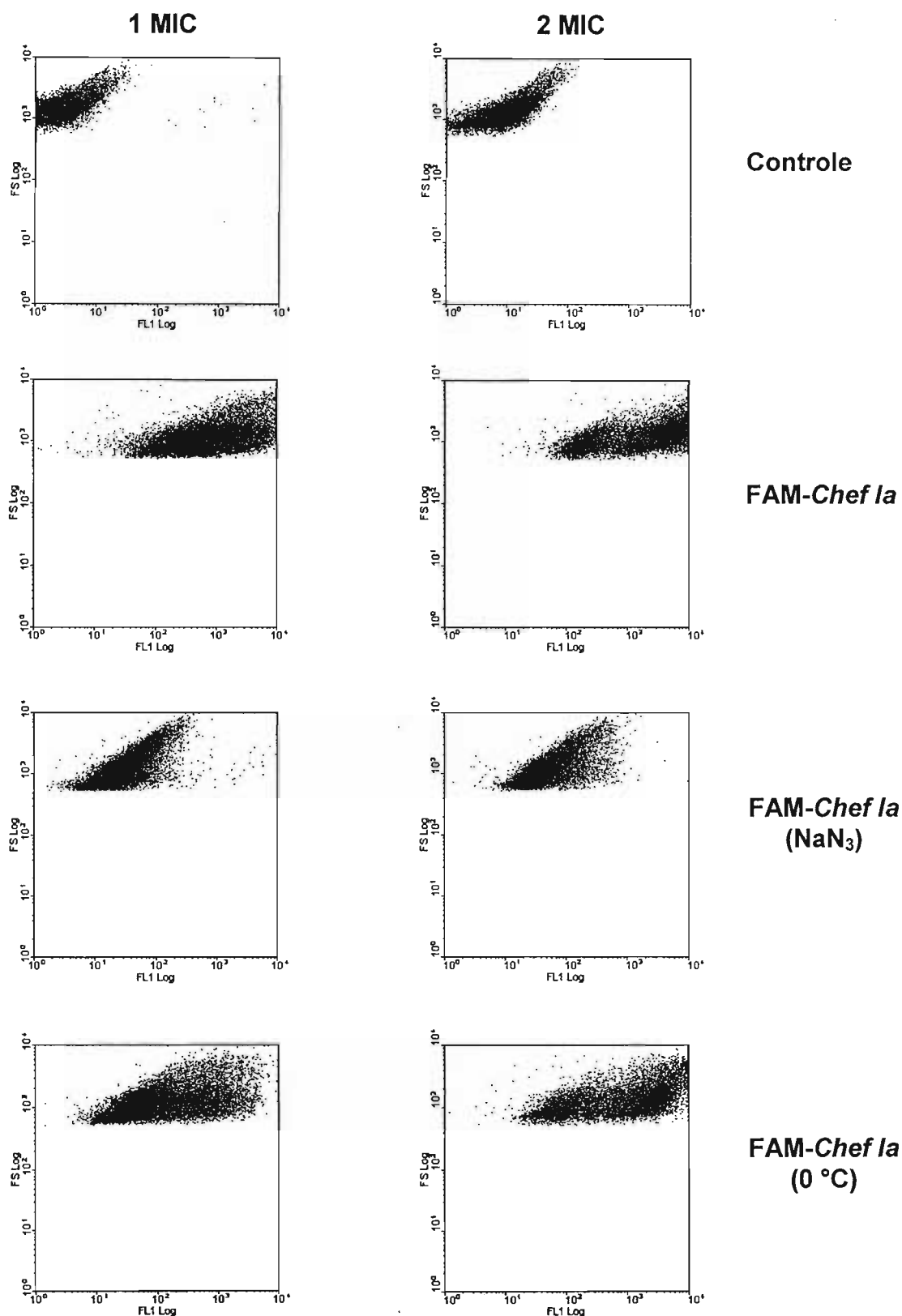


Figura 29: Efeito da temperatura baixa (0°C) e NaN₃ sobre a internalização de FAM-Chef Ia na célula de *Candida albicans* MDM8.

experimentos nos ajudariam a especular qual seria o mecanismo do processo.

A **Figura 29** mostra que o uso de: 1) 0,05% de NaN_3 inibiu 90% de internalização nas células de 1 MIC do FAM-*Chef Ia* (3,1 μM) e 77% de internalização nas células de 2 MIC de FAM-*Chef Ia* (6,2 μM); 3) 0 °C inibiu 50% de internalização nas células de 1 MIC de FAM-*Chef Ia* (3,1 μM) e 15% de internalização nas células de 2 MIC de FAM-*Chef Ia* (6,2 μM).

Difusão simples, transporte facilitado, transporte ativo de íons, penetração direta através da membrana, endocitose mediada por receptor e pinocitose são os processos de transporte comumente utilizados pelos fungos para a aquisição de compostos químicos do meio extracelular (KIM et al., 2001). Os primeiros dois processos são independentes de energia celular. A endocitose mediada por receptor é um processo dependente de energia (WENDLAND et al., 1998). Tem sido descrito que a translocação de alguns peptídeos antimicrobianos ricos em determinado aminoácidos ou peptídeos penetrantes de células, tais como a tenecina-3 (KIM et al., 2001), buforina (TAKESHIMA et al., 2003), o LAH-4 (KICHLER et al., 2006) e o H5WYG (MIDOUX et al., 1998), é realizada via um mecanismo que envolve endocitose.

Nossos resultados mostraram que a internalização do FAM-*Chef Ia* em *Candida albicans* é um processo dependente de energia, já que as células tratadas com NaN_3 deixaram de produzir ATP e as tratadas com baixa temperatura (0°C) apresentaram metabolismo lento. Tais características são consistentes com processos endocíticos (RIEZMAN et al., 1996; KIM et al., 2001; ZHU et al., 2006).

Como tínhamos observado que a ação antifúngica de *Chef Ia* era suprimida em meio contendo 34,2 mM de NaCl, decidimos investigar como a variação da concentração de NaCl (4,28 mM; 8,56 mM; 17,13 mM; e 34,25 mM) afetariam a internalização do FAM-*Chef Ia*. A **Figura 30** revela que o processo não foi afetado, sugerindo que o carácter hidrofóbico fornecido pela FAM conferiu à *Chef Ia* uma maior resistência ao aumento da força iônica do meio.

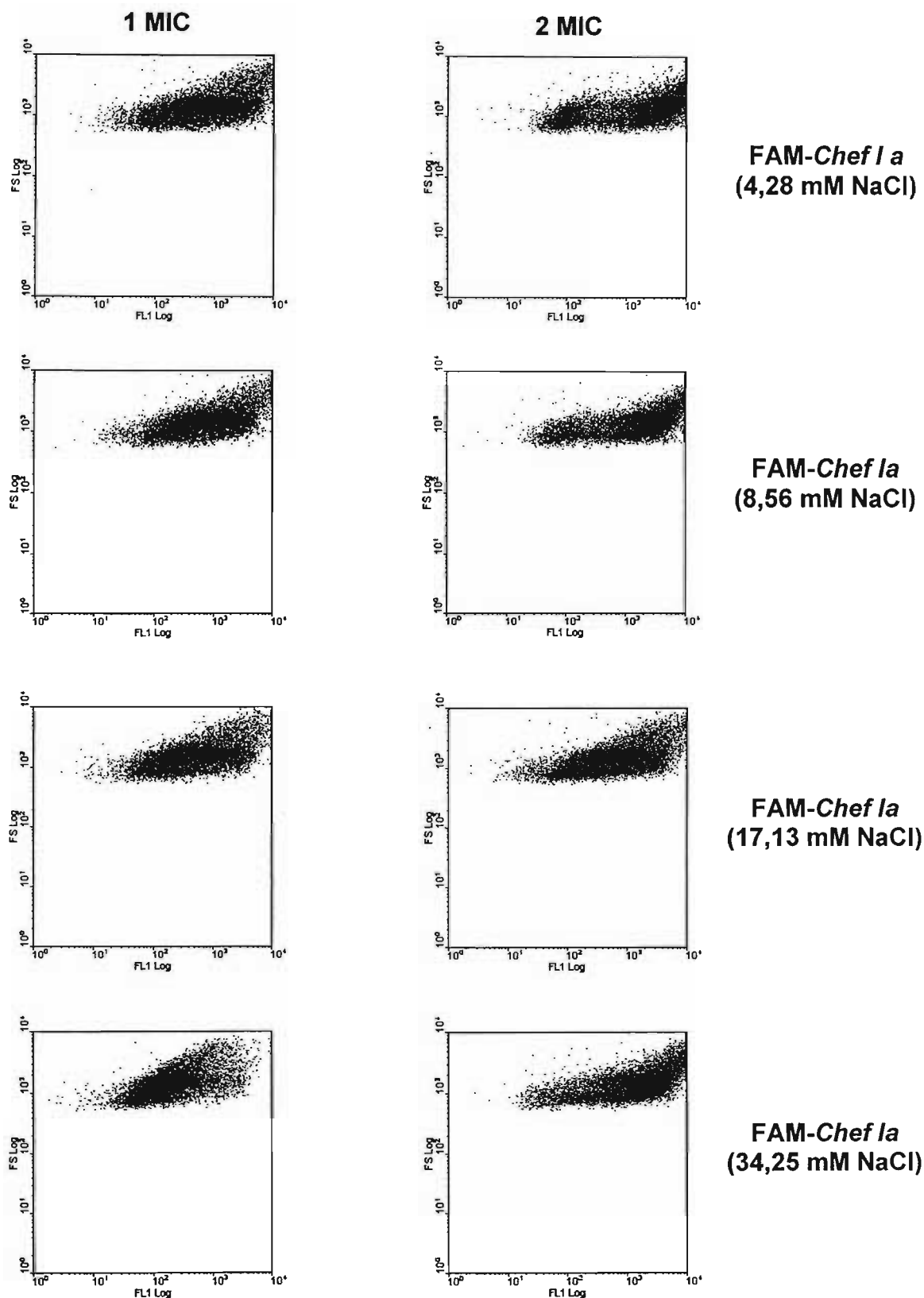
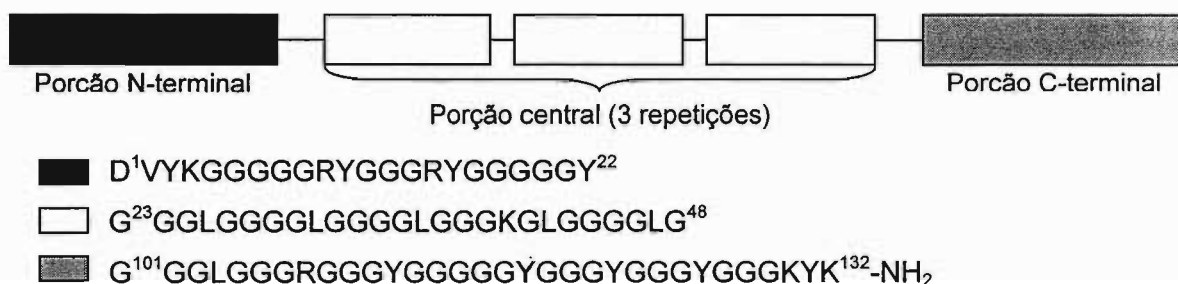


Figura 30: Efeito da força iônica sobre a internalização de FAM-Chef Ia na célula de *Candida albicans* MDM8.

4.2. Estudo da SPFS da acantoscurreína

Como já descrito, a acantoscurreína é uma pequena proteína (132 aminoácidos) oligomérica, amidada na carboxila terminal e com alto conteúdo de Gly (73%; LORENZINI et al., 2003). Ela se caracteriza por possuir uma porção C-terminal de 32 resíduos de aminoácidos [*acanto* (101-132)], uma porção N-terminal de 22 resíduos de aminoácidos [*acanto* (1-22)] e uma porção central formada por três fragmentos repetitivos de 26 resíduos de aminoácidos [*acanto* (23-48); **Esquema 5**].



Esquema 5: Estrutura da acantoscurreína

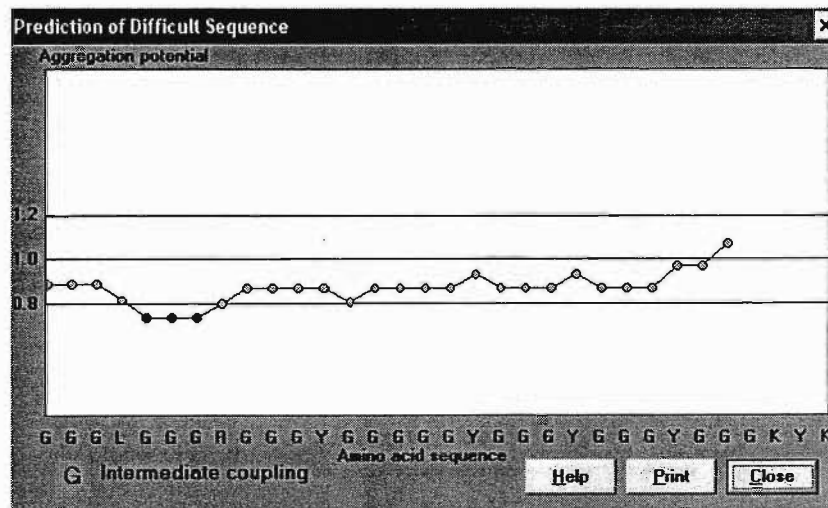
Como parte de nosso interesse em estudar a SPFS de sequências peptídicas ricas em Gly com ação antimicrobiana, decidimos inicialmente sintetizar os fragmentos *acanto* (101-132), *acanto* (1-22) e *acanto* (23-48). Todos eles seriam sintetizados a 60°C usando protocolos estabelecidos por nós (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2001; 2004; SOUZA et al., 2004; LOFFREDO et al., 2008) e usando resinas que permitiriam a obtenção dos peptídeos com carboxila livre (porção N-terminal e unidade repetitiva) ou amidada (fragmento C-terminal).

4.2.1. Síntese manual do fragmento *acanto* (101-132) (REMUZGO et al., 2008)

Este é o maior dos fragmentos citados acima. Ele contém três dos nove aminoácidos básicos da acantoscurreína (uma Arg e duas Lys). Como é sabido que a característica catiônica de um peptídeo antimicrobiano é importante para a interação eletrostática com o microorganismo alvo (LEE et al., 2003), achamos que este

fragmento deve ser importante para a expressão desta atividade pela proteína. Além disso, de posse deste peptídeo rico em Gly poderíamos examinar o comportamento conformacional de um peptídeo rico em Gly.

Como Fukushima descreveu que sequências de poli(Tyr-Gly-Gly), poli(Gln-Gly-Gly) e poli(Ala-Gly-Gly) contidas em seda da aranha *Nephila claviceps* apresentam um alto conteúdo de estrutura em folha β (FUKUSHIMA, 2000) e Zahariev e colaboradores descreveram que tentativas de síntese do fragmento C-terminal da nucleolina humana, uma proteína com alto conteúdo de Gly e His que levaram a baixos rendimentos de síntese devido à baixa eficiência das reações de acoplamento (ZAHARIEV et al., 2005), realizamos uma análise teórica do potencial de agregação que o peptídeo acanto [101-132) poderia apresentar usando o software Peptide Companion 1.25 (CoshiSoft/PeptiSearch, USA). O gráfico abaixo indicou que o peptídeo apresenta um baixo potencial de agregação:



a) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina MBHA pela estratégia Boc/Bzl

O peptídeo começou a ser sintetizado manualmente na resina MBHA a 60°C. A cada dois acoplamentos foram tomadas alíquotas de peptidil-resina em crescimento para o monitoramento da síntese por espectroscopia NIR-FT-Raman (LARSEN et al., 2003; RYTTERSGARD et al., 1997). Após a lavagem inicial, a resina forneceu teste de

ninidrina (KAISER et al., 1970) positivo. As etapas posteriores de acoplamento e desproteção foram realizadas segundo o protocolo descrito na **Tabela 1**.

O acoplamento da Gly¹²⁵ à peptidil-resina foi incompleto. Por isso, a mistura DIC/HOBt foi trocada por TBTU/DIPEA. Como não houve qualquer melhoria, a mistura 25% DMS/tolueno foi trocada por 20% DMSO/NMP, que sabidamente solvata bem peptidil-resinas altamente substituídas (CILLI et al., 1996) e contém o DMSO que evita a formação de pontes de hidrogênio entre as cadeias peptídicas em crescimento (CILLI et al., 1999; VARANDA; MIRANDA, 1997). Como não houve mudança no teste de ninidrina, a peptidil-resina em crescimento foi acetilada. Todos estes sintomas nos fizeram pensar na possibilidade de ocorrência de agregação entre as cadeias peptídicas em crescimento.

Mesmo assim, o grupamento Boc foi removido tentado o acoplamento da Gly¹²⁴ à peptidil-resina em crescimento usando TBTU/DIPEA. Novamente, o acoplamento foi incompleto. Foram tentados reacoplamentos com BOP/DIPEA (CASTRO et al., 1975) sem mudança no teste de ninidrina. Por essa razão, recorreremos à adição de sais caotrópicos ao meio reacional (0,4M de NaClO₄ ou 1M de LiCl em 20% DMSO/NMP) conhecidos por evitar a agregação em SPFS passo a passo (THALER et al., 1991). Também foi tentado o uso dos seguintes solventes ou misturas: DMSO, DMF, 50% TFE/DCM (YAMASHIRO et al., 1976), a mistura mágica [DCM:DMF:NMP (1:1:1) 1% Triton 4 N carbonato de etileno] (ZHANG et al., 1994) e 10% HFIP/DCM (MILTON et al., 1992), pois todos eles são conhecidos por desestruturar as folhas β - resultantes da agregação intercadeias peptídicas em crescimento e, portanto, agilizar a SPFS passo a passo de seqüências agregantes. Este último sistema de solvente não é compatível com a ativação "*in situ*" e, por isso, o anidrido simétrico do Boc-aminoácido pré-formado foi adicionado ao meio reacional. Mesmo assim não houve melhora no acoplamento. Novamente, a peptidil-resina foi acetilada e o grupo Boc removido. A tentativa de Gly¹²³ à peptidil-resina em

crescimento foi feita usando TBTU/DIPEA em 20% DMSO/NMP. O teste de ninidrina da peptidil-resina foi positivo.

Em vista da impossibilidade de alongar mais o peptídeo, as peptidil-resinas *acanto* (125-132)-, *acanto* (124-132)-, *acanto* (123-132)-MBHA de 8, 9 e 10 aminoácidos, respectivamente, foram submetidas à hidrólise ácida para realizar uma análise dos seus conteúdos de aminoácidos (SMILLIE; NATTRISS, 1991). Estas peptidil-resinas também foram submetidas ao teste do ácido pícrico (GISIN, 1972) na tentativa de quantificar os grupamentos amina livres que restaram nos acoplamentos incompletos. Os resultados estão mostrados na **Tabela 16**. Como era esperado, o grau de substituição da peptidil-resina diminuiu à medida que o peptídeo foi sendo alongado. Por outro lado, a quantidade de grupamentos aminos livres das diferentes peptidil-MBHAs aumentou, mostrando que os rendimentos dos acoplamentos eram baixos.

Tabela 16: Graus de substituição e conteúdos de grupamentos aminos livres das peptidil-MBHA obtidas.

Peptidil-MBHA	GS _{peptidil-MBHA} (mmol/g)	Quantidade de Grupamentos aminos livres (mmol/g)
<i>acanto</i> (125-132)-MBHA	0,1764	0,01389
<i>acanto</i> (124-132)-MBHA	0,1805	0,04430
<i>acanto</i> (123-132)-MBHA	0,1496	0,05750

A suspeita de que *acanto* (101-132) apresenta problemas de agregação, foi confirmada por análise dessas peptidil-MBHAs por NIR-FT-Raman, pois como citado no **item 3.11.c**, este tipo de espectroscopia permite detectar a ocorrência de agregação durante a SPFS. A **Figura 31** mostra que o espectro da resina MBHA não apresenta banda em 1657 cm⁻¹, que a *acanto* (131-132)-MBHA apresenta uma banda fraca e que esta banda aumenta de intensidade e é deslocada para frequência maior

no espectro da peptidil-resina *acanto* (129-132)-MBHA (1665 cm^{-1}). Nos espectros da *acanto* (127-132)- e *acanto* (125-132)-MBHA, esta banda é ainda mais deslocada (1672 e 1675 cm^{-1} , respectivamente), enquanto que nenhum deslocamento adicional é observado para *acanto* (124-132)- e *acanto* (123-132)-MBHA. Como a banda de 1675 cm^{-1} é geralmente usada para indicar estruturação em folha β pregueada em peptídeos e proteínas (COLTHUP et al., 1990), estes resultados confirmaram que durante após o acoplamento de Gly¹²⁷ à MBHA, as cadeias em crescimento começaram a estabelecer ligações de hidrogênio entre si gerando estruturas em folha β . O fenômeno foi se agravando nos acoplamentos de Gly¹²⁵, Gly¹²⁴ e Gly^{12e} à MBHA.

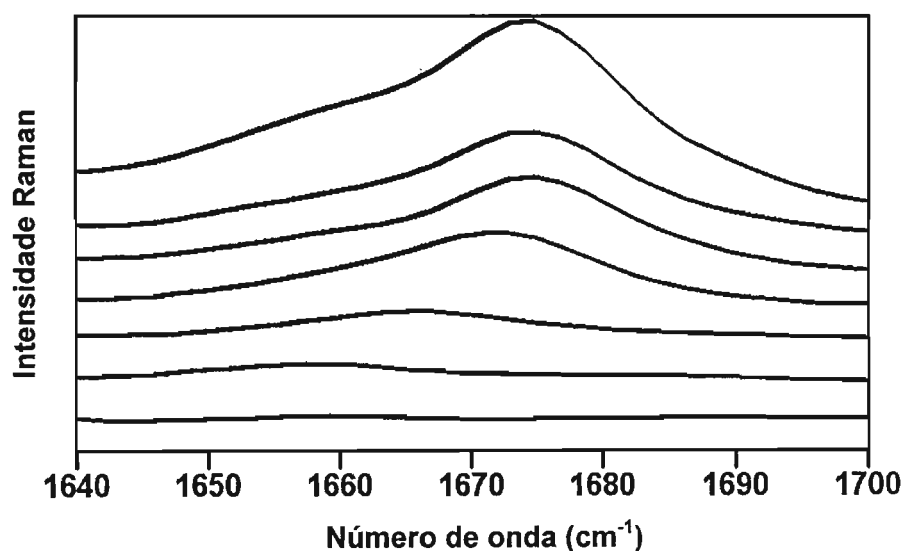


Figura 31: Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I ($1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$) da resina MBHA e as peptidil-MBHA *acanto* (131-132)-, *acanto* (129-132)-, *acanto* (127-132)-, *acanto* (125-132)-, *acanto* (124-132)- e *acanto* (123-132)-MBHA (de baixo para cima).

A Tabela 17 mostra os resultados das análises de aminoácidos das peptidil-MBHAs em questão. Como visto, com exceção da Gly que apareceu aumentada em vários casos, eles mostraram as proporções molares entre os aminoácidos esperadas. A queda no GS da peptidil-resina *acanto* (127-132)-MBHA para *acanto* (125-132)-MBHA e o resultado por NIR-FT- Raman indicam problemas de agregação.

Tabela 17: Caracterização das peptidil-MBHA obtidas.

Nº de resíduos	Peptidil-MBHA	Proporção molar dos aminoácidos (Teórico/experimental)	GS _{peptidil-resina} (mmol/g)
2	<i>acanto</i> (131-132)-MBHA	K (1,00) 1,00 Y (1,00) 1,11	0,3267
4	<i>acanto</i> (129-132)-MBHA	G (1,00) 1,21 K (2,00) 2,00 Y (1,00) 1,07	0,3369
6	<i>acanto</i> (127-132)-MBHA	G (3,00) 3,37 K (2,00) 2,00 Y (1,00) 1,11	0,3042
8	<i>acanto</i> (125-132)-MBHA	G (4,00) 4,63 K (2,00) 2,00 Y (2,00) 1,89	0,1764
9	<i>acanto</i> (124-132)-MBHA	G (5,00) 5,20 K (2,00) 2,00 Y (2,00) 2,05	0,1805
10	<i>acanto</i> (123-132)-MBHA	G (6,00) 6,20 K (2,00) 2,00 Y (2,00) 1,95	0,1496

GS = Grau de substituição.

Amostras das peptidil-resinas *acanto* (125-132)- e *acanto* (123-132)-MBHA submetidas à clivagem da resina e desproteção total forneceram os peptídeos livres correspondentes. As análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS do peptídeo bruto G¹²⁵YGGGKYK¹³²-NH₂ mostrados nas **Figuras 32A e 33** revelaram que o componente majoritário correspondia ao peptídeo desejado (componente 1 da **Figura 33A**) e que o componente 2 corresponde ao peptídeo contendo uma Gly adicional. Por outro lado, as análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS do peptídeo bruto G¹²³GGYGGGKYK¹³²-NH₂ (**Figuras 32B e 34**) revelaram que o componente majoritário correspondia ao peptídeo desejado (componente 1 da **Figura 32B**). A presença do subproduto G¹²⁵YGGGKYK¹³²-NH₂ que correspondia ao peptídeo deletado em duas Gly tornou-se clara. Enquanto o componente 2 (**Figura 32B**) corresponde ao peptídeo acrescido de

uma Gly (11 resíduos e possivelmente ganha durante as tentativas de reacoplamentos de Fmoc-Gly à peptidil-resina em crescimento), o componente 3 corresponde a vários subprodutos cujas massas não puderem ser atribuídas. A **Figura 34** indicou a presença do peptídeo deletado em uma Gly. Tamaña complexidade impossibilitou a purificação do peptídeo desejado conforme prevê a literatura (MILTON et al., 1990).

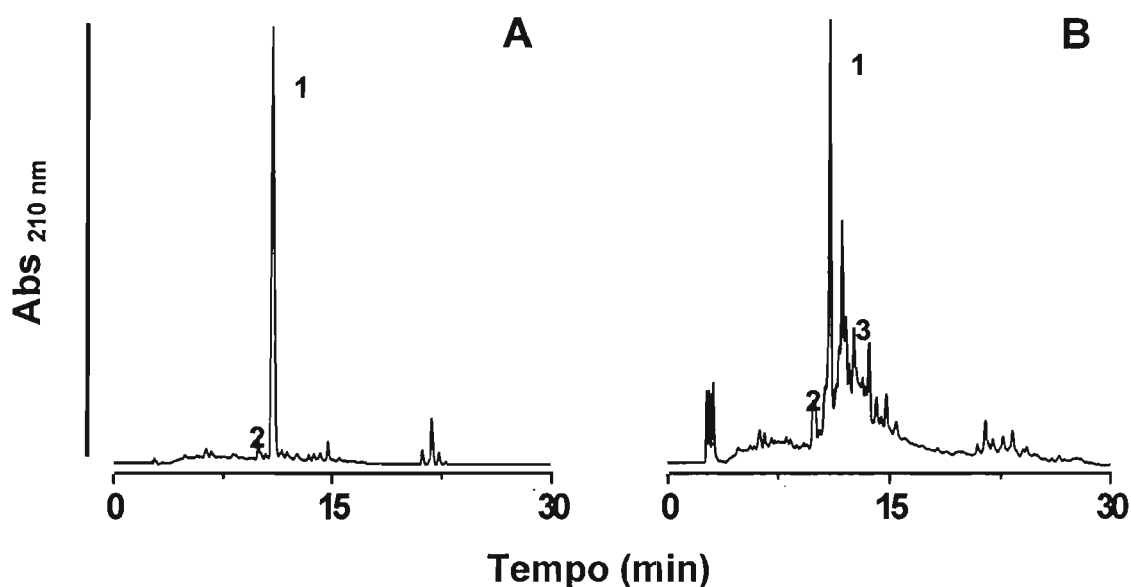


Figura 32: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultantes da clivagem da resina e desproteção total da *acanto (125-132)*-MBHA (A) e *acanto (123-132)*-MBHA (B). Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

b) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi resina (Rink amida) pela estratégia Fmoc/But

É sabido, que a agregação na SPFS passo a passo independe do tipo de estratégia química a ser empregada (KENT, 1988; MILTON et al., 1990). Por isso, decidimos tentar a síntese do *acanto (101-132)* usando a estratégia Fmoc/But. A resina escolhida foi a Rink amida.

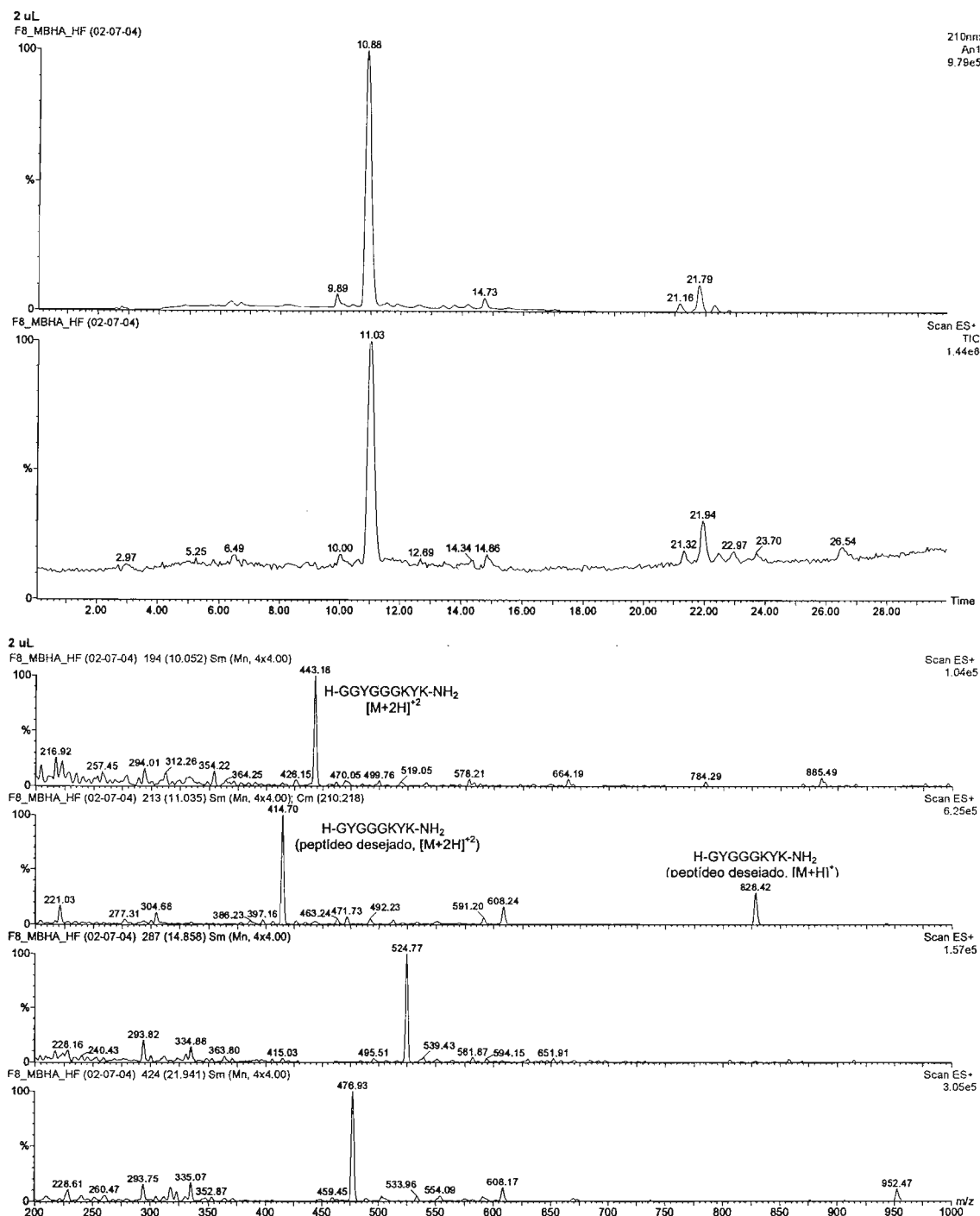


Figura 33: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultantes da clivagem da resina e desproteção total da acanto (125-132)-MBHA. Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm, capilar: 3 kV, cone: 37 V, modo de ionização: ES+.

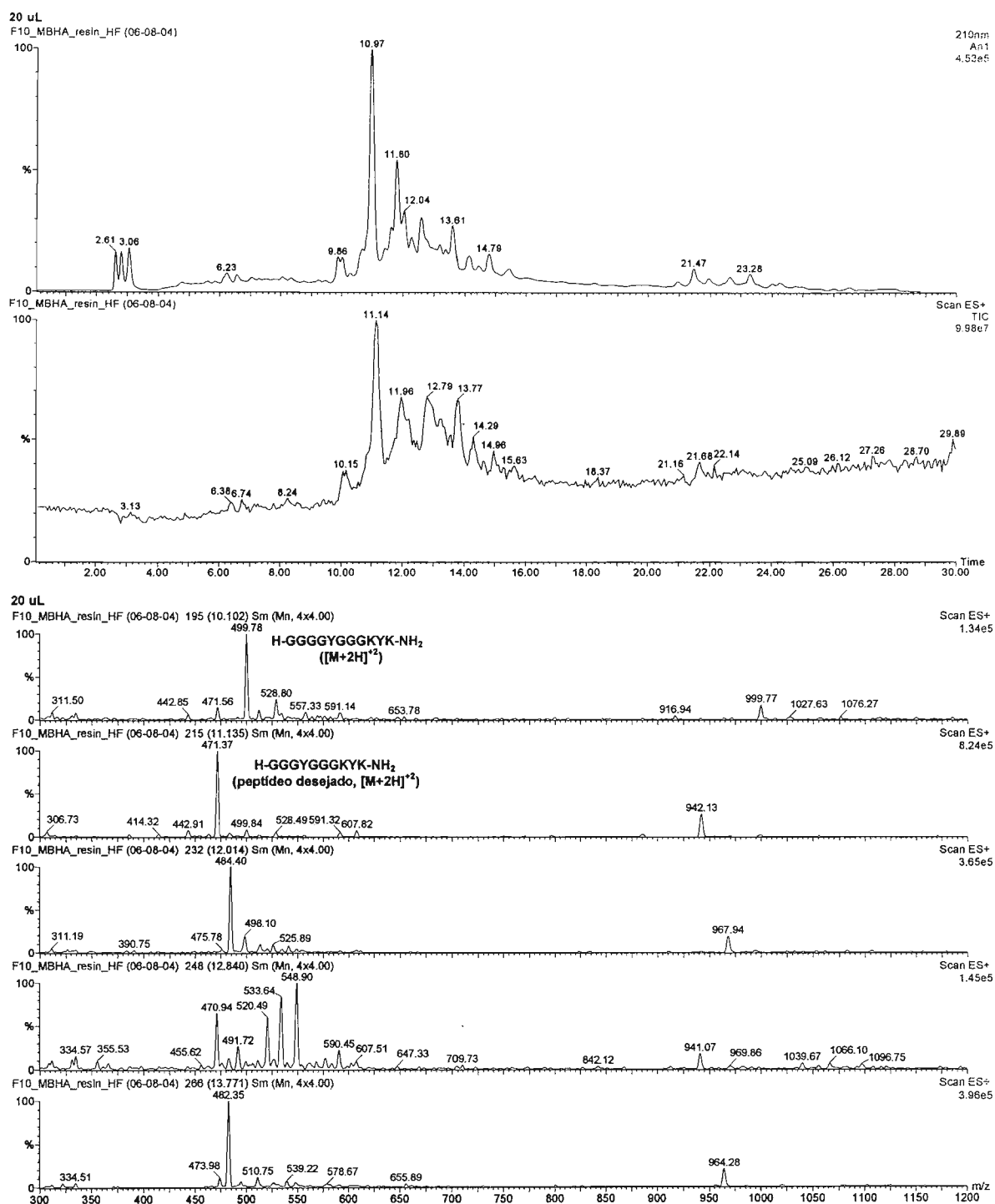


Figura 34: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de acanto (123-132)-MBHA. Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm, capilar: 3 kV, cone: 37 V, modo de ionização: ES+.

Após a lavagem inicial, a resina forneceu teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) negativo. O grupo Fmoc foi removido tornando-o positivo. As etapas posteriores de acoplamento e desproteção foram realizadas segundo o protocolo descrito na **Tabela 2**. Como na tentativa de síntese na resina MBHA, o acoplamento da Tyr¹²⁶ à peptidil-resina em crescimento foi incompleto. As trocas dos reagentes acopladores DIC/HOBt por TBTU/DIPEA e do sistema de solvente 25% DMSO/tolueno por 20% DMSO/NMP tornaram a reação quantitativa. O acoplamento de Gly¹²⁵ à peptidil-resina em crescimento foi incompleto; novamente, o teste ninidrina da peptidil-resina indicou a presença de alguns grupamentos aminas livres. Neste caso, a troca de reagente acoplador (TBTU) por HATU/DIPEA não causou mudança no teste de ninidrina. Tentativas de acoplamento utilizando 0,4M de NaClO₄ em 20% DMSO/NMP usando TBTU/DIPEA fizeram com que a reação fosse completada. Uma pequena quantidade de acanto (125-132)-Rink amida foi então retirada para análises de aminoácidos e por espectroscopia NIR-FT-Raman.

A tentativa de acoplamento de Gly¹²⁴ à peptidil-resina em crescimento foi feita usando TBTU/DIPEA e 0,4M de NaClO₄ em 20% DMSO/NMP, condições que se mostraram ótimas no acoplamento de resíduo anterior. Novamente, o teste de ninidrina da peptidil-resina foi positivo. Foram feitas tentativas usando 1M de LiCl em 20% DMSO/NMP e outros sistemas de solventes, tais como DMSO, 50%TFE/DCM e mistura mágica [DCM:DMF:NMP (1:1:1), 1% Triton e 4N carbonato de etileno], sem que houvesse mudança no teste de ninidrina da peptidil-resina. Apesar de a mistura 10% HFIP/DCM não ter sido testada devido à sua incompatibilidade com a estratégia Fmoc/But, os resultados obtidos confirmaram que o *acanto* (101-132) é uma sequência agregante ou uma “difficult sèquence” (MILTON et al., 1990).

Em vista de não podermos alongar mais o peptídeo, a peptidil-resina *acanto* (124-132)-Rink amida foi seca sob vácuo e estocada a -4°C. Uma amostra dela foi submetida à hidrólise total para a determinação do seu conteúdo de aminoácidos

(SMILLIE; NATTRISS, 1991). Os resultados obtidos foram condizentes com os esperados para o *acanto* (125-132)-Rink amida (Tabela 18) como mostrado a seguir:

Tabela 18: Caracterização da *acanto* (125-132)-Rink amida obtida.

N° de resíduos	Proporção molar entre os aminoácidos (Teórico/experimental)	GS _{peptidil-resina} (mmol/g)
8	G (4,00) 4,08	0,2258
	K (2,00) 1,99	
	Y (2,00) 1,98	

GS = Grau de substituição

O espectro Raman da *acanto* (125-132)-Rink amida apresentou banda em 1675 cm^{-1} (Figura 35) indicativa de estruturação em folha β pregueada (COLTHUP et al., 1990).

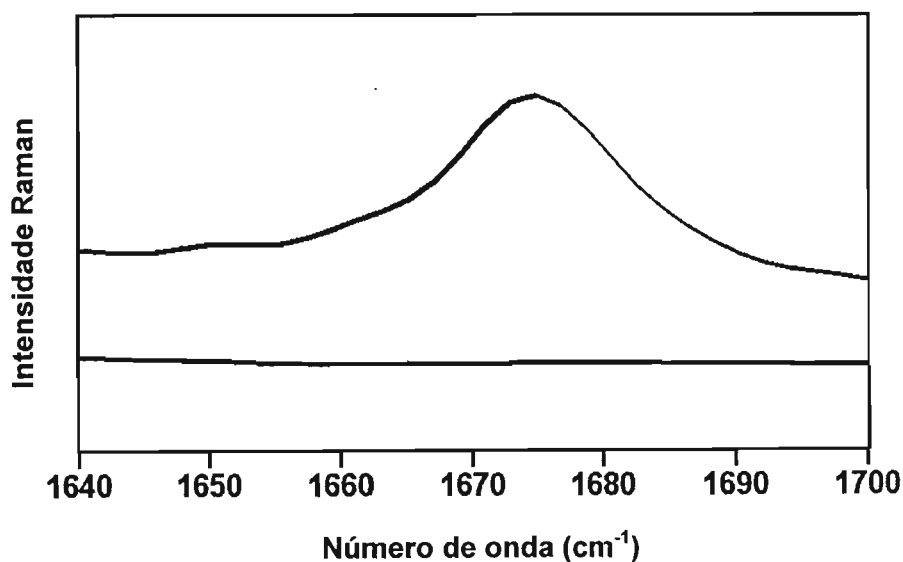


Figura 35: Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I ($1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$) da resina Rink amida e da peptidil-resina *acanto* (125-132)-Rink amida (de baixo para cima).

c) Tentativa de SPFS passo a passo a 60°C na resina CLEAR amida pela estratégia Fmoc/But

Devido às características descritas no item 4.1.2.a, a resina CLEAR amida pareceu ser indicada para a SPFS passo a passo do *acanto* (101-132). A tentativa inicial foi novamente a 60°C, pois relatos prévios indicaram que ela é compatível com o uso de temperatura alta (KAPPE, 2001).

Após a lavagem inicial com 20% DMSO/NMP e remoção do Fmoc, foi iniciado o processo sintético. As etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas segundo o protocolo mostrado na Tabela 3. Foram tomadas amostras da peptidil-resina após a incorporação da Tyr¹²⁶ (sétimo resíduo) e Gly¹¹⁹ (décimo-quarto resíduo) para serem analisadas posteriormente por espectroscopia Raman. O acoplamento da Gly¹¹³ foi incompleto (o teste de ninidrina da peptidil-resina mostrou a presença de alguns grãos azuis). As trocas de DIC/HOBt por TBTU e de 20% DMSO/NMP por DMF ou DMSO, não foram bem sucedidas, assim como o uso de 0,4M de LiCl em NMP e 20% TFE/DCM. Em vista de não podermos alongar mais o peptídeo, a peptidil-resina *acanto* (113-132)-CLEAR amida foi seca sob vácuo e estocada a -4°C.

Tabela 19: Caracterização das peptidil-CLEAR obtidas.

Nº de resíduos	Peptidil-MBHA	Conteúdo de aminoácidos (Teórico)experimental	GS _{peptidil-resina} (mmol/g)
7	<i>acanto</i> (126-132)-CLEAR amida	G (3,00) 3,11 K (2,00) 2,00 Y (2,00) 2,05	0,2251
14	<i>acanto</i> (119-132)-CLEAR amida	G (9,00) 8,71 K (2,00) 2,00 Y (3,00) 3,17	0,2044
20	<i>acanto</i> (113-132)-CLEAR amida	G (14,00) 13,21 K (2,00) 2,00 Y (4,00) 3,59	0,1823

GS = Grau de substituição

Posteriormente, as peptidil-resinas *acanto* (126-132)-, *acanto* (119-132)- e *acanto* (113-132)-CLEAR amida foram submetidas à hidrólise total para a análise dos seus conteúdos de aminoácidos (SMILLIE; NATTRISS, 1991) que evidenciaram as proporções molares esperadas (Tabela 19).

Na Figura 36 são mostrados os espectros Raman de *acanto* (126-132)-CLEAR amida, *acanto* (119-132)-CLEAR amida e *acanto* (113-132)-CLEAR amida na região amida I. Observa-se claramente a presença da banda de 1675 cm⁻¹ indicativa de estruturação dos peptídeos em crescimento em folha β pregueada.

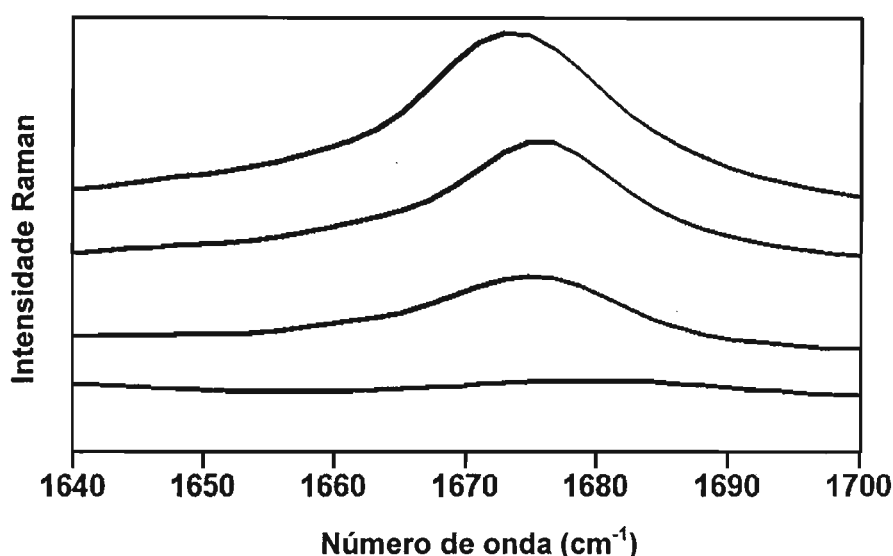


Figura 36: Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I (1600 – 1700 cm⁻¹) da CLEAR e das peptidil-resina *acanto* (126-132)-, *acanto* (119-132)- e *acanto* (113-132)-CLEAR amida (de baixo para cima).

Amostras das peptidil-resinas *acanto* (119-132)- e *acanto* (113-132)-CLEAR amida forneceram peptídeos brutos na forma totalmente desprotegida, cujas análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS G¹¹⁹GGYGGGYGGGKYK¹³²-NH₂ (Figuras 37A e 38) mostraram que o seu componente majoritário correspondia ao peptídeo desejado (componente 1 da Figura 37A) e que os dois subprodutos eram análogos contendo uma e duas Gly adicionais. Similarmente, as análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS do

peptídeo bruto $G^{113}GGGGYGGGYGGGYGGGKYK^{132}-NH_2$ resultante da (Figuras 37B e 38) mostraram que o seu componente majoritário corresponde ao peptídeo desejado (componente 1 da Figura 37B) e que os dois subprodutos correspondem a análogos contendo uma e duas Gly adicionais.

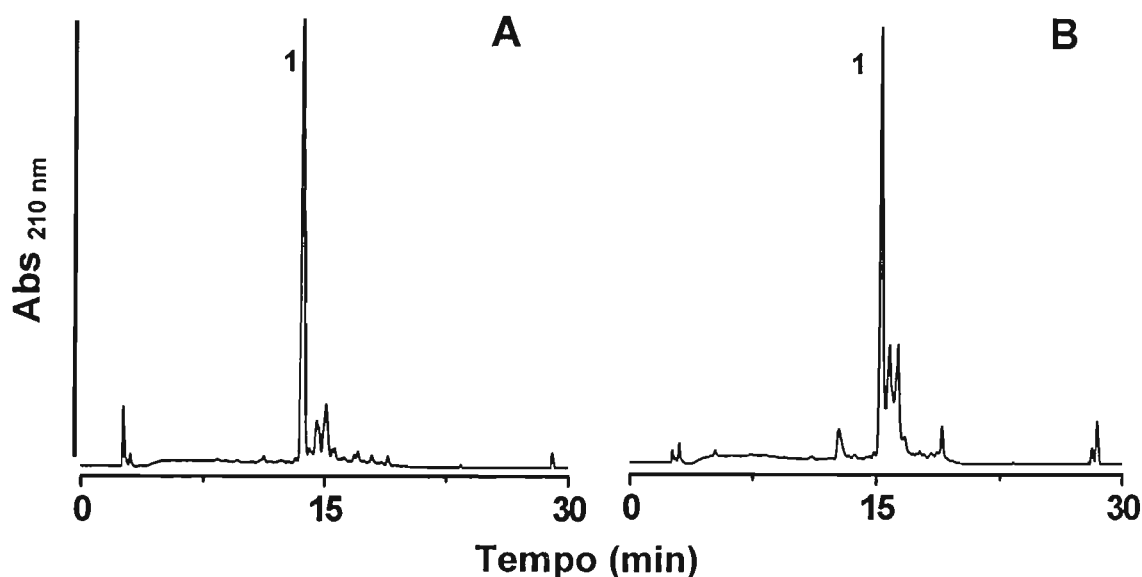


Figura 37: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultantes da clivagem da resina e desproteção total da *acanto* (119-132)-CLEAR amida (A) e *acanto* (113-132)-CLEAR amida (B). Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

A presença de contaminantes pode ser explicada pela remoção indesejável do grupo Fmoc do Fmoc-Gly-OH que está sendo acoplado em presença de TBTU/DIPEA (como já foi citado, o Fmoc de Fmoc-Gly é pouco estável à base utilizado na síntese devido à pequena cadeia lateral deste aminoácido; BODANSZKY et al., 1979).

De modo geral, portanto, a resina CLEAR mostrou-se superior às resinas MBHA e Rink amida, já que permitiu a SPFS do fragmento *acanto* (113-132) de boa qualidade. Entretanto, também ela não nos permitiu chegar ao peptídeo de 32 resíduos de aminoácidos devido à ocorrência de agregação.

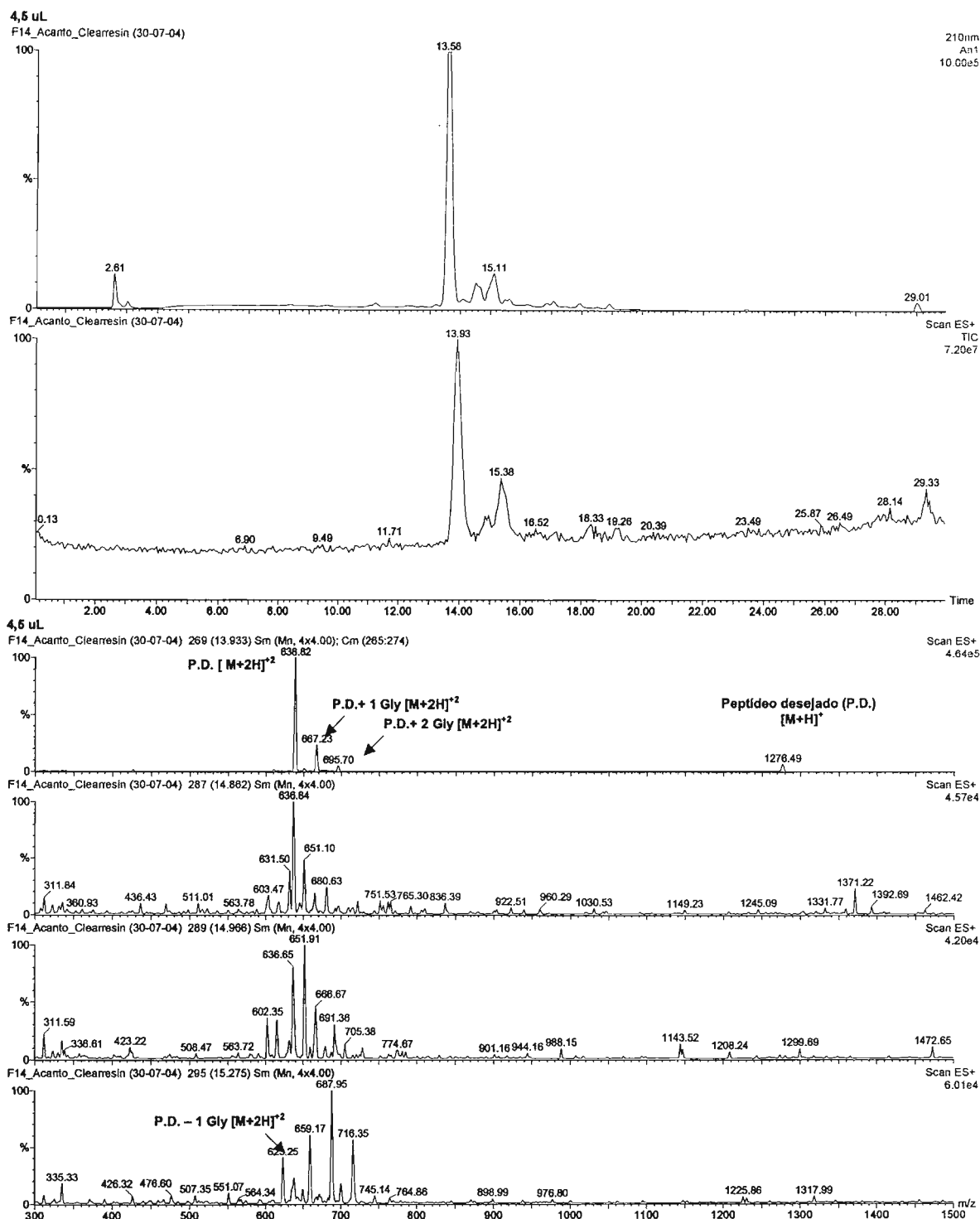


Figura 38: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem e desproteção total da acanto (119-132)-CLEAR amida. Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm, capilar: 3 kV, cone: 37 V, modo de ionização: ES+.

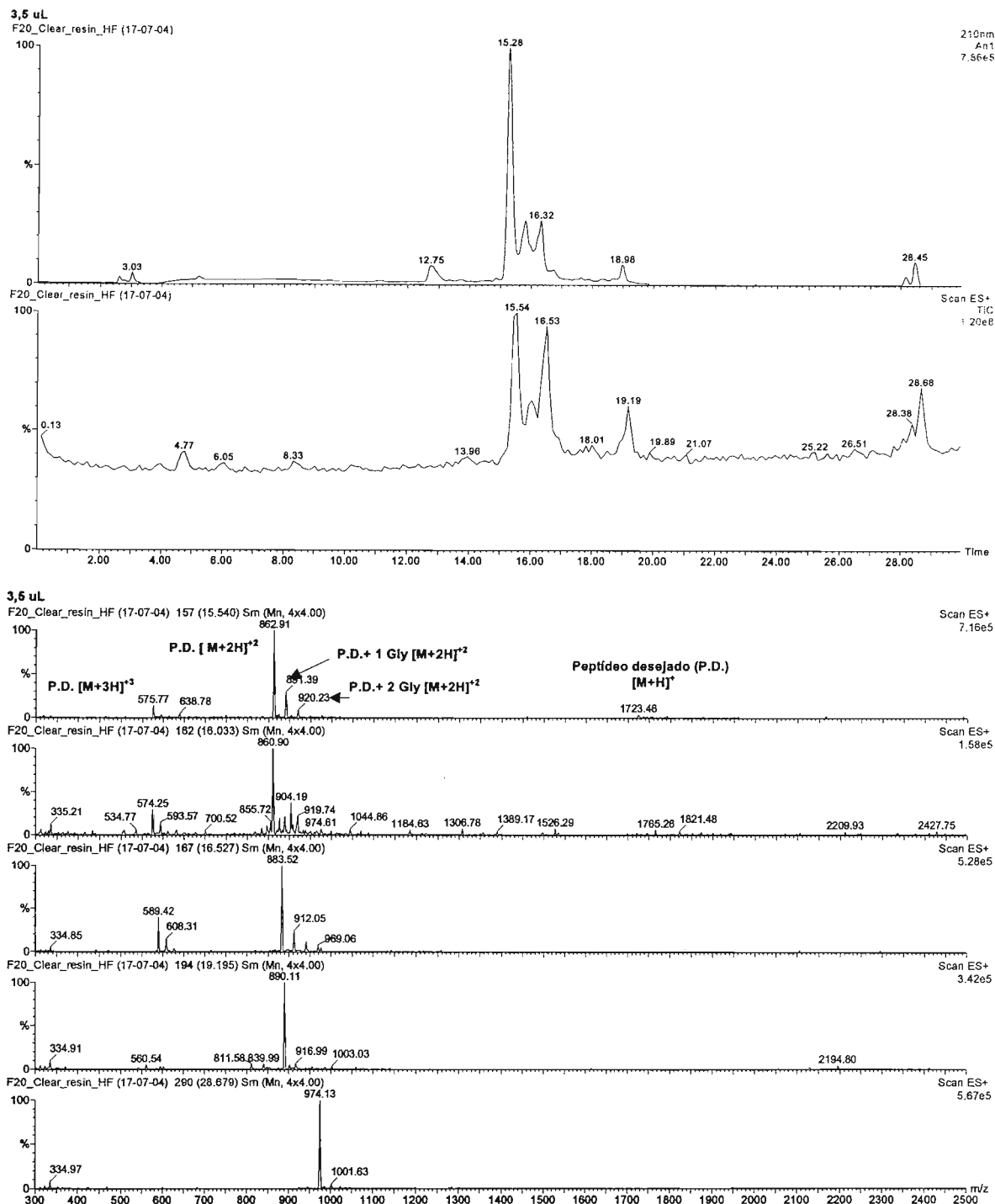


Figura 39: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem e desproteção total da *acanto* (113-132)-CLEAR amida. Condições: Solvente A: 0,1%TFA/água, solvente B: 40% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95%B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm, capilar: 3 kV, cone: 37 V, modo de ionização: ES+.

d) Tentativa de síntese convergente em fase sólida (SCPFS) na resina CLEAR amida

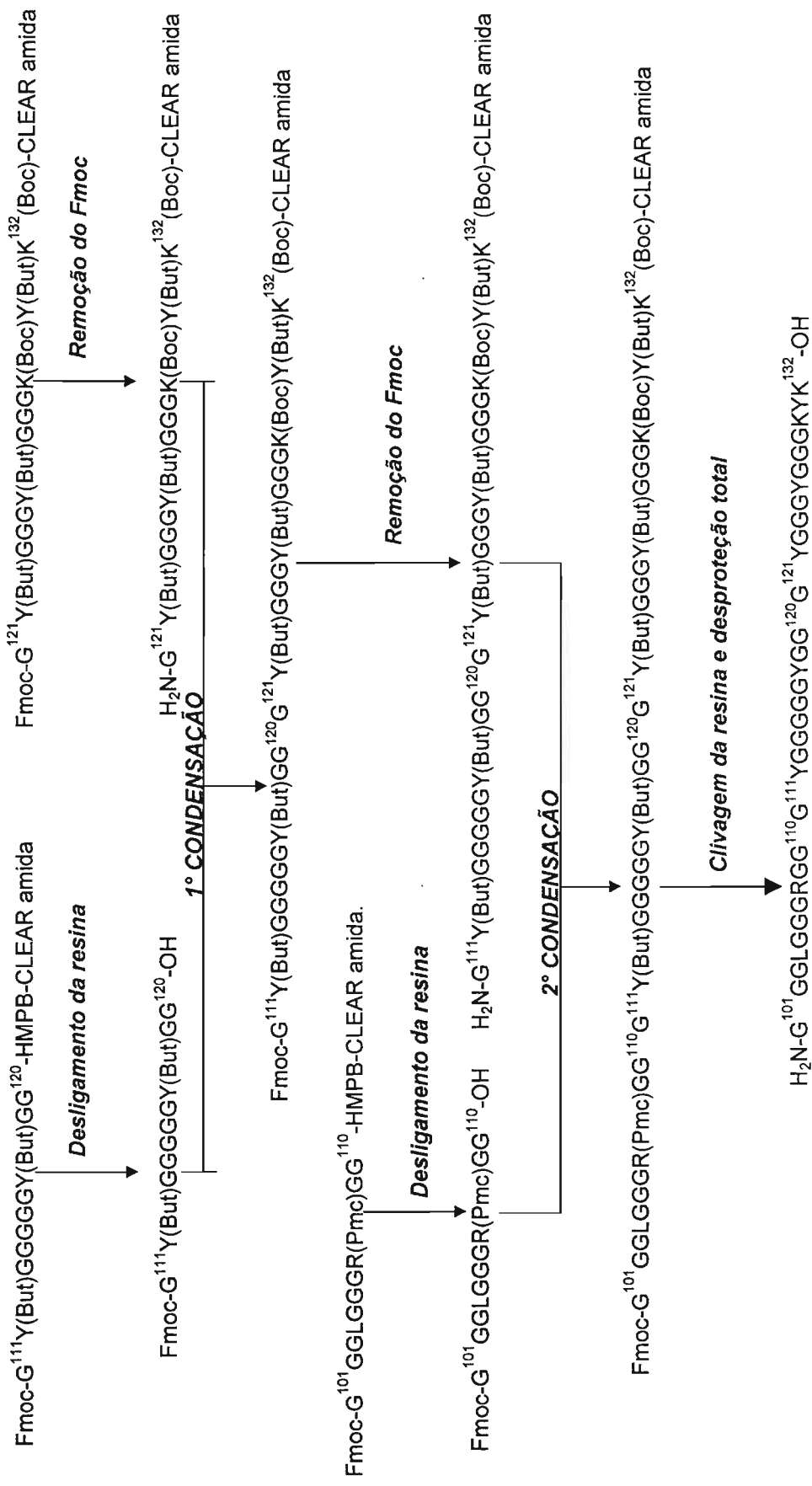
Na tentativa de chegar ao acanto (101-132) desenhamos uma estratégia de SCPFS que está mostrada no **Esquema 6**. Usualmente, a resina 2-clorotritil é escolhida para fazer a síntese dos fragmentos protegidos pela estratégia Fmoc (BARLOS et al., 1991). Como esta resina é baseada no copolímero de poliestireno e divinilbenzeno que não mostrou bons resultados nas tentativas de síntese anteriores, usamos o linker ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butírico (HMPB, FLOERSHEIMER; RINIKER, 1991) acoplado à resina CLEAR amida para a obtenção dos fragmentos protegidos contendo Gly como resíduo C-terminal.

As peptidil-resinas correspondentes aos três fragmentos foram sintetizadas manualmente por SPFS passo a passo convencional (temperatura ambiente; MIRANDA et al., 1993, KEMPE; BARANY, 1996, SOUZA et al., 2004). Uma vez obtidas, elas foram secas e pesadas. Amostras foram: 1) hidrolisadas totalmente para a determinação dos seus graus de substituição e seu conteúdo de aminoácidos; 2) submetidas à clivagem e desproteção total para a obtenção dos peptídeos brutos correspondentes que foram analisados por RP-HPLC e LC/ESI-MS.

Acanto 121-132-CLEAR amida: Fmoc-G¹²¹Y(But)GGGY(But)GGGK(Boc)Y(But)K¹³²(Boc)-CLEAR amida

A síntese foi realizada segundo o protocolo da **Tabela 3** usando a estratégia Fmoc (MIRANDA et al., 1993, KEMPE; BARANY, 1996, SOUZA et al., 2004) e a mistura DIC:HOBt (1:1) como reagentes acopladores. Não houve necessidade de realizar reacoplamentos. O ganho de massa da resina é mostrado na **Tabela 20**. A sua análise de aminoácidos apresentou a proporção molar esperada (**Tabela 21**). As análises por RP-HPLC (**Figura 40A**) e o espectro de massa obtido no LC/ESI-MS (**Figura 41C**) do produto bruto obtido em escala analítica indicaram que o peptídeo desejado corresponde ao componente majoritário (componente 1 da **Figura 40A**) e, portanto, que a síntese da peptidil-resina foi bem sucedida.

Esquema 6: Estratégia sintética concebida para a tentativa inicial de SCPFS do fragmento C-terminal da acantoscurreina.



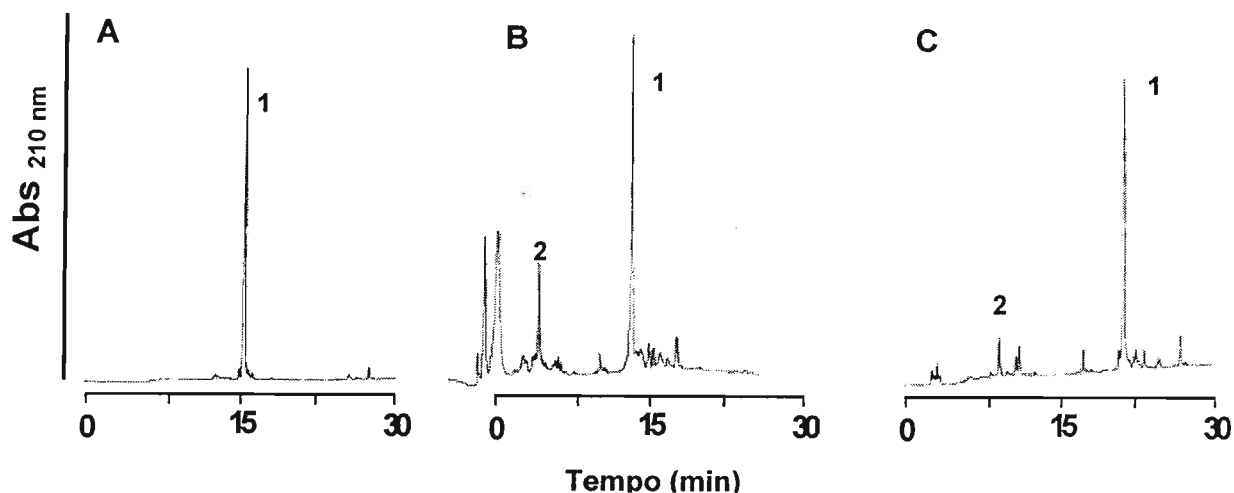


Figura 40: Análise por RP-HPLC do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total da *acanto (121-132)-CLEAR* amida (A) *acanto (111-120)-HMPB-CLEAR* amida (B) *acanto (101-110)-HMPB-CLEAR* amida (C). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 70% (A) ou 90% (B,C) ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

Acanto (111-120)-HMPB-CLEAR amida: Fmoc-G¹¹¹Y(But)GGGGGY(But)GG¹²⁰-HMPB-CLEAR amida

O acoplamento do linker HMPB à resina CLEAR foi realizado como se ele fosse um simples aminoácido. A aminoacilação da resina funcionalizada foi realizada como descrito no **item 3.6.d**. O alongamento da cadeia peptídica foi realizada seguindo o protocolo da **Tabela 3** usando a estratégia Fmoc (MIRANDA et al., 1993, KEMPE; BARANY, 1996, SOUZA et al., 2004), a mistura DIC:HOBt (1:1) como reagente acoplador nos primeiros dos acoplamentos e a mistura BOP:HOBt (1:1) para os posteriores, de forma a evitar que acontecesse a reação de formação de dicetopiperazina (GAIRI et al., 1990). Os acoplamentos posteriores foram realizados com TBTU como reagente acoplador na presença de DIPEA até pH 8-9. Foi necessário realizar reacoplamentos para total incorporação dos três últimos aminoácidos. O ganho de massa é mostrado na **Tabela 20**. A sua análise de aminoácidos apresentou a proporção molar dos aminoácidos

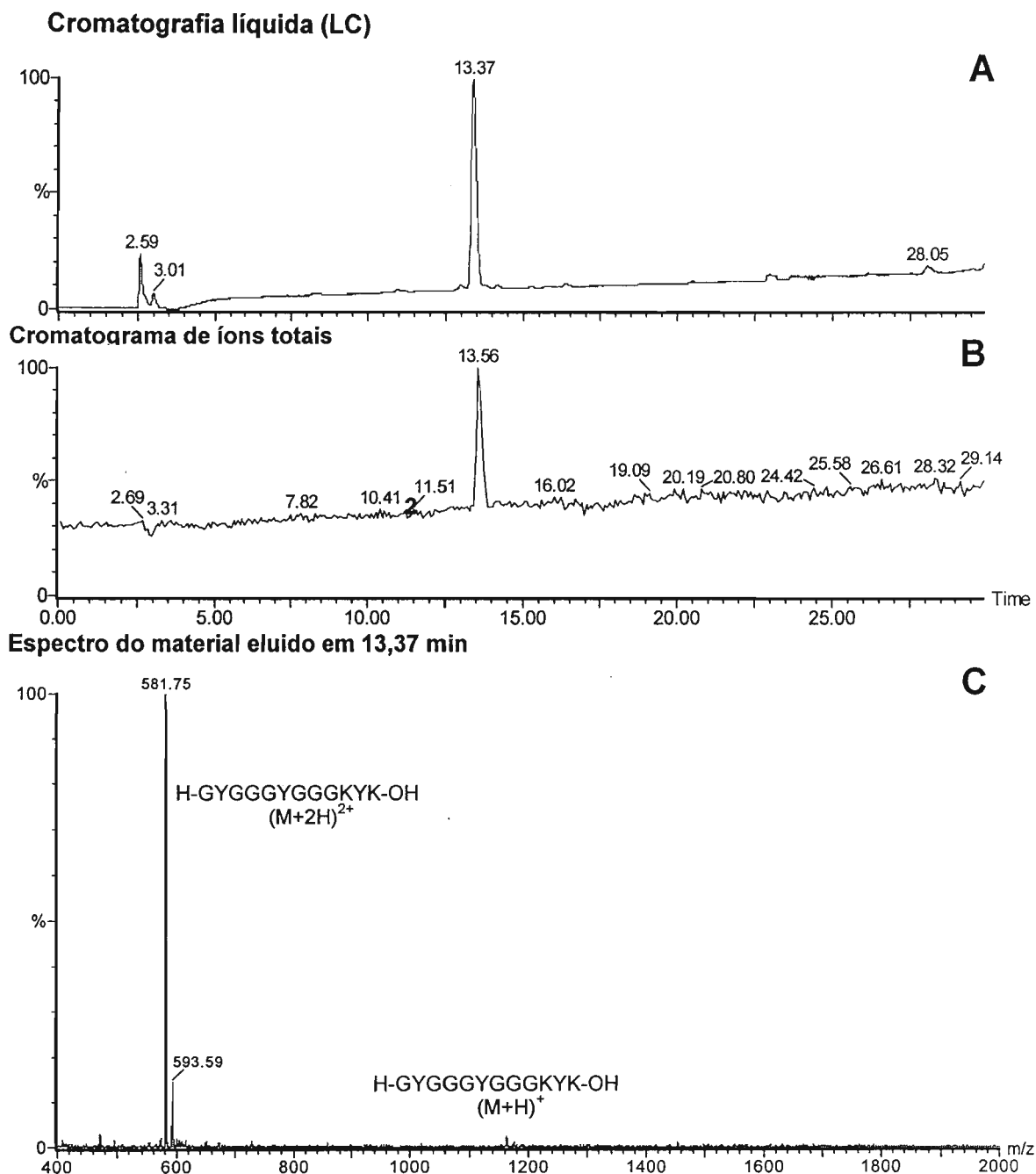


Figura 41: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total da *acanto* (121-132)-CLEAR amida. Condições da LC: Injeção: 4 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 70% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

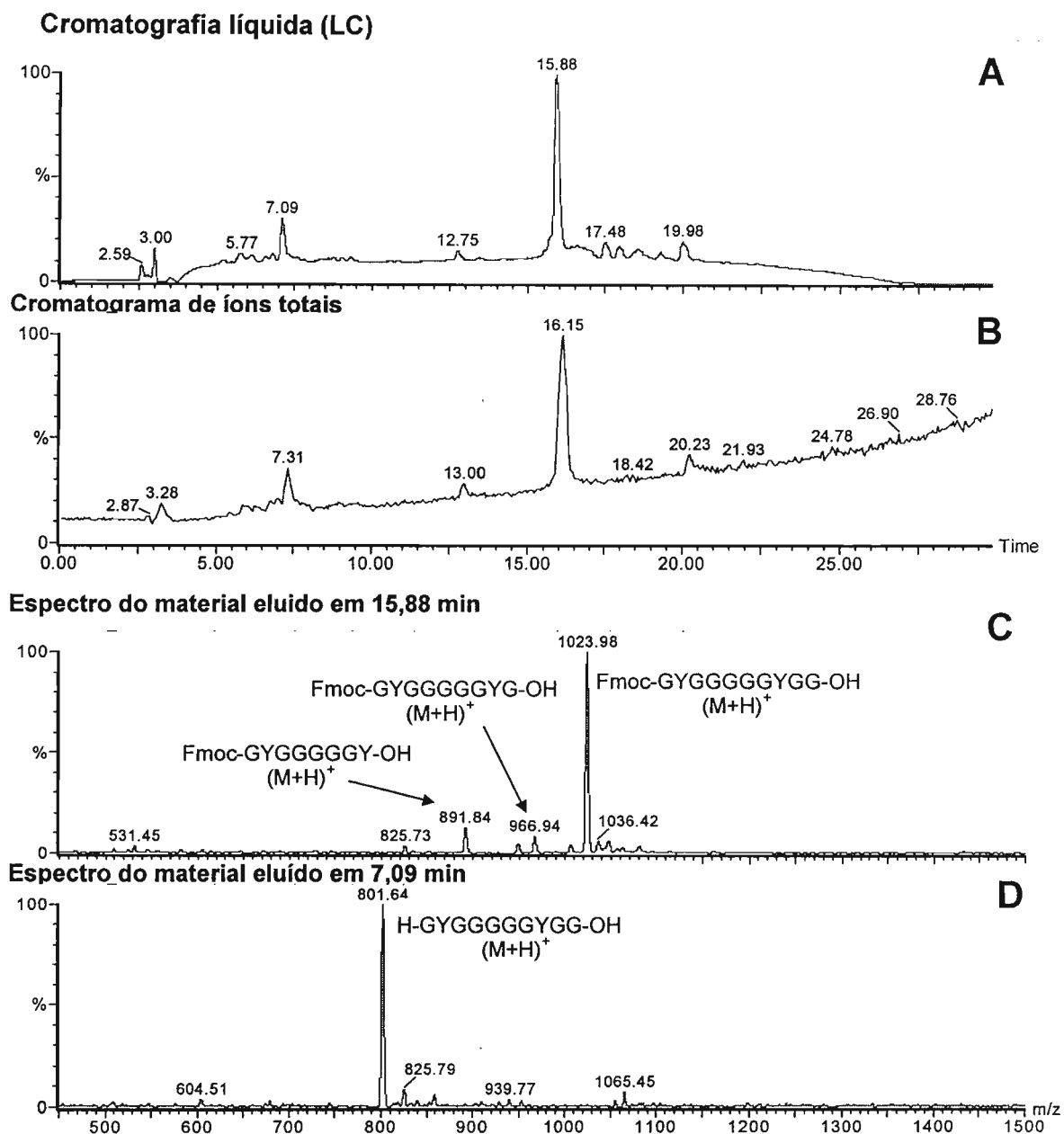


Figura 42: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total da *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida. Condições da LC: Injeção: 5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 90% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

esperada (**Tabela 21**). Como o grupo Fmoc não foi removido, as análises por RP-HPLC (**Figura 40B**) e LC/ESI-MS (**Figura 42**) do peptídeo bruto obtido em microescala indicaram que: 1) o componente majoritário 1 corresponde ao peptídeo desejado protegido no seu grupo amino terminal (Fmoc-GYGGGGGYG-OH, **Figuras 40B e 42C**); 2) o componente 2 corresponde ao peptídeo desejado na sua forma livre (H-GYGGGGGYGG-OH, **Figuras 40B e 42D**); 3) os subprodutos correspondem aos peptídeos deletados (Fmoc-G¹¹¹YGGGGGYG¹¹⁹-OH e Fmoc-G¹¹¹YGGGGGY¹¹⁸-OH respectivamente, **Figura 42C**). Tais deleções podem ter acontecido devido a aminoacilações incompletas decorrentes de problemas de agregação (MILTON et al.; 1990). Em geral, a síntese desta peptidil-resina foi bem sucedida.

Acanto 101-110-HMPB-CLEAR amida: Fmoc-G¹⁰¹GGLGGGR(Pmc)GG¹¹⁰-HMPB-CLEAR amida

A síntese foi realizada segundo o protocolo da **Tabela 3** utilizando a estratégia Fmoc (MIRANDA et al., 1993, KEMPÉ; BARANY, 1996, SOUZA et al., 2004) e a mistura DIC:HOBt (1:1) como reagente acoplador. Como na síntese anterior, o terceiro aminoácido foi acoplado usando a mistura BOP:HOBt (1:1) como reagente acoplador para evitar que acontecesse a reação de dicetopiperazina (GAIRI et al., 1990). Os demais acoplamentos foram realizados com TBTU, sendo necessário realizar reacoplamentos somente da Gly¹⁰⁶. O ganho de massa da resina é mostrado na **Tabela 20**. A sua análise de aminoácidos apresentou a proporção molar de aminoácidos esperada (**Tabela 21**). Como no fragmento anterior, o grupamento Fmoc não foi removido antes da clivagem do peptídeo da resina e desproteção total foi feita em microescala (**Figuras 40C e 43**). Duas são as metodologias rotineiramente utilizadas na obtenção de fragmentos protegidos a partir de peptidil-HMPB-CLEAR. A primeira emprega uma solução de 1% TFA/DCM numa reação de 2 minutos; a segunda usa a mistura HAc/TFE/DCM (2:2:6, v/v/v (BARLOS et al., 1989, 1991).

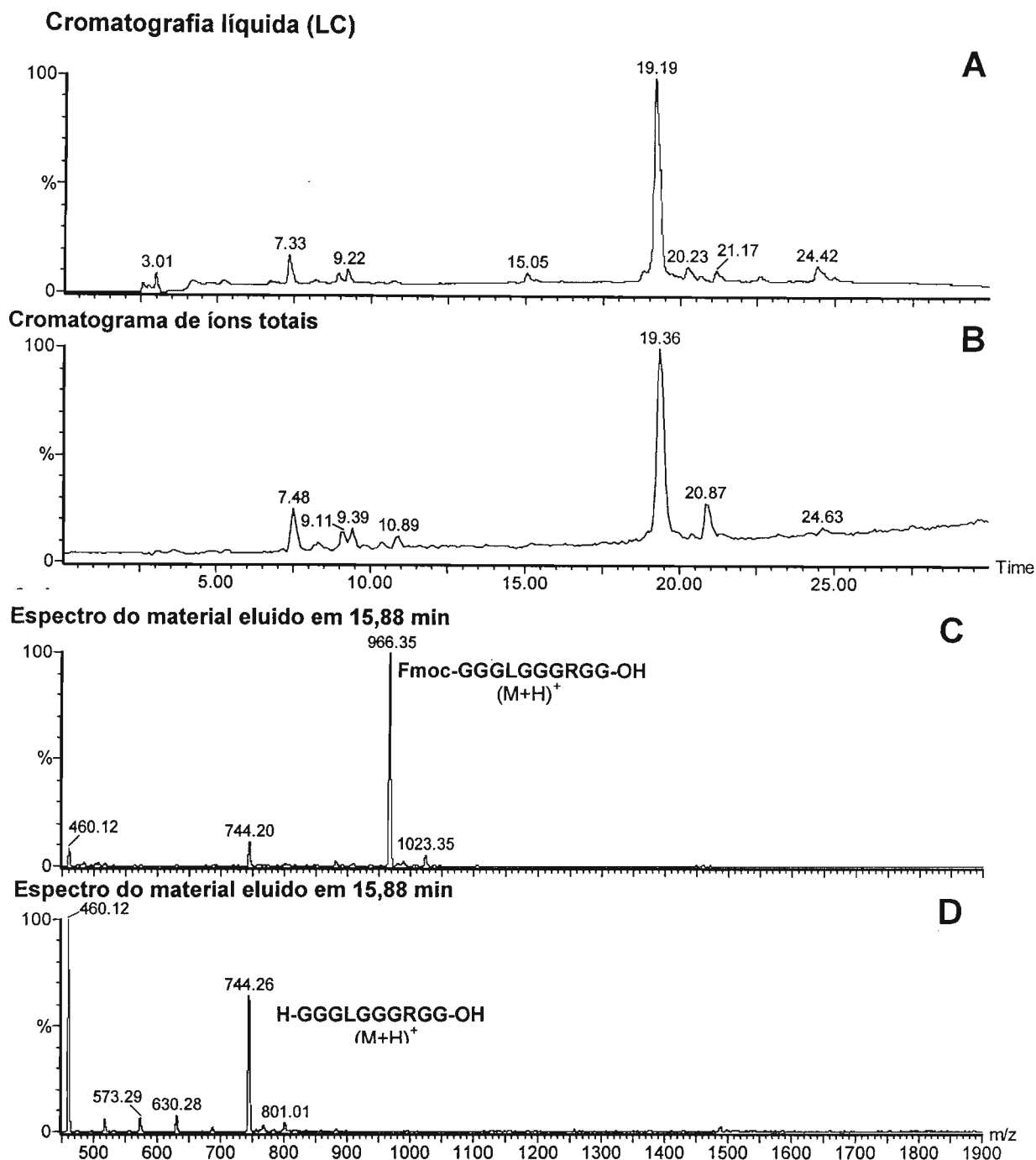


Figura 43: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida. Condições da LC: Injeção: 9 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 90% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

Tabela 20: Resultados da SPFS de *acanto (121-132)*-CLEAR amida, *acanto (111-120)*-HMPB-CLEAR amida, *acanto (101-110)*-HMPB-CLEAR amida.

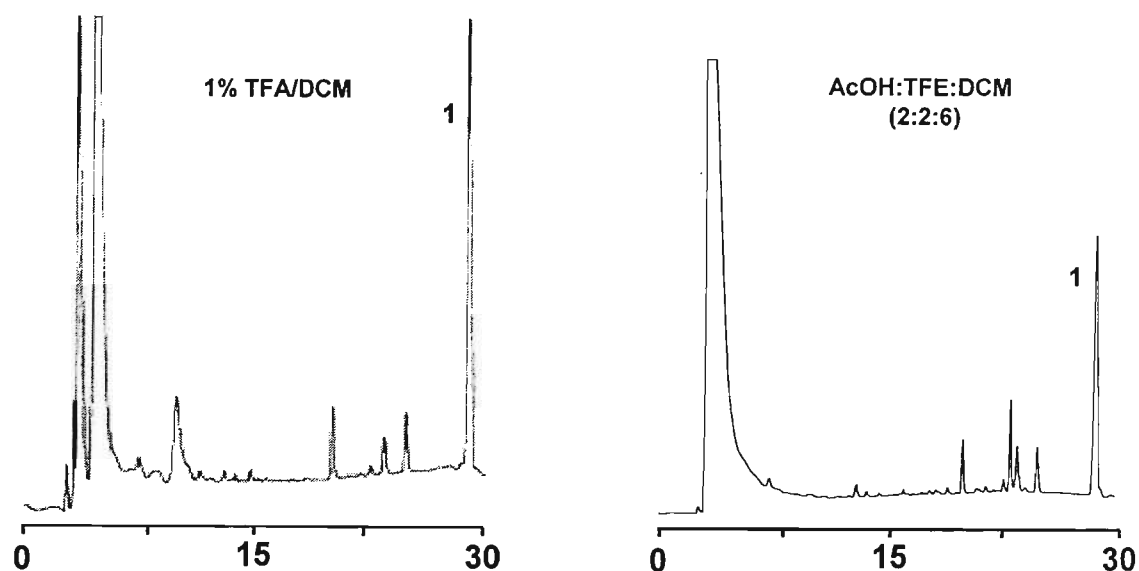
Peptidil-resina	Massa Inicial (g)	Resina massa final (g)	Ganho de massa (g)
<i>acanto (121-132)</i> -CLEAR amida	0,50	0,70	0,20
<i>acanto (111-120)</i> -HMPB-CLEAR amida	0,50	0,71	0,21
<i>acanto (101-110)</i> -HMPB-CLEAR amida	0,50	0,70	0,20

Tabela 21: Caracterização dos *acanto (121-132)*-CLEAR amida, *acanto (111-120)*-HMPB-CLEAR amida, *acanto (101-110)*-HMPB-CLEAR amida por análise de aminoácidos.

Peptidil-resina	Proporção molar dos aminoácidos obsd (calcd)	Grau de substituição (mmol/g)
<i>acanto (121-132)</i> -CLEAR amida	K 2,00 (2,00)	0,20
	Y 2,83 (3,00)	
	G 7,3 (7,00)	
<i>acanto (111-120)</i> -HMPB-CLEAR amida	Y 2,00 (2,00)	0,17
	G 9,31 (9,00)	
<i>acanto (101-110)</i> -HMPB-CLEAR amida	R 1,20 (1,00)	0,15
	L 1,00 (1,00)	
	G 11,05 (8,00)	

As análises por RP-HPLC dos produtos do desligamento de Fmoc-G¹¹¹Y(But)GGGGGY(But)GG¹²⁰-HMPB-CLEAR amida pelas duas metodologias mostraram um componente majoritário 1 (**Figura 44A**) que acreditávamos ser o fragmento protegido desejado. Por outro lado, análises por RP-HPLC do produto do

A) Fmoc-G¹¹¹Y(But)GGGGY(But)GG¹²⁰-HMPB-CLEAR amida



B) Fmoc-G¹⁰¹GGLG GGR(Pmc)GG¹¹⁰-HMPB-CLEAR amida

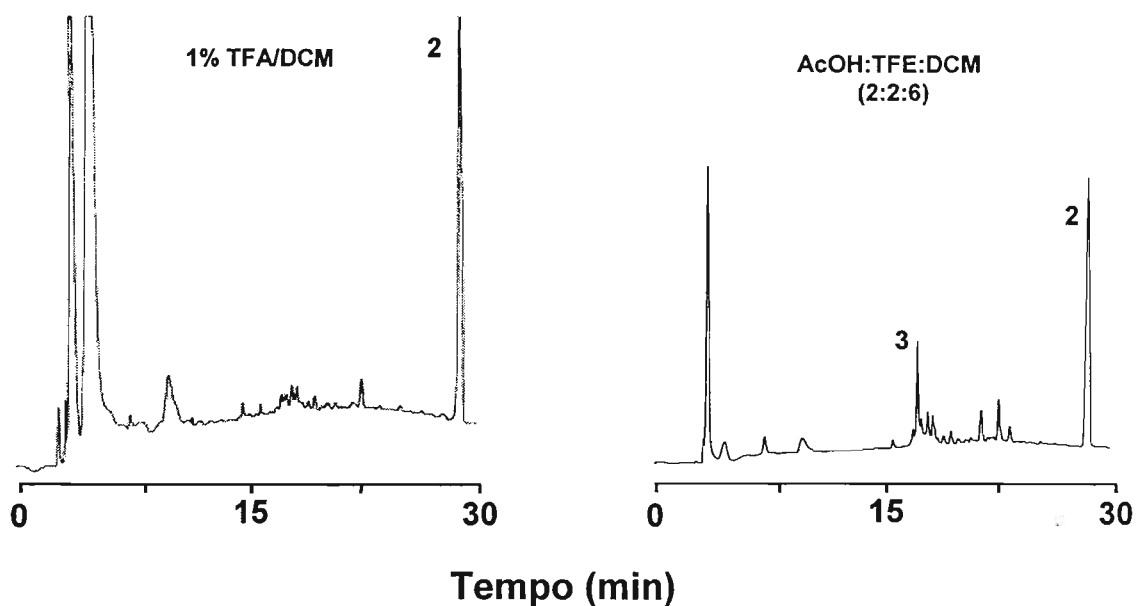


Figura 44: Análises por RP-HPLC dos produtos do desligamento do peptídeo da *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida e da *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida. Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 90% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

desligamento de Fmoc-G¹⁰¹GGLGGGR(Pmc)GG¹¹⁰-HMPB-CLEAR amida pelas duas metodologias indicaram a presença de um componente majoritário 2 (**Figura 44B**) e outro (3). Infelizmente, as análises por LC/ESI-MS mostraram que 1-3 não correspondiam aos peptídeos protegidos desejados, que aparentemente não foram desligados da resina.

Durante a síntese da proteína β -amilóide por SCPFS, Hendrix e colaboradores observaram que a agregação das cadeias em crescimento na resina impediu o desligamento do peptídeo protegido que só foi conseguido com uso de LiBr 0,2M (HENDRIX et al., 1990). Como tivemos dificuldade de desligar o peptídeo protegido da resina, suspeitamos que o mesmo tivesse ocorrido como fragmento em estudo.

Assim, coletamos os espectros NIR-FT-Raman na região amida I da *acanto* (121-132)-CLEAR amida, *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida e *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida disponíveis (**Figure 45**). Conforme se observa, enquanto o espectro da *acanto* (121-132)-CLEAR amida apresentou uma banda intensa em 1675 cm⁻¹ indicativa de estruturação em folha β pregueada das cadeias peptídicas, o espectro da *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida mostrou duas bandas: uma em 1648 cm⁻¹, indicativa de estrutura em hélice, e uma outra banda em 1672 cm⁻¹, indicativa de uma sobreposição de cadeias com estrutura randômica (menor número de onda) e cadeias com estrutura em folha β pregueadas (maior número de onda) (TORREGIANI; FINI, 1998). O espectro da peptidil-resina *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida também mostrou as bandas em 1648 e 1672 cm⁻¹ que estavam presentes no espectro da peptidil-HMPB-CLEAR amida anterior, além de outra banda em 1693 cm⁻¹ que corresponde a cadeias que apresentam algum tipo de dobra (BYLER; SUSI, 1988). Estes dados confirmaram as nossas suspeitas de que as peptidil-resinas correspondentes aos fragmentos da *acanto* apresentavam agregação devido a interações intercadeias peptídicas. No caso dos 111-120 e 101-110, ela impediu o desligamento da resina na forma protegida.

Este fato evidenciou a dificuldade de SCPFS do fragmento 101-132 da acantoscurreina.

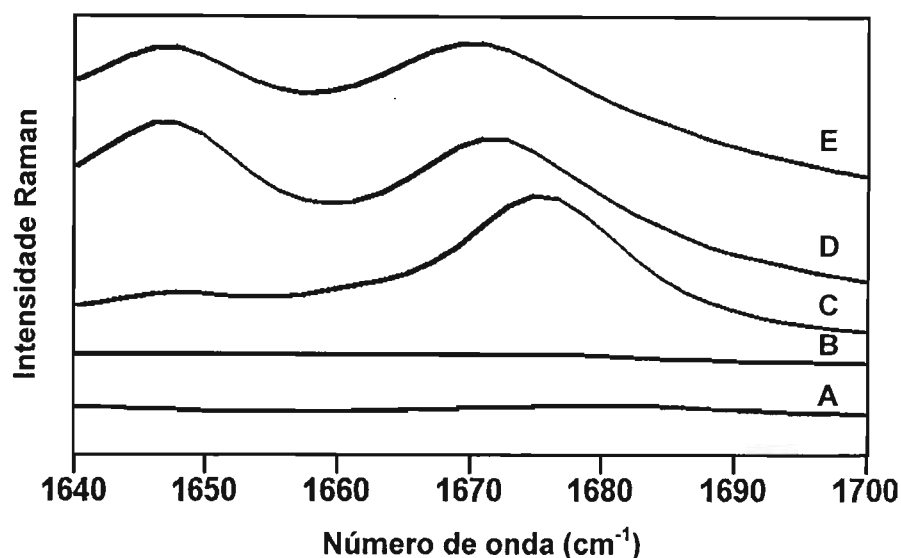


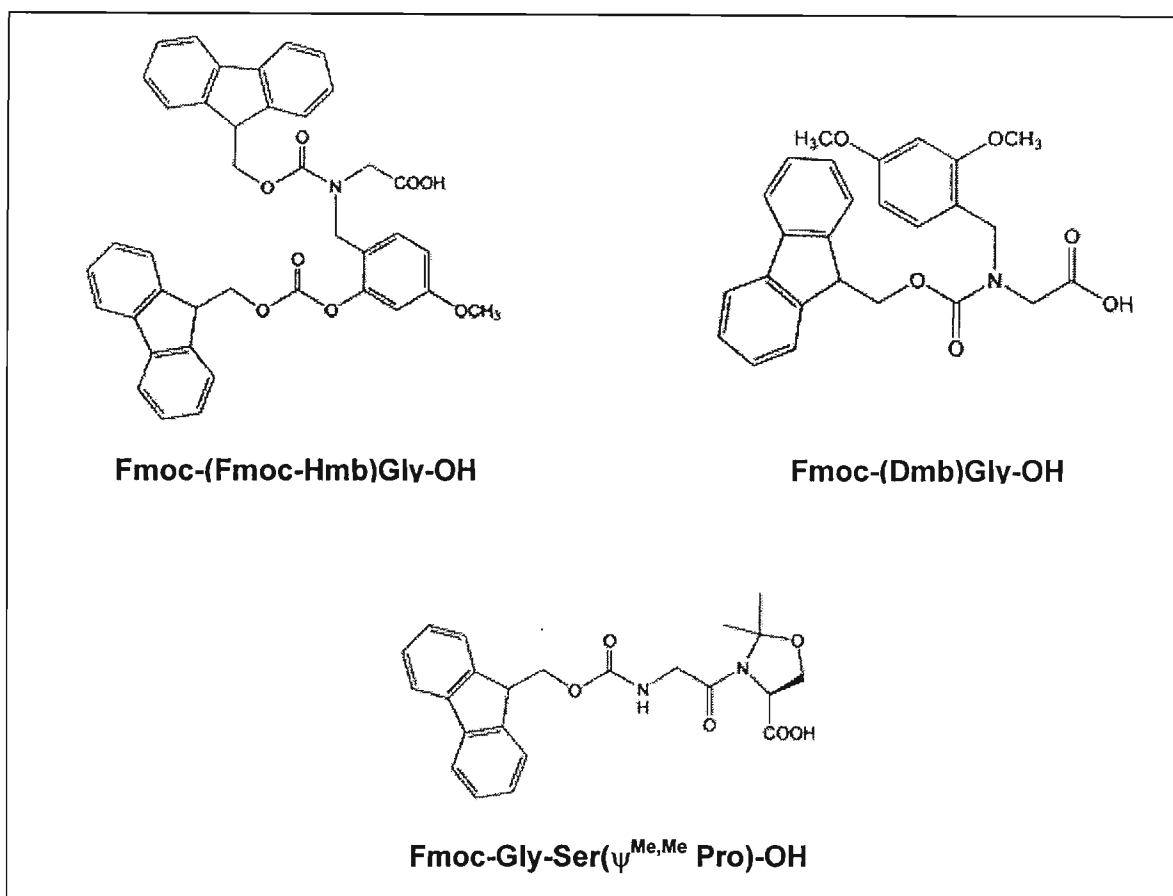
Figura 45: Espectros NIR-FT-Raman na região amida I (1640-1700 cm^{-1}) da CLEAR amida (A), do linker HMPB acoplado à CLEAR amida (B) e das peptidil-resinas *acanto* (121-132)-CLEAR amida (C) *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida (D) e *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida (E).

e) Tentativa de SPFS passo a passo usando protetor de esqueleto peptídico

Zahariev e colaboradores durante a síntese do fragmento C-terminal da nucleolina humana pela abordagem de síntese convergente também observou problemas de agregação nos fragmentos sintetizados que apresentaram problemas de baixos rendimentos de acoplamentos e problemas na solubilidade e purificação dos fragmentos protegidos (ZAHARIEV et al., 2005). Eles conseguiram resolver estes problemas usando protetores de esqueleto peptídico (BLAAKMER et al., 1991; JONHSON et al., 1993; WOHR et al., 1996) que impedem a formação de ligações de hidrogênio intercadeias em crescimento na resina e, portanto, a estruturação do peptídeo em folhas β pregueadas.

Em vista das dificuldades de síntese do fragmento *acanto* (101-132) por diferentes estratégias e abordagens já discutidas anteriormente, decidimos utilizar tais

protetores. Os compostos abaixo (WÖHR et al., 1996, ZAHARIEV et al., 2005, GARCÍA-MARTÍN et al., 2006b) estão entre os mais usados como alternativa para a SPFS passo a passo de peptídeos agregantes (MILTON et al., 1990, BEYERMANN; BIENERT, 1992):

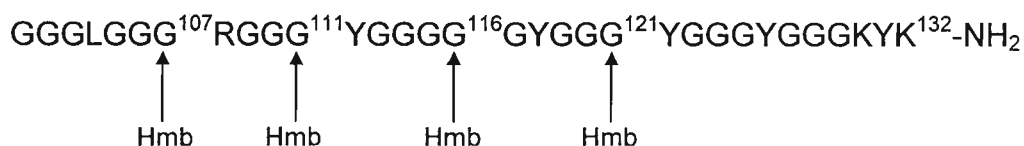


Se por um lado, o uso de Fmoc-pseudoprolinas é mais vantajoso por não causar impedimento estérico que dificulte o acoplamento do aminoácido seguinte à peptidil-resina, por outro, ele fica restrito a sequências que possuem Ser, Thr e Cys e aminoácidos indispensáveis para a formação das pseudo prolinas (SAMPSON et al., 1999).

Como o fragmento 101-132 da acantoscurreína não contém Ser, Thr nem Cys, decidimos utilizar o grupo Hmb como protetor do esqueleto peptídico, o Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH já foi usado com sucesso na síntese de várias seqüências agregantes, tais como a [Leu⁵]-encefalinamida, região repetitiva da proteína tau-2 humana,

fragmento (65-74) da proteína carregadora de acila, fragmento 1-43 da proteína β -amilóide, fragmento 368-379 da agregacan e fragmento 985-1004 da subunidade do canal de cálcio humano α_{1E-3} (JOHNSON et al., 1993; QUIBELL et al., 1994, 1995; SIMMONDS, 1996).

A síntese foi realizada seguindo o protocolo da **Tabela 3** usando a estratégia Fmoc (MIRANDA et al., 1993, KEMPE; BARANY, 1996, SOUZA et al., 2004), a mistura DIC:HOBt (1:1) como reagente acoplador e 20% DMSO/NMP como solvente. O Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH foi acoplado nas posições 107, 111, 116 e 121 com vistas a prevenir agregação nos acoplamentos dos seis aminoácidos seguintes (SIMMONDS, 1996).

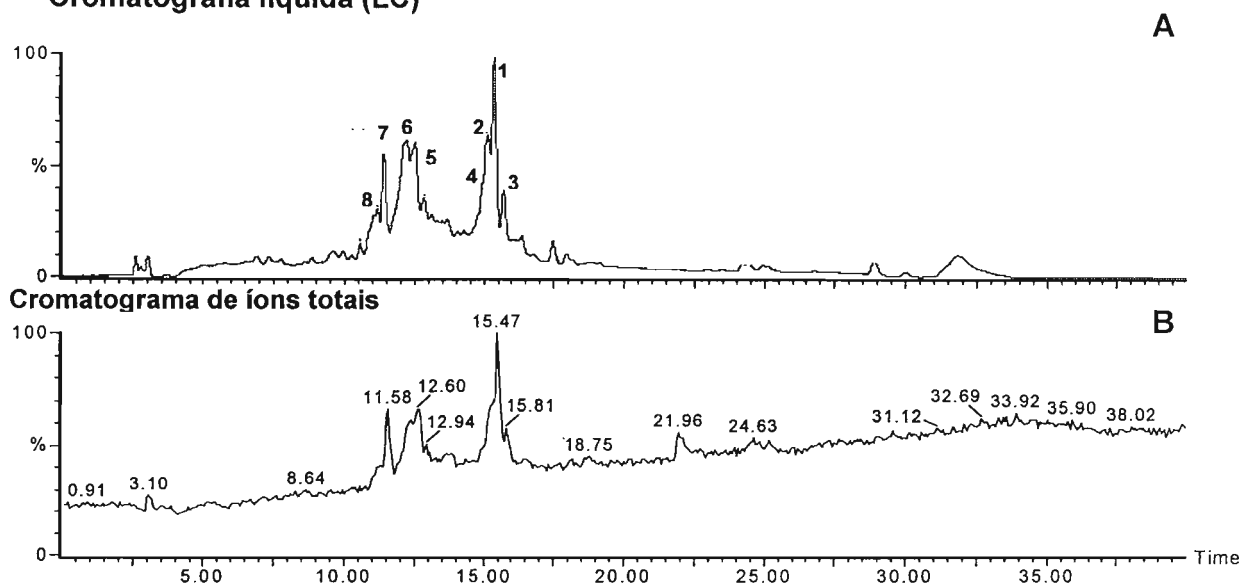


Depois do acoplamento do Gly¹¹⁶ (décimo sétimo resíduo na resina) o solvente foi trocado para 0,8M LiCl/NMP. Nos acoplamentos de Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH, acoplamentos dos aminoácidos posteriores a ele e reacoplamentos em geral foram utilizados o TBTU ou HBTU como reagente acoplador. A desproteção do Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH e o acoplamento do resíduo posterior não puderam ser monitorados pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) pois este derivado contém o Fmoc como protetor do grupo amina α . Uma acetilação foi realizada após o acoplamento da Gly¹¹⁶. Não foi possível calcular o ganho de massa na resina devido a problemas de ordem técnica.

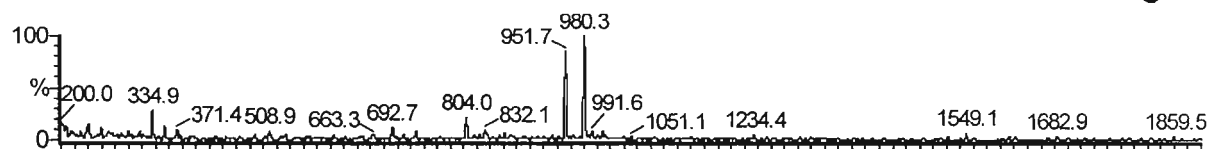
A síntese começou a mostrar problemas de desproteção e acoplamentos incompletos repetidos após a incorporação do décimo nono resíduo à resina. Como eles se agravaram nas tentativas de acoplamento dos dois aminoácidos seguintes, a síntese foi interrompida a suposta incorporação da Gly¹¹¹ (vigésimo segundo resíduo na resina). A peptidil-resina foi seca a vácuo e estocada a -4°C . Uma pequena alíquota dela foi submetida à clivagem da resina e desproteção total para a obtenção

do peptídeo bruto, cujas análises por LC/ESI-MS (Figura 46) indicaram que a síntese não foi bem sucedida: o componente majoritário 1 (Figura 46E) correspondia a uma mistura dos fragmentos acanto (114-132; $G^{114}GGGYGGGYGGGYGGGKYK^{132}-NH_2$) e acanto (115-132; $G^{115}GGYGGGYGGGYG G GKYK^{132}-NH_2$), respectivamente, contendo um grupo Hmb não removido. O componente 2 (Figura 46D) correspondia ao fragmento *acanto* (113-132, $G^{113}GGGYGGGYGGGYGGGKYK^{132}-NH_2$) com um

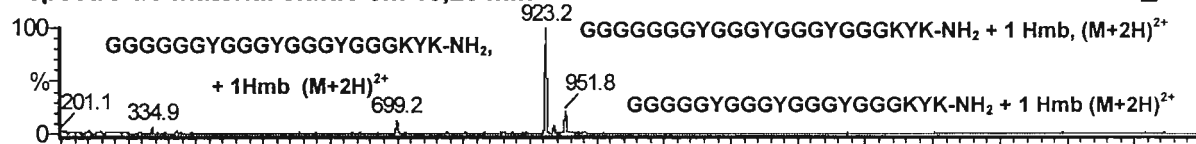
Cromatografia líquida (LC)



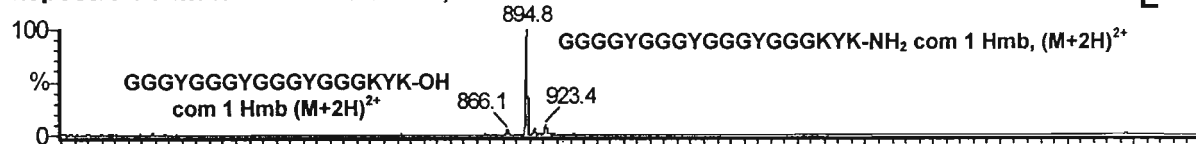
Espectro do material eluído em 14,99 min



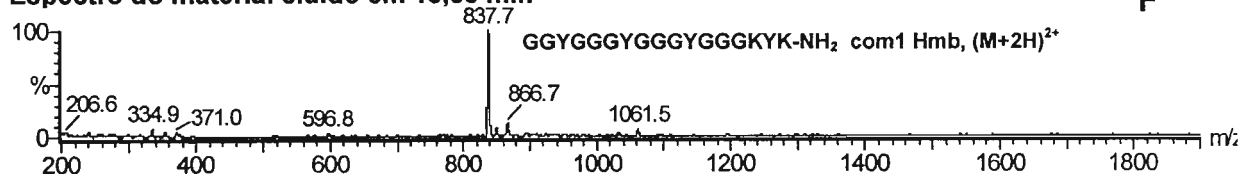
Espectro do material eluído em 15,26 min



Espectro do material eluído em 15,54 min



Espectro do material eluído em 15,88 min



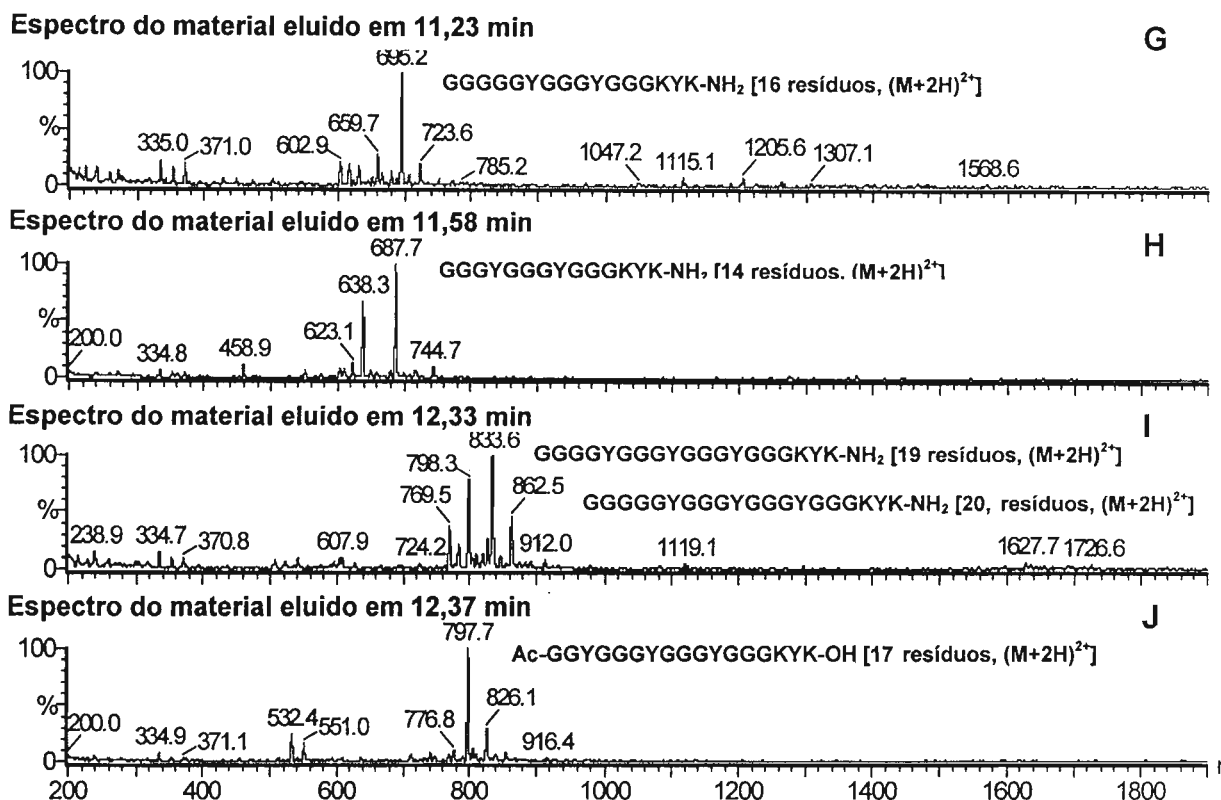
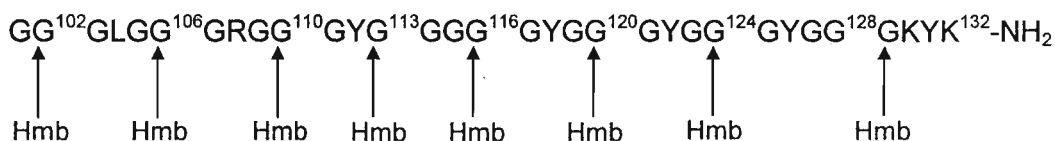


Figura 46: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total da peptidil-resina obtida na primeira tentativa de uso de Hmb como protetor de esqueleto peptídico. Condições da LC: Injeção: 10 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

grupo Hmb. O componente 3 (Figura 46F) correspondia ao fragmento *acanto* (116-132, G¹¹⁶GYGGGYGGGYGGGKYK¹³²-NH₂) contendo o grupo Hmb. O componente 4 (Figura 53C) correspondia a alguns análogos do fragmento *acanto* (113-120) acrescidos de uma ou duas Gly e um grupo Hmb. O componente 5 (Figura 46J) correspondia ao fragmento *acanto* (116-132) acetilado (Ac-G¹¹⁶GYGGGYGGGYGGGKYK¹³²-NH₂). O componente 6 (Figura 46I) correspondia aos fragmentos *acanto* (114-132) e (113-132) e os componentes 7 e 8 (Figuras G e 53H) aos fragmentos (119-132) e análogo acrescido de duas Gly.

Embora não tenhamos chegado ao fragmento 101-132 da acantoscurreina, estes resultados foram essenciais para uma nova tentativa usando Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH mais prematuramente e com maior frequência (SIMMONDS, 1996). De fato, na síntese em estudo o Hmb não produziu o efeito de longa proteção contra a agregação intercadeias (HYDE et al., 1994; JOHNSON et al., 1995) como já foi postulado para o (Hmb)Gly em particular (SIMMONDS, 1996). Além disso, os problemas de aminoacilações incompletas se iniciaram após o acoplamento da Gly¹¹³ à peptidil-CLEAR, mas os espectros NIR-FT-Raman das peptidil-CLEAR-amida indicaram que já no acoplamento da Tyr¹²⁶ à peptidil-CLEAR as cadeias peptídicas em crescimento já estavam se estruturando em folhas β .

A nova síntese também foi realizada a 60°C usando DIC/HOBt como reagente acoplador e 20% DMSO/NMP como sistema de solvente. Desta vez, o aminoácido Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH foi introduzido nas posições Gly¹²⁸, Gly¹²⁴, Gly¹²⁰, Gly¹¹⁶, Gly¹¹³, Gly¹¹⁰, Gly¹⁰⁶ e Gly¹⁰² e os aminoácidos posteriores a ele foram acoplados com a mistura de reagentes ativadores TBTU/HOBt (1:1):



O sistema de solventes foi mudado para 20% DMSO/NMP contendo LiCl 0,8M nos acoplamentos da Tyr¹²⁶, Gly¹¹⁹, Gly¹¹³, Gly¹⁰⁹ e Leu¹⁰⁴. Foram coletadas alíquotas de peptidil-resina após os acoplamentos dos resíduos Tyr¹²⁶, Tyr¹¹⁸, Tyr¹¹², Gly¹⁰⁶ e Gly¹⁰¹. Terminada a síntese, as peptidil-resina foi seca sob vácuo e estocada a -4°C.

A **Figura 47** mostra os espectros NIR-FT-Raman da *acantoHmb* (126-132)-CLEAR amida [Fmoc-Y¹²⁶(But)G(Hmb)GGK(Boc)Y(But)K¹³²(Boc)-CLEAR amida] na região amida I. Ele contém duas bandas em 1648 e 1671 cm⁻¹ (**Figura 47B**), sendo a primeira banda atribuída a uma conformação em hélice e a segunda a uma sobreposição de duas bandas: uma devido a cadeias em crescimento associadas em

folha β (maior número de onda) e outra devido a cadeias em crescimento com estrutura randômica (menor número de onda) (TORREGIANI; FINI, 1998). Apesar de menos definidos, ambas as bandas também estão presentes nos espectros das *acantoHmb* (118-132)-CLEAR amida [Fmoc-Y¹¹⁸(But)G(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGK(Boc)Y(But)K¹³²(Boc)-CLEAR amida] e *acantoHmb* (112-132)-CLEAR amida [Fmoc-Y¹¹²(But)(Hmb)GGG(Hmb)GGY(But)(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGK(Boc)Y(But)K¹³²(Boc)-CLEAR amida] (Figura 47C e 47D). Por outro lado, o espectro da *acantoHmb* (106-132)-CLEAR amida [Fmoc-(Hmb)G¹⁰⁶GR(Pmc)G(Hmb)GGY(But)(Hmb)GGG(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGY(But)G(Hmb)GGK(Boc)Y(But)K¹³²(Boc)-CLEAR amida] apresentou três bandas (Figura 47E): 1) uma em 1648 cm⁻¹ atribuída a cadeias com conformação

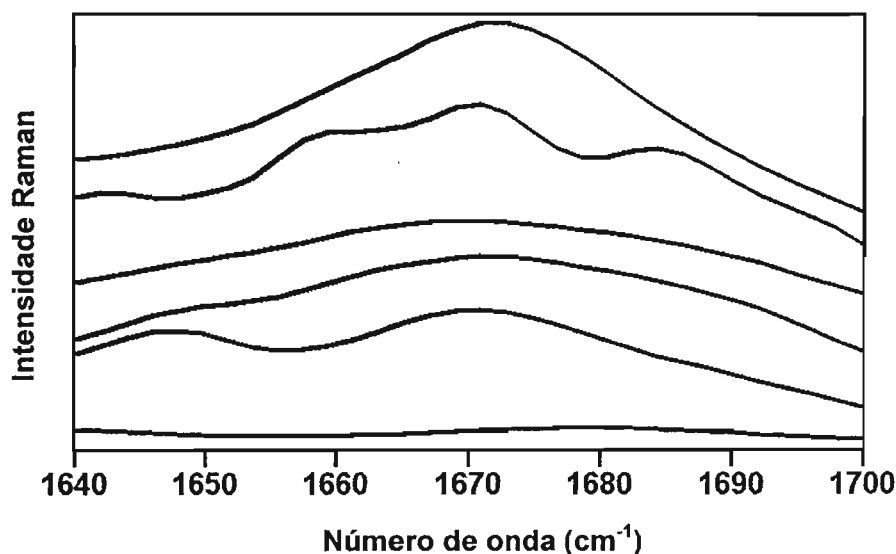


Figure 47. Espectros NIR-FT-Raman da resina CLEAR amida e das peptidil-resinas *acantoHmb* (126-132)-CLEAR amida, *acantoHmb* (118-132)-CLEAR amida, *acantoHmb* (112-132)-CLEAR amida, *acantoHmb* (106-132)-CLEAR amida e *acantoHmb* (101-132)-CLEAR amida (de baixo para acima).

randômica; 2) outra em 1671 cm⁻¹ atribuída a uma sobreposição de duas bandas [uma devido a cadeias em crescimento associadas em folha β (maior número de onda) e outra devido à presença de cadeias em crescimento com estrutura randômica (menor

número de onda) (TORREGIANI; FINI, 1998)]; 3) outra em 1684 cm^{-1} atribuída a uma possível dobra γ formada após o acoplamento da Arg⁸ (DREWES; ROWLEN, 1993). É interessante que, o espectro Raman da peptidil-resina *acanto* (101-132)-CLEAR amida tenha apresentado somente uma banda intensa em 1672 cm^{-1} (Figura 47F).

Uma amostra da peptidil-resina final foi submetida à clivagem da resina e desproteção total. A Figura 48A mostra os resultados das análises por RP-HPLC do produto bruto. Como ele contém vários componentes, concluímos que a síntese não foi muito eficiente. Entretanto, o espectro de massas do componente principal eluído em 12,37 min (Figura 48B) revelou que ele era o fragmento *acanto* 101-132 desejado; os outros componentes eram peptídeos deletados em uma a cinco Gly (derivados da agregação ocorrida) ou contendo uma ou três Gly extras (produzidos durante os reacoplamentos de Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH, pois eles ocorrem em meio básico e o Fmoc deste aminoácido é especialmente lábil à base; BODANSZKY et al., 1979).

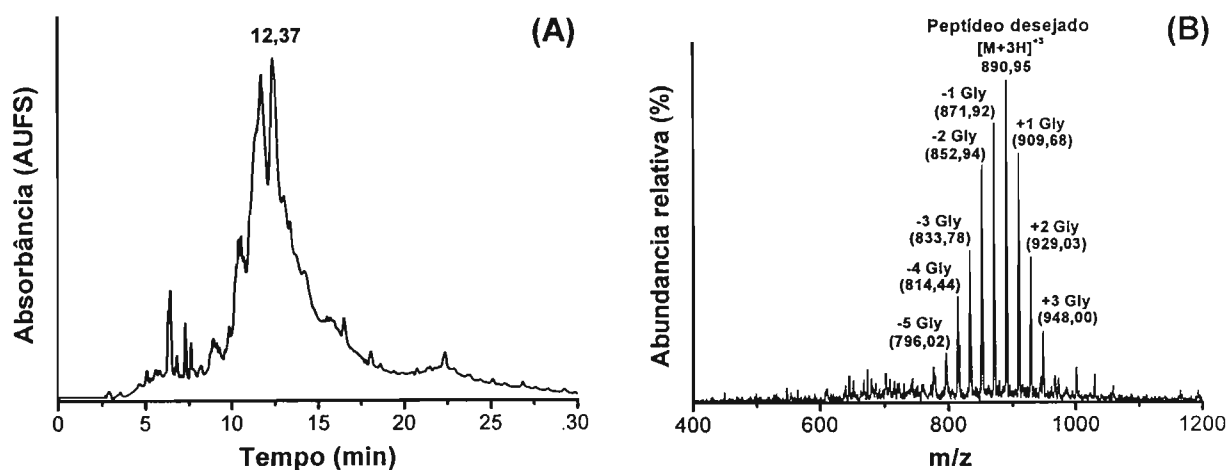
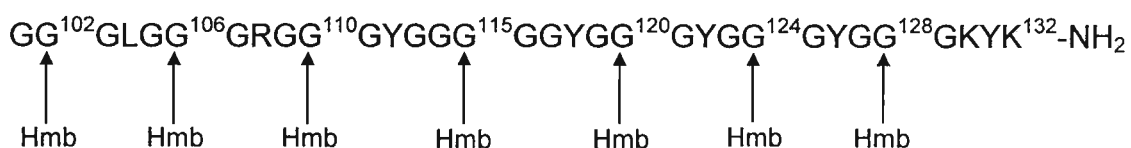


Figure 48. Análise por RP-HPLC do produto resultante da desproteção total e clivagem da peptidil-resina obtida na 2^a tentativa de uso de Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH (A) e espectro de massa do componente principal ($t_R = 12,37$ min) (B).

Estes resultados demonstraram que havíamos encontrado as condições e abordagem adequada para obter o fragmento 101-132 desejado, mas que elas

precisavam ser otimizadas para minimizar a formação dos subprodutos e obtê-lo com melhor qualidade.

Finalmente, realizamos nova tentativa evitando totalmente o uso de TBTU e de base. A síntese foi realizada a 60°C usando DIC/HOBt como reagente acoplador e 20% DMSO/NMP como sistema de solvente. O aminoácido Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH foi introduzido nas posições Gly¹⁰², Gly¹⁰⁶, Gly¹¹⁰, Gly¹¹⁵, Gly¹²⁰, Gly¹²⁴ e Gly¹²⁸. O sistema de solventes foi mudado para 20% DMSO/NMP contendo LiCl 0,8 M nos acoplamentos da Tyr¹²⁶, Gly¹¹⁹, Gly¹¹⁴, Gly¹⁰⁹ e Leu¹⁰⁴.



Terminada a síntese, a suposta *acantoHmb* (101-132)-CLEAR amida foi seca sob vácuo e estocada a -4°C. Uma amostra dela (202 mg) foi submetida a clivagem do peptídeo da resina e desproteção total para fornecer 46 mg de peptídeo bruto, o qual foi analisado por RP-HPLC e LC/ESI-MS. Este demonstrou conter como componente principal o peptídeo desejado G¹⁰¹GGLGGGRGGGYGGGGGYGGGYGGGYGGGGKYK¹³²-NH₂ (*t*_R = 21,8 min; *m/z* calculado para C₁₁₅H₁₆₄N₃₈O₃₇: [M+2H]²⁺ 1335.6, encontrado 1336.3; [M+3H]³⁺ 890.7, encontrado 891.2; [M+4H]⁴⁺ 668.3, encontrado 668.6; **Figure 49A**). Os contaminantes detectados correspondem a análogos deletados em uma e duas Gly ([M+3H]³⁺ 853.2, 872.1) ou contendo uma Gly extra ([M+3H]³⁺ 909.9) resultantes de aminoacilações incompletas ou remoção prematura do Fmoc por piperidina remanescente, pois o Fmoc de Fmoc-Glyé particularmente lábil a ela (BODANSZKY et al., 1979).

Posteriormente, o fragmento 101-132 da acantoscurrina foi purificado por RP-HPLC obtendo-se 1,6 mg (97% de pureza, *t*_R = 12.8 min; *m/z* calculado para C₁₁₅H₁₆₄N₃₈O₃₇: [M+2H]²⁺ 1335.6, encontrado 1336.1; [M+3H]³⁺ 890.7, encontrado 891.2; [M+4H]⁴⁺ 668.3, encontrado 668.7) (**Figure 49B**).

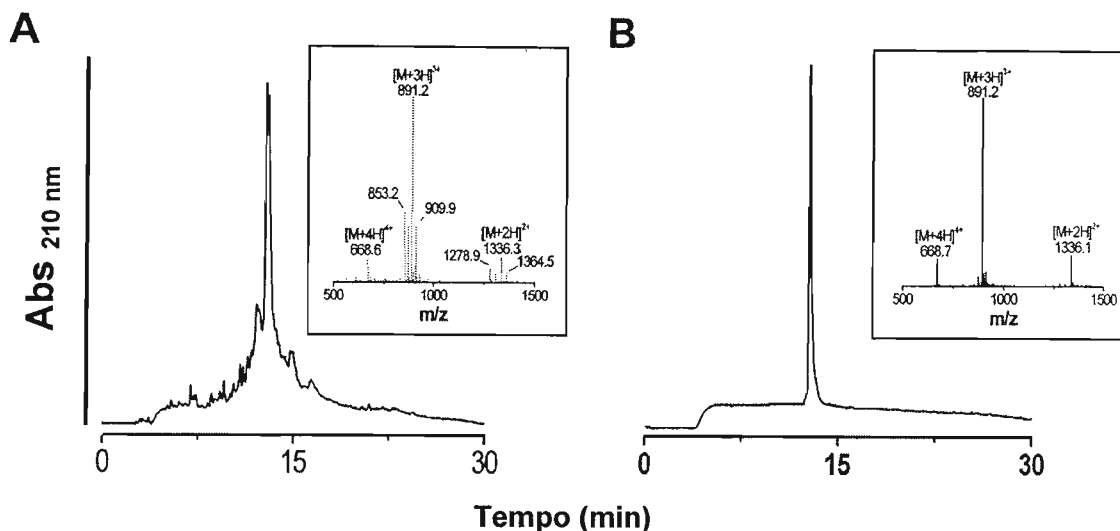


Figure 49: Perfis de RP-HPLC e de LC/ESI-MS dos *acanto* (101-132) bruto (A) e purificado (B). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

Além de demonstrar claramente que nem toda sequência peptídica é facilmente obtida por SPFS passo a passo (BACSA et al., 2008), estes resultados demonstraram pela primeira vez que a resina CLEAR amida é compatível com a SPFS passo a passo a 60°C em 20% DMSO/NMP e que a combinação de ambas com DIC/HOBt, Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH e o sal caotrópico LiCl é efetiva para evitar a ocorrência de agregação, um fenômeno sequência-dependente inerente e bastante temido na SPFS (REMUZGO et al., 2008).

4.2.2. Síntese do fragmento repetitivo *acanto* (23-48)

A experiência anterior nos levou a tentar a síntese deste fragmento, utilizando a resina CLEAR, neste caso a Boc-Gly-CLEAR ácida. A síntese foi realizada a temperatura ambiente usando a estratégia Fmoc e DMF como solvente. Todos os acoplamentos foram realizados com DIC e HOBt (1:1) como reagentes acopladores e DMF como sistema de solvente. As incorporações dos primeiros treze resíduos de aminoácidos à resina não apresentaram problemas, somente a Gly⁴¹ (oitavo resíduo

de aminoácido a partir do C-terminal ligado à resina) teve que ser reacoplada. Após o décimo terceiro acoplamento, a síntese foi interrompida para obter o fragmento acanto [31-48], a resina foi seca sob vácuo e pesada revelando um ganho de massa de 0,19 g.

Parte do total de peptidil-resina obtido (300 mg) foi estocada. Aos 300 mg restantes foram incorporados novos aminoácido até a Gly²⁵ que teve que ser acoplada em 0,8 M LiCl/NMP. A partir de então, as incorporações de aminoácidos só foram conseguidas com reacoplamentos e o Fmoc só pode ser removido em 30% piperidina/DMF. Não foi possível calcular o ganho de massa na resina devido às retiradas freqüentes para teste de ninidrina.

As análises por RP-HPLC (**Figura 50A**) e LC/ESI-MS (**Figura 51**) do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *acanto* (31-48)-CLEAR ácida [Fmoc-L³¹GGGK(Boc)GLGGGGLG⁴⁸-CLEAR ácida] mostraram que o componente

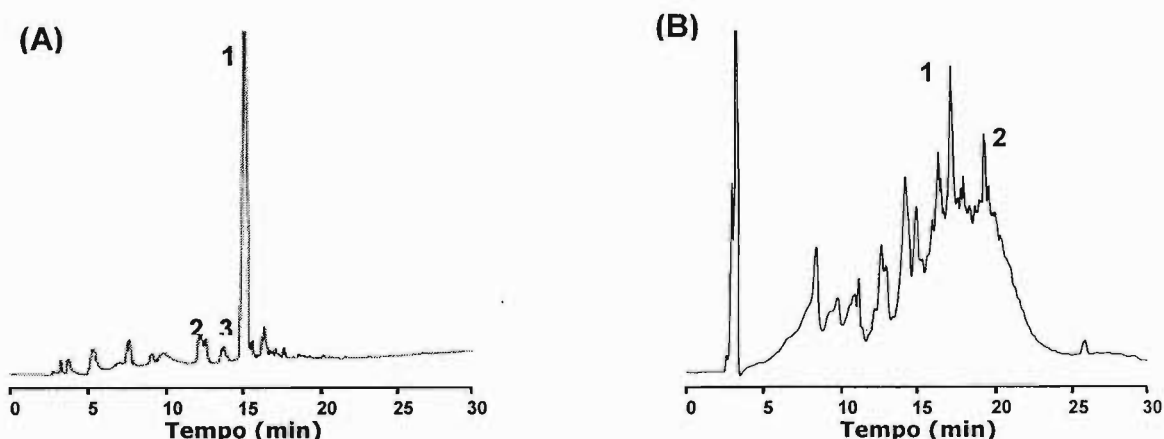


Figura 50: Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos resultante da clivagem da resina e desproteção total de *acanto* (31-48)-CLEAR ácida (A) e *acanto* (23-48)-CLEAR ácida (B). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

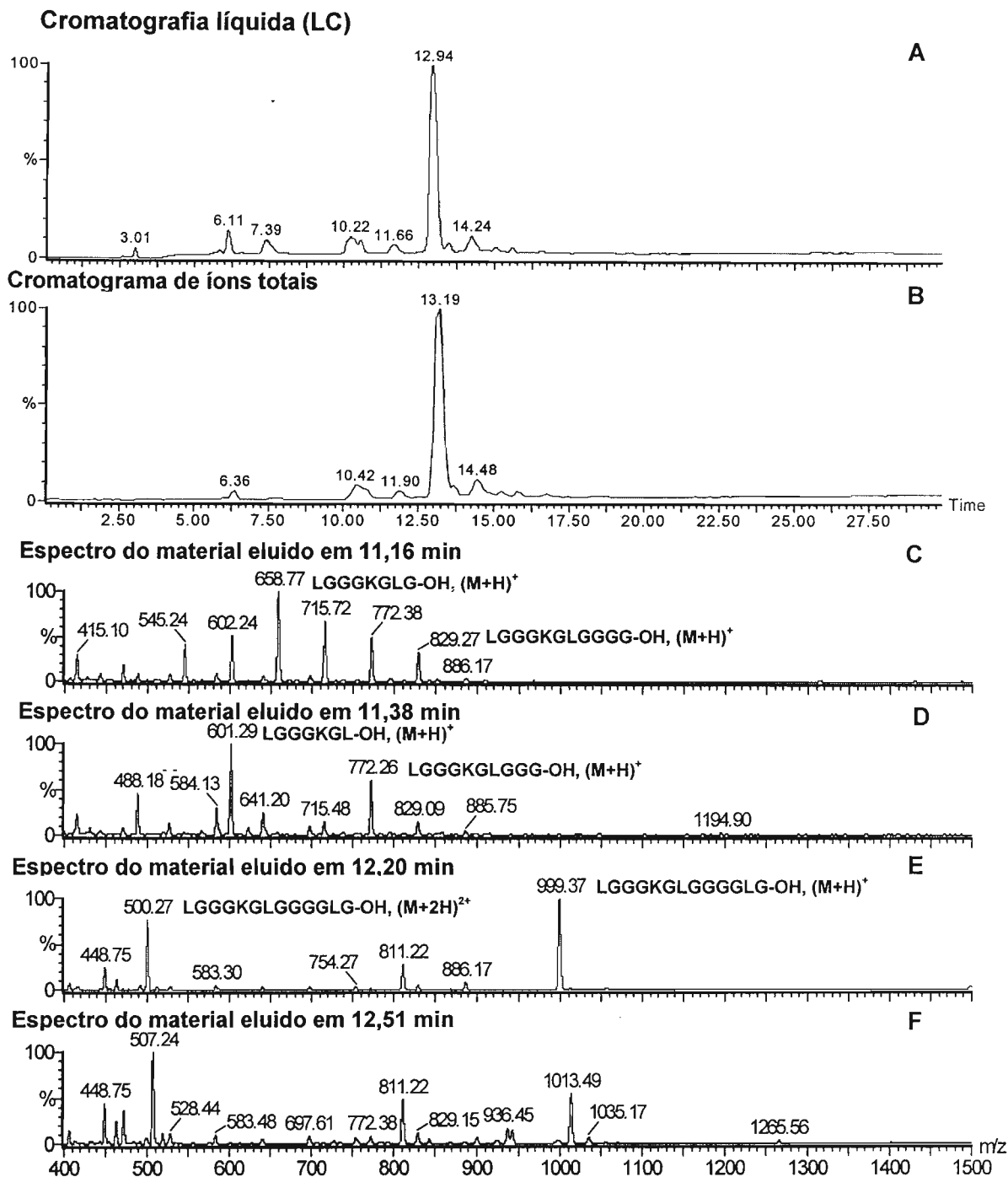


Figura 51: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto da clivagem da resina e desproteção total de *acanto* (31-48)-CLEAR ácida. Condições da LC: Injeção: 5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições do ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

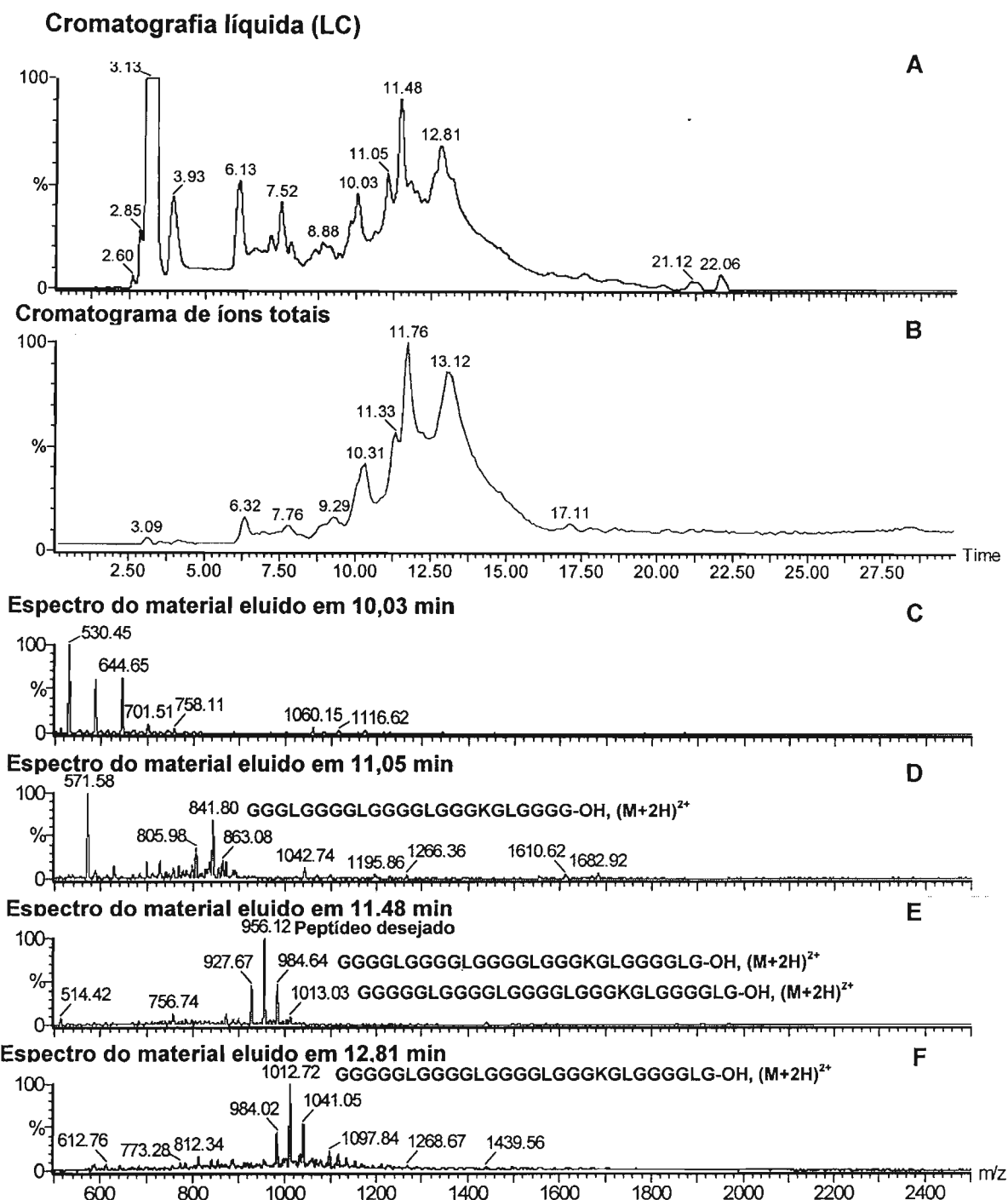


Figura 52: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de acanto (23-48)-CLEAR ácida. Condições da LC: Injeção: 10 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 minutos, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

majoritário 1 correspondia ao peptídeo desejado L³¹GGGKGLGGGGLG⁴⁸-OH. Os componentes 2 e 3 correspondiam aos análogos do peptídeo desejado deletados em dois, três, quatro, cinco, seis e sete aminoácidos (**Figuras 51C e 51D**) provavelmente decorrentes da formação de dicetopiperazina. Esta reação secundária usual da SPFS passo a passo convencional pode ser favorecida pela presença de um bom grupo *sainte* ligado à Gly ou Pro (STEWART; YOUNG, 1984), neste caso, éster entre a Gly e a resina CLEAR ácida (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997). Como os contaminantes ocorrem em pequena extensão, a síntese foi bem sucedida.

Já as análises por RP-HPLC (**Figura 50B**) e LC/ESI-MS (**Figura 52**) do produto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *acanto* (23-48)-CLEAR ácida mostraram que: i) o componente 1 correspondia ao peptídeo desejado G²³GGLGGGGLGGGGLGGGKGLGGGGLG⁴⁸ (**Figura 52E**); ii) o componente 2 correspondia ao análogo do peptídeo contendo três Gly adicionais em decorrentes dos vários reacoplamentos feitos (**Figura 52F**); iii) o componente 3 correspondia ao análogo do peptídeo desejado deletados nos dois resíduos de aminoácidos C-terminais devido à reação de formação de DCP (G²³GGLGGGGLGGGGLGGGKGLGGGG⁴⁶, **Figura 52D**). Pela alta e baixa quantidades de subprodutos e do produto desejado, respectivamente, concluímos que esta síntese não foi bem sucedida e precisava ser aprimorada.

A **Figura 53** apresenta os espectros Raman na região amida I das peptidil-resinas obtidas. O espectro da *acanto* (31-48)-CLEAR ácida [Fmoc-L³¹GGGK(Boc)GLGGGGLG⁴⁸-CLEAR ácida] apresenta duas bandas: uma em 1648 e outra 1667 cm⁻¹ que indicaram que o peptídeo apresenta uma mistura de estruturas em α -hélice e randômica, respectivamente (**Figura 53B**, COLTHUP et al., 1990). Já o espectro da *acanto* (23-48)-CLEAR ácida apresentou: i) uma banda intensa em 1672 cm⁻¹ indicativa de que as cadeias em crescimento se estruturaram em folhas β ; ii) uma pequena banda em 1645 cm⁻¹ correspondente à estruturação em α -hélice

remanescente (**Figura 53C**). Estes resultados sugeriram que após a incorporação da Gly¹²⁷ à cadeia peptídica em crescimento os acoplamentos e as desproteções tiveram que ser repetidas devido a ocorrência de agregação intercadeias (MILTON et al., 1991).

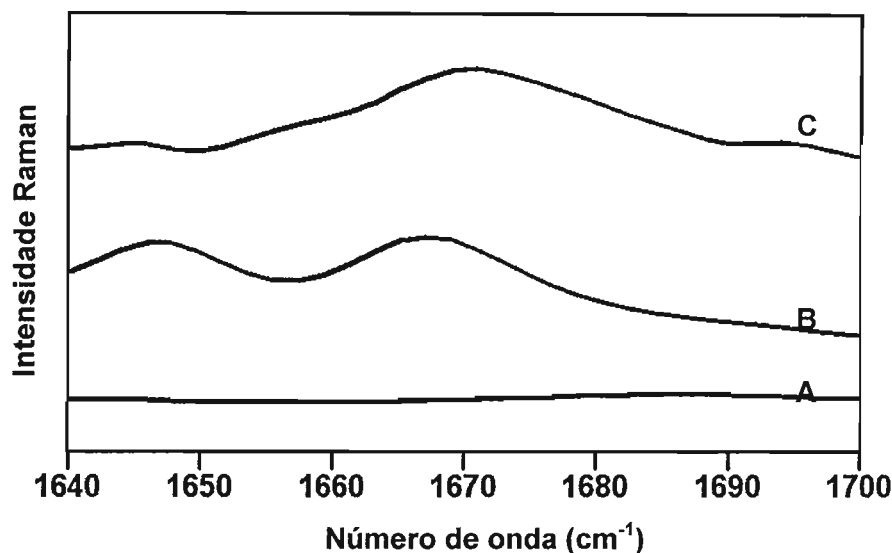


Figura 53: Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I (1640-1700 cm⁻¹) da resina CLEAR ácida (**A**) e das peptidil-resinas *acanto* (31-48)-CLEAR ácida (**B**) e *acanto* (23-48)-CLEAR ácida (**C**).

4.2.3. Tentativa de síntese manual do fragmento N-terminal *acanto* (1-22)

Esta síntese também foi realizada usando a abordagem convencional a temperatura ambiente usando a estratégia Fmoc e DMF como sistema de solvente. Todos os acoplamentos empregaram DIC e HOBt (1:1) como reagentes acopladores. O acoplamento do terceiro resíduo à resina foi realizado com BOP:HOBt (1:1) para evitar a reação de formação de DCP (GAIRI et al., 1990). Uma vez que os acoplamentos da Arg¹⁵, Gly¹⁴, e Gly¹³ à cadeia peptídica em crescimento não foram completos, requerendo dois reacoplamentos, o solvente foi trocado para 20% DMSO/NMP. A síntese foi interrompida após tentativa de obtenção do fragmento *acanto* [10-22].

A peptidil-resina foi seca sob vácuo e pesada. O ganho de massa foi de 0,56 g. Uma amostra de 450 mg foi retirada para alongamento da cadeia peptídica e o restante foi estocado. Nos acoplamentos dos aminoácidos seguintes foi utilizado 0,8M LiCl/NMP. Os acoplamentos do Gly⁹, Gly⁸ e Gly⁷ à cadeia peptídica em crescimento foram difíceis de serem completados. A partir de então, a remoção do Fmoc também foi difícil requerendo o uso de 50% piperidina/DMF, 3% DBU/DMF e 50% DBU/DCM, que não resolveram o problema (STEWART; YOUNG, 1984). A síntese foi, portanto, interrompida neste ponto.

As análises por RP-HPLC (**Figura 54A**) e LC/ESI-MS (**Figura 55**) do produto resultante da clivagem e desproteção total de acanto (10-22)-CLEAR ácida [Fmoc-R¹⁵(Pmc)Y(But)GGGR(Pmc)Y(But)GGGGY²²(But)-CLEAR ácida] mostraram que: i) o componente majoritário 1 correspondia ao peptídeo desejado R¹⁰YGGGRYGGGGY²²-OH (**Figuras 54A e 55F**); ii) o componente 2 correspondia a

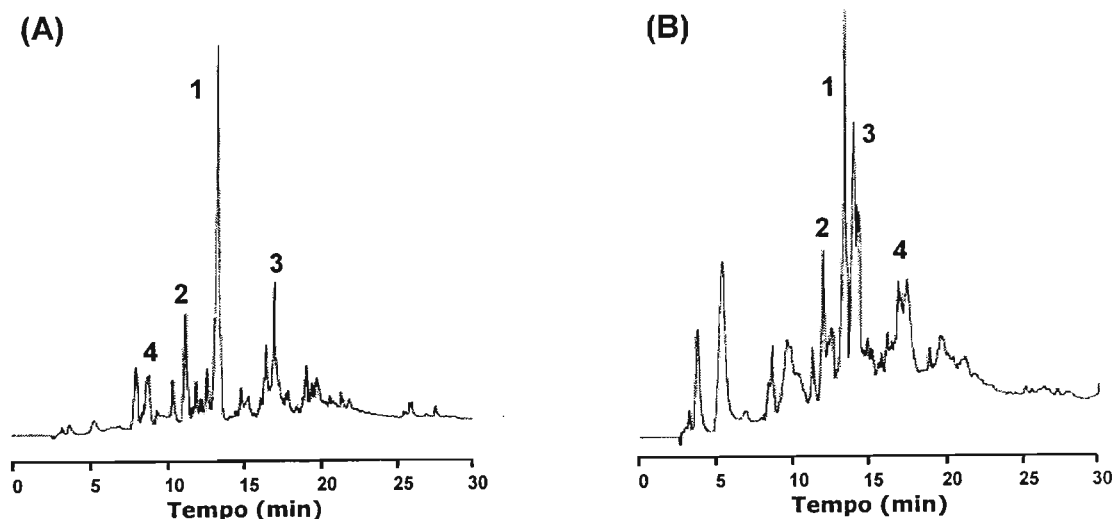


Figura 54: Análise por RP-HPLC do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total da peptidil-resina *acanto* (10-22)-CLEAR ácida (A) e *acanto* (7-22)-CLEAR ácida (B). Condições: Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm.

Cromatografia líquida (LC)

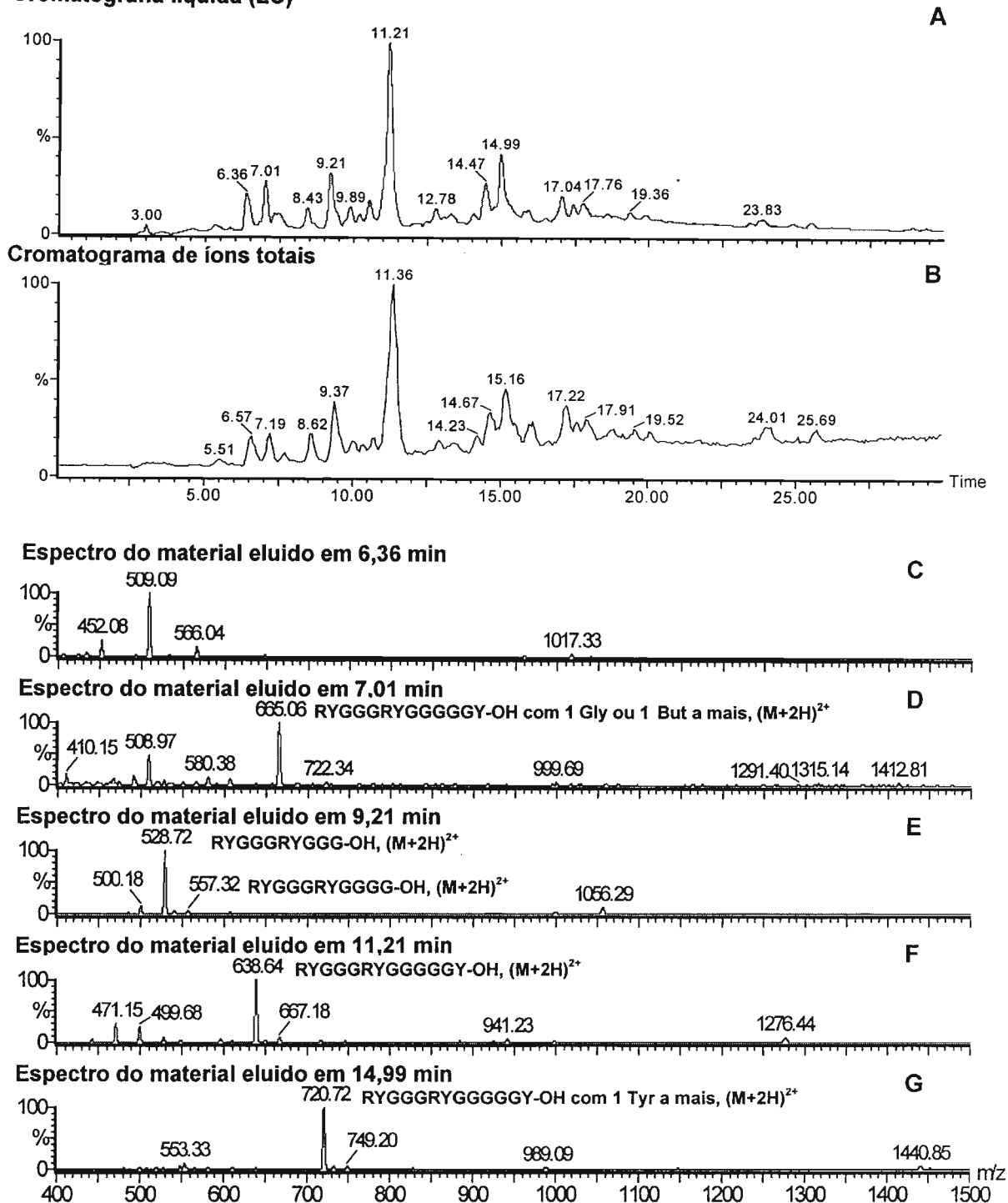
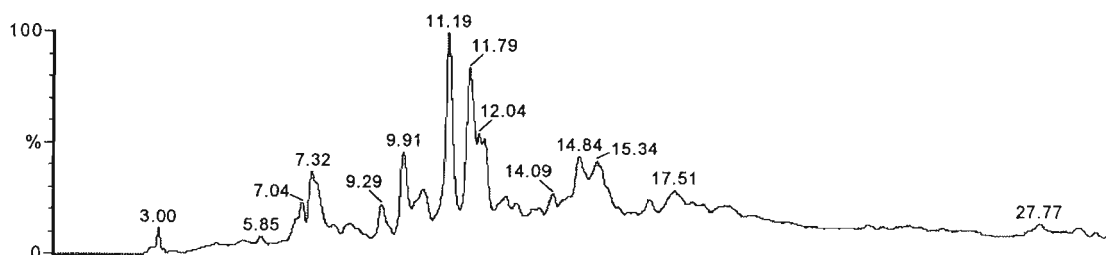
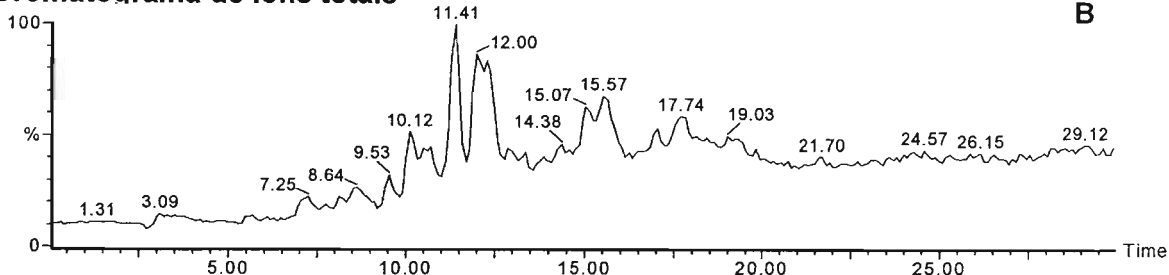
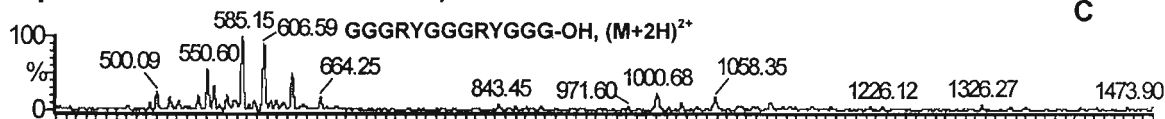
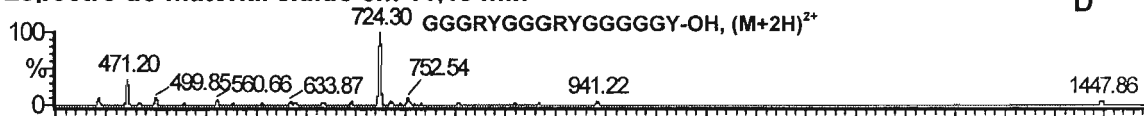
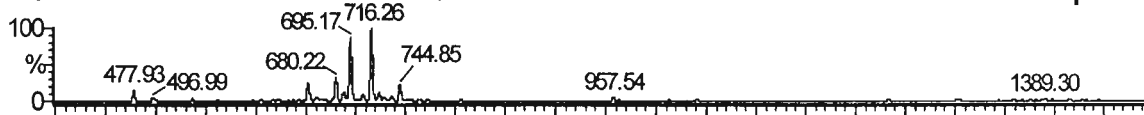
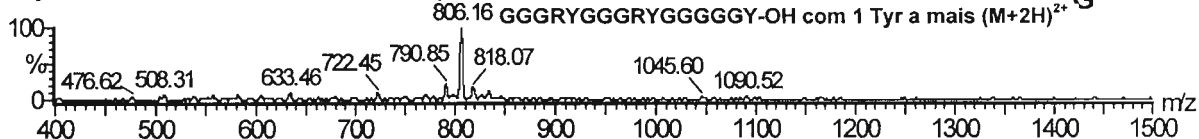


Figura 55: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de *acanto (10-22)-CLEAR* ácida. Condições da LC: Injeção: 5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/água contendo 0,09% de TFA, gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; Condições da ESI-MS: Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

Cromatografia líquida (LC)**A****Cromatograma de íons totais****B****Espectro do material eluído em 10,44 min****C****Espectro do material eluído em 11,19 min****D****Espectro do material eluído em 11,79 min****E****Espectro do material eluído em 12,04 min****F****Espectro do material eluído em 14,84 min****G****Figura 56: Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da****resina e desproteção total de acanto (7-22)-CLEAR ácida. Condições da LC: Injeção:**5 μ L, Solvente A: 0,1% TFA/água, solvente B: 60% ACN/ água contendo 0,09% de TFA,gradiente linear: 5-95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min, λ : 210 nm; **Condições do ESI-MS:**

Capilar: 3kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES+.

um análogo deletado nos dois e três resíduos de aminoácidos C-terminais ($R^{10}YGGGRYGGGG^{20}$ e $R^{10}YGGGRYGGG^{19}$, respectivamente) provavelmente resultantes da formação de DCP (**Figuras 54A e 55E**); iii) os componentes 3 e 4 correspondiam aos análogos do peptídeo desejado com uma Tyr e uma Gly adicionais, respectivamente. A síntese pôde ser considerada satisfatória.

As análises por RP-HPLC (**Figura 54B**) e LC/ESI-MS (**Figura 56**) indicaram que a qualidade do peptídeo bruto piorou significativamente quando tentamos acoplar mais três aminoácidos à Fmoc- R^{10} (Pmc)Y(But)GGGR(Pmc)Y(But)GGGGY²²(But)-CLEAR ácida. Foi possível identificar um componente 1 que correspondia ao peptídeo $G^7GGRYGGGRYGGGGY^{22}$ de 16 resíduos (**Figuras 54B e 56D**), o componente 2 que correspondia a um análogo do peptídeo desejado deletado nos dois resíduos de aminoácidos C-terminais ($G^7GGRYGGGRYGGGG^{20}$) provavelmente resultantes da formação de dicetopiperazina, o componente 3 correspondia ao peptídeo desejado contendo uma Gly adicional ($G^6GGGRYGGGRYGGGGY^{22}$, **Figuras 54B e 56E**) e o componente 4 correspondia a um análogo do peptídeo desejado contendo uma Tyr adicional (**Figuras 54B e 56G**). Alguns compostos que não puderam ser identificados correspondem à massa do peptídeo desejado diminuída em 16 e 32 unidades [$716,26 (M+2H)^{2+}$ e $708,75 (M+2H)^{2+}$].

A **Figura 57** mostra os espectros Raman das peptidil-resinas obtidas durante as tentativas de síntese do fragmento N-terminal da acantoscurreína *acanto (1-22)*-CLEAR ácida. O espectro da *acanto (10-22)*-CLEAR ácida [Fmoc- R^{15} (Pmc)Y(But)GGGR(Pmc)Y(But)GGGGY²²(But)-CLEAR ácida] apresenta uma banda de 1675 cm^{-1} que sugere a ocorrência de agregação intercadeias durante a síntese por formação de folha β pregueadas (**Figura 57B**, COLTHUP et al., 1990), o que explicaria os acoplamentos e desproteções parciais difíceis e incompletos. Já o espectro da *acanto (7-22)*-CLEAR ácida [Fmoc- G^7 GGR(Pmc)Y(But)GGGR(Pmc)Y(But)GGGGY²²(But)-CLEAR ácida] apresenta a mesma banda de 1675 cm^{-1} e duas bandas menos intensas de 1643 e 1655 cm^{-1} : a primeira característica de uma

estrutura em hélice e a segunda de estruturação em hélice 3_1 ou dobra β conhecida por ser uma estrutura intermediária entre α -hélice e folha β (CRICK; RICH, 1955).

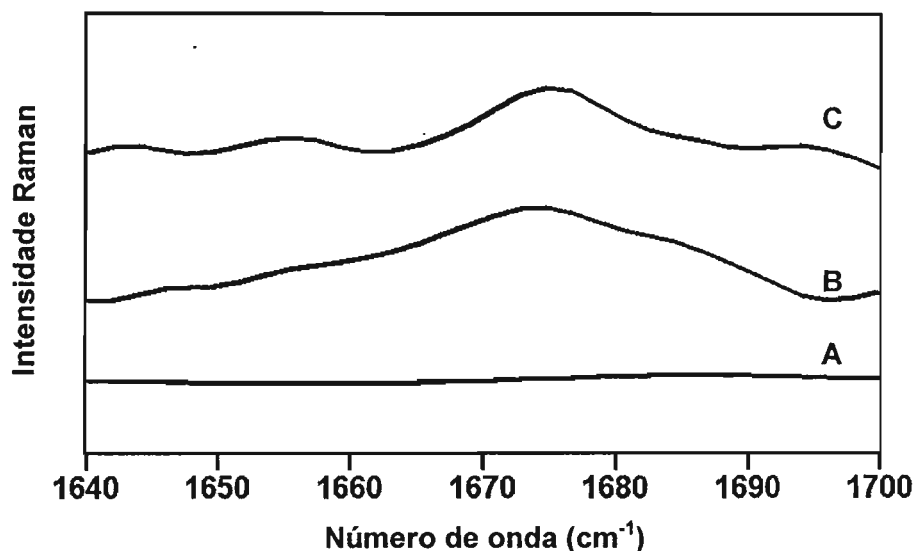


Figura 57: Espectros de NIR-FT-Raman na região amida I (1640-1700 cm^{-1}) da resina CLEAR ácida (A) e das peptidil-resinas *acanto* (10-22)-CLEAR ácida (B) e *acanto* (7-22)-CLEAR ácida (C).

Em conjunto, estes resultados explicam a dificuldade na síntese deste peptídeo, que parece ser uma sequência agregante (MILTON et al., 1991).

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1. Cheferina

Como já descrito, a cheferina I (*Chef I*) é um peptídeo isolado das raízes da planta “bolsa de pastor” (Família *Brassicaceae*) que apresenta atividade “*in vitro*” frente a bactérias Gram negativas, leveduras e fungos miceliais. Apesar da sua boa atividade antimicrobiana, não existe nenhum resultado que indique que ela seja parte do sistema imune inato da planta. A sua seqüência de aminoácidos se assemelha àquelas de muitas GRPs de plantas, sugerindo que sua função esteja associada a vários tipos de estresse.

A análise comparativa da seqüência do polipeptídeo imaturo *Shep-GRP* confirmaram as nossas suspeitas ao indicar que, segundo o peptídeo sinal, ele faz parte de uma família de proteínas (pfam07172) formada por GRPs, duas nodulinas (16 e 24) e algumas proteínas que são expressas em resposta a vários tipos de estresse como as GRPs do tomate. Portanto, a cheferina I pode ter as mesmas localizações e funções celulares.

Uma outra análise realizada usando o software PSI-BLAST fortalece a sugestão acima, pois ela mostrou que o *Shep-GRP* apresenta alto grau de identidade com várias GRPs de *Arabidopsis thaliana*, tal como a proteína codificada pelo gene de tolerância ao aumento de concentração salina e ao ácido abscísico *AtGRP9* (gi |30678191|), expresso no tecido vascular da raiz de *A. thaliana* e envolvido na síntese de lignina em resposta ao estresse salino.

A sugestão acima, a atividade antimicrobiana, a estrutura primária da *Chef I* (i) composta apenas de Gly, His e uma única Tyr, (ii) contendo as 6 repetições do tripeptídeo GGH conhecido por seu poder quelante de íons Cu^{2+} (WENRONG et al., 2001) nos estimularam a estudar a cheferina I. Para o estudo da sua relação estrutura-atividade antimicrobiana, a seqüência foi dividida em: dipeptídeo N-terminal (Gly¹-Tyr²), octapeptídeo C-terminal (Gly²¹-Gly²⁸) e porção repetitiva de GGH (Gly³-His²⁰). Sintetizamos, purificamos e caracterizamos quimicamente a *Chef I*, os fragmentos truncados e análogos mostrados no **Esquema 5**.

A existência de poucos relatos da síntese de seqüências ricas em Gly por SPFS não facilitaram o nosso trabalho. Entretanto, fomos bem sucedidos nas sínteses da *Chef I* e do fragmento truncado *Chef I (3-28)* a 60°C usando a resina CLEAR ácida e a estratégia Fmoc/But. Os outros análogos truncados puderam ser sintetizados a 60°C usando a resina PAM e a estratégia Boc/Bzl. As sínteses dos análogos amidados a 60°C usando a resina CLEAR amida comprovaram a adequação das mesmas a este tipo de seqüência peptídica, que apresentou tendência à agregação.

As purificações foram bem sucedidas, fornecendo rendimentos aceitáveis se considerado que a maioria dos perfis de RP-HPLC dos brutos indicou a presença simultânea do peptídeo desejado e contaminantes formados devido à tendência à agregação das cadeias peptídicas em crescimento, a qual foi minimizada pelo uso das resinas CLEAR. A caracterização por LC/ESI-MS e análise de aminoácidos comprovou a identidade dos peptídeos purificados e forneceu os seus graus de pureza e conteúdos peptídicos.

São inéditos os dados de atividade antimicrobiana obtidos com a *Chef I* e seus análogos truncados (**Tabela 7**) revelando que o dipeptídeo N-terminal (Gly¹-Tyr²) não é tão essencial para a atividade quanto o octapeptídeo C-terminal. Já aquele referente à perda das duas extremidades [*Chef I (3-20)*], que causa redução drástica da atividade, contraria o relato de Park e colaboradores (PARK et al., 2000), que prevê atividade total para a porção central formada pelas seis repetições GGH.

Por outro lado, os dados obtidos com a *Chef Ia* e seus análogos truncados corroboram dados da literatura de que a amidação da carboxila terminal de um AMP pode (i) aumentar a sua capacidade de permeabilização celular devido à perda de uma carga negativa; (ii) à estabilidade frente à digestão por carboxipeptidases; (iii) levar a um aumento da atividade provavelmente devido à estabilização conformacional. De fato, apesar de também não ter sido ativo contra as cepas de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos miceliais, o análogo *Chef Ia* se mostrou igualmente ativo à *Chef I* frente a *Candida* e 2 vezes mais ativo que *Chef I* frente a *S. cerevisiae*. Ele também apresentou a mesma

atividade que *Chef I* frente às cepas de *Candida* utilizadas (incluindo uma resistente a fluconazol e excluindo *C. albicans* ATCC 90028) e maior resistência à força iônica do meio.

Provavelmente pelos efeitos da amidação citados, os análogos truncados *Chef I* (3-28a) e *Chef I* (6-28a) exibiram atividades idêntica e próxima, respectivamente, frente a *C. albicans* sensível a antibiótico não peptídico, mas não frente a *C. albicans* resistente a ele. Assim, estamos propondo que *Chef I* (3-28a) seja um mimético de *Chef I* e que *Chef I* (6-28a) seja a porção mínima ativa da *Chef Ia* frente a *C. albicans* MDM8 e a cepa resistente a fluconazol.

Com base em todos os dados obtidos neste estudo pioneiro da relação estrutura-atividade de um AMP rico em Gly, examinamos as propriedades da *Chef Ia*. Se por um lado, a redução da atividade anti-*Candida* de *Chef Ia* em função do aumento da força iônica não causa surpresa, pois o mesmo ocorre com a maioria dos AMPs, por outro, o aumento dessa atividade por coordenação com Zn^{2+} (5-10 μM de $ZnCl_2$) também não o faz [o mesmo ocorre com outros peptídeos ricos em His]. A baixa atividade hemolítica (18% hemólise em 100 μM de peptídeo) mesmo em tampão glicose-fosfato isotônico (comumente usado para avaliar a verdadeira toxicidade dos peptídeos antimicrobianos sensíveis ao aumento da força iônica) e a rápida ação candidacida (30 min a 62,5 μM) evidencia o potencial de *Chef Ia* para uso terapêutico.

O conhecimento do mecanismo de ação dos AMPs é de grande importância para o desenho de análogos mais potentes, menos tóxicos, quimicamente mais estáveis e mais seletivos. Este trabalho mostra que, em tempo prolongado de incubação e em altas concentrações, a *Chef Ia* permeabiliza a membrana de *C. albicans* MDM8 a 31,2 μM (2,5 MIC). Os dados obtidos não nos permite especular se este processo é responsável pela expressão de sua ação antimicrobiana (como o caso da melitina, magainina, cecropina, PMAP-23, indolicidina) ou se ele é um primeiro passo como parte do mecanismo de ação da *Chef I* (como é o caso da tenecina-3, buforina II ou histatina-5). Sintetizamos, purificamos, caracterizamos e testamos o análogo fluorescente FAM-*Chef Ia*, análogo que

se mostrou mais ativo que a *Chef Ia* (4 vezes) e translocou a membrana celular de *C. albicans* MDM8 para se dirigir a um alvo intracelular que ainda desconhecemos, mas que exclui a mitocôndria. A internalização do FAM-*Chef Ia* é dependente de energia celular e temperatura, não sendo afetado pela concentração salina do meio. Como tais características são consistentes com processos endocíticos já descritos e a *Chef Ia* também apresenta alto conteúdo de His, sugerimos que a *Chef Ia* possa ser internalizada na célula de levedura.

5.2. Acantoscurreina

Como já descrito, a acantoscurreina é uma GRP de 132 aminoácidos com ação antimicrobiana e, portanto, um modelo de estudo bem mais complexo que *Chef I*. O presente trabalho é uma contribuição ao estudo da SPFS de seqüências ricas em Gly, pois os fragmentos estudados desta pequena proteína tem esta característica.

Apesar de uma análise teórica inicial não ter indicado tendência da acantoscurreina à agregação via estruturação em folhas β pregueadas, o trabalho experimental revelou que as SPFS das regiões N-terminal, central e C-terminal são problemáticos. De fato, a tentativa de sintetizar o fragmento C-terminal *acanto* (101-132), por exemplo, na resina MBHA usando a estratégia Boc/Bzl somente nos permitiu chegar somente ao fragmento *acanto* (125-132), mesmo a 60°C com o emprego de diferentes: (i) reagentes reacopladores (TBTU, BOP); (ii) sais caotrópicos (NaClO₄ e LiCl em 20% DMSO/NMP); (iii) solventes (DMSO puro, DMF, 50% TFE/DCM, a mistura mágica e 10% HFIP/DCM), todos conhecidos por minimizar a formação de ligações de hidrogênio intercadeias em crescimento que reconhecidamente causam a formação das folhas β pregueadas e agregação na SPFS. O uso da resina CLEAR amida para a síntese do fragmento *acanto* (101-132) minimizou significativamente o fenômeno, pois permitiu a obtenção do fragmento *acanto* (113-132). A SCPFS não se mostrou alternativa eficaz e corroborou dados da literatura, pois apesar de as SPFS passo a passo dos fragmentos *acanto* (121-132)-CLEAR amida, *acanto* (111-120)-HMPB-CLEAR amida e *acanto* (101-110)-HMPB-CLEAR amida terem sido bem sucedidos, nem sempre foi possível desligar os fragmentos da resina na forma protegida (provavelmente devido à

estruturação das cadeias peptídicas em folhas β pregueadas). Somente o uso combinado da resina CLEAR, do aminoácido Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH e do sal caotrópico LiCl (os dois últimos usados alternadamente) permitiram a síntese do peptídeo *acanto* (101-132).

Uma vez que tal condição experimental inclui o emprego de alta temperatura (60°C), o presente estudo corrobora os dados anteriores da literatura e do nosso próprio grupo de pesquisa, um dos pioneiros na investigação da possibilidade e das limitações de realizar todas as etapas de SPFS a 50-85°C (usando aquecimento convencional e microondas).

A utilização de NIR-FT Raman para comprovar as sugestões de ocorrência de agregação durante a SPFS de seqüências ricas em Gly é inédita. Também o é a comprovação de que, pelo menos enquanto protegida em suas cadeias laterais e ligado à resina, a seqüência rica em Gly correspondente à porção C-terminal da acantoscurreina apresenta elevadíssima tendência de se estruturar em folhas β -pregueadas. O presente estudo, portanto, colocou tal fragmento na lista das “difficult sequences”, seqüências peptídicas de enorme interesse na pesquisa em SPFS.

6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados nos permitem concluir que:

- 1) A atividade antimicrobiana pode não ser a função primordial da *Chef I* na planta: ela pode exercer função associada à síntese de lignina induzida por estresse salino.
- 2) Sob o ponto de vista sintético, a *Chef I* pode ser considerada uma “difficult sequence”.
- 3) A *Chef I* sintética não apresentou atividade antibacteriana, somente atividade antifúngica frente a *Candida albicans* MDM8, *C. albicans* HU168 resistente a fluconazol, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Ela também não apresentou atividade frente à *C. albicans* ATCC 90028 sensível a fluconazol.
- 4) O estudo da relação estrutura-atividade da *Chef I* evidenciou que a deleção da extremidade N-terminal afeta a atividade antifúngica da *Chef I* em menor grau do que a deleção da extremidade C-terminal. A deleção de ambas as extremidades leva à perda da atividade.
- 5) A amidação da carboxila terminal da *Chef I* (*Chef Ia*) não levou alteração da atividade antifúngica, porém, ela tornou a *Chef I* menos sensível à variação da força iônica do meio. Graças à amidação, os fragmentos truncados na extremidade N-terminal, *Chef I* (3-28)*a* e *Chef I* (6-28)*a* se tornaram quase ou tão ativos quanto *Chef I* e *Chef Ia* frente à *Cândida* (incluindo uma resistente à fluconazol). Assim, *Chef I* (6-28)*a* poderia ser considerada como a porção mínima ativa da *Chef Ia*.
- 6) Em geral, as atividades antifúngicas dos peptídeos estudados foram afetadas pela força iônica do meio; tal efeito parece ser dependente do tamanho, mas os análogos amidados foram mais resistentes.
- 7) A atividade antifúngica da *Chef I* foi incrementada pela presença de $ZnCl_2$, sugerindo que o Zn^{2+} coordena com as cadeias laterais das histidinas estabilizando a conformação ativa do peptídeo. Na presença do íon, *Chef Ia* e *Chef I* (3-28)*a* foram mais e tão ativo quanto *Chef I*, respectivamente, frente à cepa de *C. albicans* ATCC 90028 sensível a fluconazol.
- 8) *Chef Ia* mostrou baixíssima ou nenhuma toxicidade frente a eritrócitos em meios baixa e alta força iônica (no MIC ela não apresenta toxicidade).

- 9) A 62,5 μM *Chef Ia* tem atividade fungicida rápida, sendo capaz de matar células de *C. albicans* em 30 min.
- 10) *Chef Ia* permeabiliza as células de *C. albicans* MDM8 como parte de seu mecanismo de ação.
- 11) O análogo FAM-*Chef Ia*, *Chef Ia* marcado com carboxifluoresceína, foi mais 4 vezes mais ativo que *Chef Ia* frente a *C. albicans* MDM8, evidenciando que a hidrofobicidade do marcador alterou as propriedades do peptídeo.
- 12) FAM-*Chef Ia* é internalizado na célula de *C. albicans* como parte de seu mecanismo de ação, dirigindo-se a um alvo interno que não é a mitocôndria.
- 13) A internalização não foi afetada pelo aumento da concentração salina e é dependente de temperatura e energia celular sugerindo que ela deva ocorrer via endocitose.
- 14) Sob o ponto de vista da SPFS, o fragmento C-terminal *acanto* (101-132) é uma "difficult sequence" típica.
- 15) A mudança de estratégia sintética, o uso de temperatura alta (60°C), diversos reagentes acopladores, solventes, sais caotrópicos e da resina CLEAR, não contornaram os problemas das aminoacilações incompletas (agregação).
- 16) A abordagem de síntese convergente de peptídeos (SCPFS) não se mostrou eficaz para a síntese do *acanto* (101-132) também por impedimentos decorrentes de agregação.
- 17) Somente o uso combinado da resina CLEAR, do aminoácido Fmoc-(Fmoc-Hmb)Gly-OH e do sal caotrópico LiCl na síntese passo a passo permitiram a obtenção do fragmento *acanto* (101-132).
- 18) Os fragmentos N-terminal *acanto* (1-22) e a porção repetitiva *acanto* (23-48) também demonstraram ter tendência à agregação.
- 19) A espectroscopia NIR-FT-Raman se mostrou uma ferramenta crucial para o monitoramento da SPFS de seqüências ricas em Gly e, portanto, para o sucesso de muitas das sínteses estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Vet. Microbiol.*, 2004, vol. 100, p. 838-839.
- AKIYAMA, N; NATORI, S. Involvement of H_2O_2 and O_2^- in the cytotoxicity of N-beta-alanyl-5-s-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine (5-s-GAD), a novel insect-derived antitumor compound. *Cancer Sci.*, 2003, vol. 94, p. 400-404.
- AKSOY, A., DIXON, J.M., HALE, W.H.G. Biological Flora of the British Isles: *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medikus. *J. Ecol.*, 1998, vol. 86, p. 171-186.
- ALBERICIO, F; LLOYD-WILLIAMS, P.E.; GIRALT, E. Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis. *Methods Enzymol.*, 1997, vol. 289, p. 313-336.
- ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, vol. 8, p. 211-221.
- ALEWOOD, P.; ALEWOOD, D.; MIRANDA, L.; LOVE, S.; MEUTERMANS, W.; WILSON, D. Rapid in situ neutralization protocols for Boc and Fmoc solid-phase chemistries, *Methods Enzymol.* 1997, vol. 289, p. 14-29.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, p. 403-410.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, p. 3389-3402.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, p. 415-433.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. Solid phase peptide synthesis: A practical approach. Oxford: IRL press, 1989, 216p.
- ATKINS, P.; JONES, L. Chemical principles: The Quest for insight. 3ª edição, W.H. Freeman and Company, NY, USA, 2005, 738p.
- AXEN, A.; CARLSSON, A.; ENGSTROM, A.; BENNICH, H. Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae. *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 247, p. 614-619.
- BACSA, B.; HORVATI, K.; BOSZE, S.; ANDREAE, F.; KAPPE, C.O.; Solid-Phase Synthesis of difficult peptide sequences at elevated temperatures: A critical comparison of microwave and conventional heating technologies, *J. Org. Chem.*, 2008, vol. 73, p. 7532-7542.
- BAEV, D.; RIVETTA, A.; VYLKOVA, S.; SUN, J.N.; ZENG, G.F.; SLAYMAN, C.L.; EDGERTON, M. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, histatin 5. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, p. 55060-55072.
- BAGLEY, C.J.; OTTESON, K.M.; MAY, B.L.; MCCURDY, S.N.; PIERCE, L.; BALLARD, F.J.; WALLACE, J.C. Synthesis of insulin-like growth factor using n-methyl pyrrolidinone as the coupling solvent and trifluoromethane sulfonic-acid cleavage from the resin, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, vol. 36, p. 356-361.
- BARANY, G.; MERRIFIELD, R.B. Solid-phase peptide synthesis. Em: The Peptides, vol 2, Gross, e.; Meienhofer, J.; Eds., Academic Press, New York, USA. 1979, p. 1-284.
- BARLOS, K.; GATOS, D.; KAPOLOS, S.; PAPAPHOTIOU, G.; SCHÄFER, W.; WENQUING, Y.; Esterification of partially protected peptide fragments with resins – Utilization of 2-

- chlorotriyl chloride for synthesis of Leu-15 gastrin-I. *Tetrahedron Lett.*, 1989, vol. 30, p. 3947-3950.
- BARLOS, K.; CHATZL, O.; GALOS, D.; STAVROPOULOS, G.; 2-Chlorotriyl chloride resin – studies on anchoring of Fmoc-amino acids and peptide cleavage. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1991, vol. 37, p. 513-520.
- BARTL, R.; KLÖPPEL, K-D.; FRANK, R.; Towards elimination of segment insolubility during SPPS. Em: Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium, June 16-21, 1991, Cambridge, Massachusetts, USA. John A. Smith e Jean E. Rivier, Eds., ESCOM, 1992, p. 505-506.
- BAYER, E.; HEMMASI, B.; ALBERT, K.; RAPP, W.; DENGLER, M. Immobilized poly(oxyethylene), a new support for peptide synthesis. Em: Peptides: Structure and Functions, Proceedings of the 8th American Peptide Symposium, Hruby, Victor J.; Rich, Daniel H., Eds. 1983, p. 87-90.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, vol. 1758, p. 1529-1539.
- BECHINGER, B. Towards Membrane Protein Design: pH-sensitive Topology of Histidine-containing Polypeptides. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 263, p. 768-775.
- BECKER, H.; LUCAS, H.W.; MAUL, J.; PILLAI, V.N.R.; ANZINGER, H.; MUTTER, M. Poly (ethylene glycols) grafted onto crosslinked polystyrenes: a new class of hydrophilic polymeric supports for peptide synthesis. *Makromolekulare Chemie, Rapid Commun.*, 1982, vol. 3, p. 217-23.
- BECKWITT, R.; ARCIDIACONO, S. Sequence conservation in the C-terminal region of spider silk proteins (spidroin) from *Nephila clavipes* (Tetragnathidae) and *Araneus bicentenarius* (Araneidae). *J Biol Chem.*, 1994, vol. 269, p. 6661-6663.
- BEDFORD, J.; HYDE, C.; JOHNSON, T.; JUN, W.; OWEN, D.; QUIBELL, M.; SHEPPARD, R.C. Amino acid structure and “difficult sequences” in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1992, vol. 40, p. 300-307.
- BENINCASA, M.; SCOCCHI, M.; PACOR, S.; TOSSI, A.; NOBILI, D.; BASAGLIA, G.; BUSETTI, M.; GENNARO, R. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, vol. 58, p. 950-959.
- BENOITON, N. L.; Chemistry of Peptide Synthesis.; CRC, 2005, 304p.
- BENZ, H. The role of Solid-phase fragment condensation (SPFC) in peptide synthesis. *Synthesis*, 1994, vol. 4, p. 337-358.
- BERGERON, D.; BOIVIN, R.; BASZCZYNSKI, C.L.; BELLEMARE, G. Root-specific expression of a glycine-rich protein gene in *Brassica napus*. *Plant Sci.*, 1994, vol. 96, p. 87-98.
- BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Synthesis of difficult peptide sequences: a comparison of Fmoc- and Boc-technique. *Tetrahedron Lett.*, 1992, vol. 33, p. 3745-3748.
- BLAAKMEER, J.; TIJSSE-KLASSEN, T.; TESSER, G.I. Enhancement of solubility by temporary dimethoxybenzyl-substitution of peptide bonds. Towards the synthesis of defined oligomers of alanine and of lysyl-glutamyl-glycine. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, vol. 37, p. 556-564.
- BODANSZKY, M.; DESHMANE, S.S.; MARTINEZ, J. Side reactions in peptide synthesis. 11. Possible removal of the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl group by the amino components during coupling, *J. Org. Chem.*, 1979, vol. 44, p. 1622-1625.

- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STOCKLER, W. Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.*, 1993, vol. 331, p. 134-140.
- BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*, 1991, vol. 65, p. 205-207.
- BORGIA, J.A.; FIELDS, G.B. Chemical synthesis of proteins. *TIBTECH*, 2000, vol. 18, p. 243-251.
- BOSCH F.; ROSICH L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, 2008, vol. 82, p. 171-179.
- BRADY, K.P.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Activation of a tobacco glycine-rich protein gene by a fungal glucan preparation. *Plant. J.*, 1993, vol. 4, p. 517-524.
- BRAY, B.L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, vol. 2, p. 587-593.
- BRENNER, R.; ELLIS-GROSSE, E. J. The pharma company view. *Nat. Biotech.*, 2006, vol. 24, p. 1515-1519.
- BROEKAERT, W.F.; MARIEN, W.; TERRAS, F.R.; DE BOLLE, M.F.; PROOST P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, p. 4308-4314.
- BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; DE BOLLE, M.F.C.; THEVISSSEN, K.; DE SAMBLANX, G.W.; OSBORN, R.W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1997, vol. 16, p. 297-323.
- BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.M., TACK, P.B.; BRIAN, F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003, vol. 22, p. 465-478.
- BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Micro.*, 2005, vol. 3, p. 238-250.
- 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. 14893-14897.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.*, 1999, vol. 23, p. 329-344.
- BURLINA, F.; SAGAN, S.; BOLBACH, G.; CHASSAING, G. Quantification of the Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, vol. 44, p. 4244-4247.
- BYLER, D. M.; SUSI, H. Application of computerized infrared and Raman spectroscopy to conformation studies of casein and other food proteins. *J. Ind. Microbiol.*, 1988, vol. 3, p. 73-88.
- CANTON, E.; PEMAN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, vol. 48, p. 2477-2482.
- CARPENTER, C.D.; KREPS, J.A.; SIMON, A.E. Genes encoding glycine-rich Arabidopsis thaliana proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant. Physiol.*, 1994, vol. 104, p. 1015-1025.

- CASTEELS, P.; AMPE, C.; JACOBS, F.; VAECK, M.; TEMPST, P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, p. 2387-2391.
- CASTRO, B.; DORMOY, J.R.; EVIN, G.; SELVE, C. Peptide coupling reagents. IV. N-[Oxytris(dimethylamino)phosphonium]benzotriazole hexafluorophosphate]. *Tetrahedron Lett.*, 1975, vol. 14, p. 1219-1222.
- 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. 1184-1202.
- CHEN, H.C.; BROWN, J.H.; MORELL, J.L.; HUANG, C.M. Synthetic magainin analogs with improved antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 1988, vol. 236, p. 462-466.
- CHEN, A.P.; ZHONG, N.Q.; QU, Z.L.; WANG, F.; LIU, N.; XIA, G.X. Root and vascular tissue-specific expression of glycine-rich protein AtGRP9 and its interaction with AtCAD5, a cinnamyl alcohol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.*, 2007, vol. 120, p. 337-343.
- CHO, J.H.; HOMMA, K.J.; KANEGASAKI, S.; NATORI, S. Activation of human monocyte cell line U937 via cell surface calreticulin, *Cell stress chap.*, 2001, vol. 6, p. 148-152.
- CHOON KOO, J.; LEE, S.Y.; CHUN, H.J.; CHEONG, Y.H.; CHOI, J.S.; KAWABATA, S.; MIYAGI, M.; TSUNASAWA, S.; HA, K.S.; BAE, D.W.; HAN, C.D.; LEE, B.L.; CHO, M.J. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1382, p. 80-90.
- CILLI, E.M.; OLIVEIRA, E.; MARCHETTO, R.; NAKAIE, C.R. Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties *J. Org. Chem.*, 1996, vol. 61, p. 8992-9000.
- CILLI, E.M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C.R. Correlation between the Mobility of Spin-Labeled Peptide Chains and Resin Solvation: An Approach To Optimize the Synthesis of Aggregating Sequences, *J. Org. Chem.*, 1999, vol. 64, p. 9118-9123.
- CLIPPINGDALE, A.B.; MACRIS, M.; WADE, J.D.; BARROW, C.J. Synthesis and secondary structural studies of penta(acetyl-Hmb)A β (1-40). *J. Peptide Res.*, 1999, vol. 53, p. 665-672.
- COLTHUP, N.B.; DALY, H.L.; WIBERLEY, S.E. Introduction to infrared and Raman spectroscopy. 3ra ed. Academic Press, Boston, USA, 1990, 547p.
- CONDIT, C.; MEAGUER, R.B. A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature*, 1986, vol. 323, p. 178-181.
- CONDIT, C. M.; Developmental expression and localization of petunia glycine-rich protein 1, *Plant Cell.*, 1993, vol. 5, p. 277-288.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Micro.*, 2005, vol. 3, p. 777-788.
- CRICK, F.H.C.; RICH, A. Structure of polyglycine II. *Nature*, 1955, vol. 176, p. 780-781.
- DASHPER, S.G.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; CROSS, K.J.; PAOLINI, R.A.; HOFFMANN, B.; CATMULL, D.V.; MALKOSKI, M.; REYNOLDS, E.C. Divalent Metal Cations Increase the Activity of the Antimicrobial Peptide Kappacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, p. 2322-2328.
- DEMONTY, J. From penicillin to the proliferation of β -lactams. A fifty-year history. *Rev Med Liege*, 1996, vol. 51, p. 47-49.
- DE OLIVEIRA, D.E.; FRANCO, L.O.; SIMOENS, C.; SEURINCK, J.; COPPIETERS, J.; BOTTERMAN, J.; VAN, MONTAGU, M. Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis*

- thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.*, 1993, vol. 3, p. 495-507.
- DESHAYES, S.; GERBAL-CHALOIN, S.; MORRIS, M.C.; ALDRIAN-HERRADA, G.; CHARNET, P.; DIVITA, G.; HEITZ, F. On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, 2004, vol. 1667, p. 141-147.
- DHALLUIN, C.; BOUTILLON, C.; TARTAR, A.; LIPPENS, G. Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, p. 10494-10500.
- DIAZ, G.; POLONELLI, L.; CONTI, S.; MESSANA, I.; CABRAS, T.; PUTZOLU, M.; FALCHI, A.M.; FADDA, M.E.; COSENTINO, S.; ISOLA, R. Mitochondrial alterations and autofluorescent conversion of *Candida albicans* induced by histatins. *Microsc. Res. Tech.*, 2005, vol. 66, p. 219-228.
- DREWES, J.A.; ROWLEN, K.L. Evidence for a gamma-turn motif in antifreeze glycopeptides. *Biophys. J.*, 1993, vol. 65, p. 985-991
- DUBIN, A.; MAK, P.; DUBIN, G.; RZYCHON, M.; STEC-NIEMCZYK, J.; WLADYKA, B.; MAZIARKA, K.; CHMIEL, D. New generation of peptide antibiotics. *Acta Biochim. Pol.*, 2005, vol. 52, p. 633-638.
- DUCKWORTH, D.H. Who discovered bacteriophage? *Bacteriol. Rev.*, 1976, vol. 40, p. 793-802.
- DUVICK, J.P.; ROOD, T.; RAO, A.G.; MARSHAK, D.R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, p. 18814-18820.
- ECKERT, H.; KIESEL, Y.; SEIDEL, C.; KAULBERG, C.; BRINKMANN, H. New strategy for peptide synthesis using highly lipophilic and chromophoric groups. Synthesis of octapeptide sequence [24 - 31] H-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH of human β -endorphin. *Chem. Peptide Prot.*, 1986, vol. 3, p. 19-28.
- EGOROV, T.A.; ODINTSOVA, T.I.; PUKHALSKY, V.A., GRISHIN, E.V. Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*, 2005, vol. 26, p. 2064-2073.
- EL RAHMAN, S. A.; ANZINGER, H.; MUTTER, M. Relationship between conformation and physicochemical properties of polypeptides. I. Synthesis of homo- and co-oligopeptides by the liquid-phase method. *Biopolymers*, 1980, vol. 19, p. 173-187.
- EPAND, R.M.; VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, vol. 1462, 11-28.
- FARKAS-HIMSLEY, H. Bacteriocins - are they broad-spectrum antibiotics?. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1980, vol. 6, p. 424-427.
- FAZIO, M.A.; OLIVEIRA, V.X., JR.; BULET, P.; MIRANDA, M.T.M.; 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. 205-218.
- 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. 33159-33163.
- FIELDS, G.B.; FIELDS, C.G. Solvation effects in solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, vol. 113, p. 4202-4207.

- FIELDS, G.B.; TIAN, Z.; BARANY, G. Principles and practice of solid-phase peptide synthesis. Em: Synthetic Peptides: A user's guide. Editado por Grant, G.A.; W.H. Freeman and Company, USA. 1992, p. 77-183.
- FINN, R.D.; TATE, J.; MISTRY, J.; COGGILL, P.C.; SAMMUT, S.J.; HOTZ, H.R.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; EDDY, S.R.; SONNHAMMER, E.L.L.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 2008, vol. 36, p. D281-D288.
- FISCHER, R.; MADER, O.; JUNG, G.; BROCK, R. Extending the Applicability of Carboxyfluorescein in Solid-Phase Synthesis. *Bioconjug. Chem.*, 2003, vol. 14, p. 653-660.
- FLÖERSHEIMER, A.; RINIKER, B. Solid-phase synthesis of peptides with the highly acid-sensitive HMPB linker. Em: Proceedings of the 21st European Peptide Symposium, 1991, Leiden, Netherlands, USA. Giralt, E.; Andreu, D., ESCOM, 2005, p. 131-133.
- FOGACA, A.C.; DA SILVA, P.I.; MIRANDA, M.T.M.; BIANCHI, A.G.; MIRANDA, A.; RIBOLLA, P.E. M.; DAFFRE, S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, p. 25330-25334.
- FRACASTORO, G; WRIGHT, W.C. De contagione et contagiosis morbis et eorum curatione. London : G. P. Putnam's sons, 1930. 356p.
- FUJIWARA, Y; AKAJI, K; KISO, Y. Racemization-free synthesis of C-terminal cysteine-peptide using 2-chlorotrityl resin. *Chem. Pharmac. Bull.*, 1994, vol. 42, p. 724-746.
- FUKUSHIMA, Y. Secondary structural analysis in the solid state for analogous sequential polypeptides of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Polymer Bull.*, 2000, vol. 45, p. 237-244.
- FUKUZAWA, A.H.; VELLUTINI, B.C.; LORENZINI, D.M.; SILVA JR, P.I.; MORTARA, R.A.; DA SILVA, J.M.C.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.*, 2008, vol. 32, p. 716-725.
- GAIRI, M.; LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Use of BOP reagent for the suppression of diketopiperazine formation in Boc/Bzl solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1990, vol. 31, p. 7363-7366.
- GALLO, R.C. Historical essay: The early years of HIV/AIDS. *Science*, 2002, vol. 298, p. 1728-1730
- GALVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LOPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, vol. 120, p. 51-70.
- .GANZ, T.; SELSTED, M.E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S.S.; DAHER, K.; BAINTON, D.F.; LEHRER, R.I. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1985, vol. 76, p. 1427-1435.
- GARCIA-MARTIN, F.; QUINTANAR-AUDELO, M.; GARCIA-RAMOS, Y.; CRUZ, L.J.; GRAVEL, C.; FURIC, R.; COTE, S.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. ChemMatrix, a poly(ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *J. Comb. Chem.*, 2006a, vol. 8, p. 213-220.
- GARCÍA-MARTÍN, F.; WHITE, P.; STEINAUER, R.; CÔTÉ, S.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The Synergy of ChemMatrix and Pseudoproline Resin Building Blocks Renders RANTES, A Complex Aggregated Chemokine. *Biopolymers*, 2006b, vol. 84, p. 566-575.

- GIFFORD, J.; HUNTER, H.; VOGEL, H. Lactoferricin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, p. 2588-2598.
- GIRALT, E.; ALBERICIO, F.; PEDROSO, E.; GRANIER, C.; VAN RIETSCHOTEN, J. Convergent solid-phase peptide synthesis. II. Synthesis of the 1-6 Apamin protected segment on a Nbb-resin – Synthesis of Apamin. *Tetrahedron*, 1982, vol. 38, p. 1193-1201.
- GISIN, B.F.; MERRIFIELD, R.B.; TOSTESON, D.C. Solid phase synthesis of cyclododecadepsipeptide valinomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, vol. 91, p. 2691-2695.
- GISIN, B.F. The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid, *Anal. Chim. Acta*, 1972, vol. 58, p. 248-249.
- GISIN, B.F.; DAVIS, D.G.; BOROWSKA, Z.K.; HALL, J.E.; KOBAYASHI, S. Synthesis of the major component of alamethicin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, vol. 103, p. 6373-6377.
- GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2007, vol. 2, p. 1-33.
- GÓMEZ, J.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, D.; STIEFEL, V.; RIGAU, J.; PUIGDOMÈNECH, P.; PAGÈS, M. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature*, 1988, vol. 334, p. 262-264.
- GUPTA, V. D.; GUPTA, M. K.; NATH, K. Vibrational spectra of oligomers of glycine in relation to polyglycine. *Biopolymers*, 1975, vol. 14, p. 1987-1990.
- GURURAJA, T.L.; LEVINE, J.H.; TRAN, D.T., NAGANAGOWDA, G.A.; RAMALINGAM, K.; RAMASUBBU, N.; LEVINE, M.J. Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7). *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Molec. Enzymol.*, 1999, vol. 1431, p. 107-119.
- HANCOCK, R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet. Infect. Dis.*, 2001, vol.1, p. 156-64.
- HANCOCK, R.; LEHRER, R. Cationic peptide: a new source of antibiotics. *TIBTECH.*, 1998, vol. 16, p. 82-88.
- HAUG, B. E.; STROEM, M. B.; SVENDSEN, J. S. M. The medicinal chemistry of short lactoferricin -based antibacterial peptides. *Curr. Med. Chem.*, 2007, vol. 14, p. 1-18.
- HEINTZEN, C.; MELZER, S.; FISCHER, R.; KAPPELER, S.; APEL, K.; STAIGER, D. A light-entrained and temperature-entrained circadian clock controls expression of transcripts encoding nuclear proteins with homology to RNA-binding proteins in meristematic tissue. *Plant J.*, 1994, vol. 5, p. 799-813.
- HELMERHORST, E.J.; VAN'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; SIMOONS-SMIT, I.; NIEUW AMERONGEN, A.V. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem. J.*, 1997, vol. 326, p. 39-45.
- HELMERHORST, E.J.; BREEUWER, P.; VAN'T HOF, W.; WALGREEN-WETERINGS, E.; OOMEN, L.C.; VEERMAN, E.C.; AMERONGEN, A.V.; ABEE, T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, p. 7286-7291.
- HELMERHORST, E.J.; REIJNDERS, I.M.; VAN 'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.I.; NIEUW AMERONGEN, A.V. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.*, 1999a, vol. 449, p. 105-110.
- HENDRIX, J.C; HALVERSON, K.J.; JARRETT, J.T.; LANSBURY, P.T., JR.; A novel solvent system for solid-phase synthesis of protected peptides: the disaggregation of resin - bound antiparallel β -sheet. *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, p. 4517-4518.

- HENKEL, B.; BAYER, E. Monitoring of solid phase peptide synthesis by FT-IR spectroscopy. *J. Peptide Sci.*, 1998, vol. 4, p. 461-470.
- HENRIQUES, S.T.; COSTA, J.; CASTANHO, M.A.R.B. Re-evaluating the role of strongly charged sequences in amphipathic cell-penetrating peptides: A fluorescence study using Pep-1. *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579, p. 4498-4502.
- HENRIQUES, S.T.; MELO, M.N.; CASTANHO, M.A.R.B. How to address CPP and AMP translocation? Methods to detect and quantify peptide internalization *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Memb. Biol.*, 2007, vol. 24, p. 173-184.
- HERBINIÈRE, J., BRAQUART-VARNIER, C.; GRÈVE, P.; STRUB, J. M.; FRÈRE, JACQUES, VAN DORSSELAER, A.; MARTIN, G. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Dev. Comp. Immunol.*, 2005, vol. 29, p. 489-499.
- HETRU, C.; LETELIER, L.; OREN, Z.; HOFFMANN, J.A.; SHAI, Y. Androctonin, a hydrophilic disulphide-bridged non-haemolytic anti-microbial peptide: a plausible mode of action. *Biochem. J.*, 2000, vol. 345, p. 653-664.
- HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J.M.; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996, vol. 8, p. 8-13.
- HYDE, C.; JOHNSON, T.; OWEN, D.; QUIBELL, M.; SHEPPARD, R.C. Some "difficult sequences" made easy. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1994, vol. 43, p. 431-440.
- IJIMA, R; KURATA, SH.; NATORI, SH. Purification, Characterization, and cDNA cloning of the antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, p. 12055-12061.
- INUI, T.; BODI, J.; NISHIO, H.; NISHIUCHI, Y.; KIMURA, T. Synthesis of amyloid β -peptides in solution employing chloroform-phenol mixed solvent for facile segment condensation of sparingly soluble protected peptides. *Letts. Pept. Sci.*, 2001, vol. 8, p. 319-330.
- IWAHORI, A.; HIROTA, Y.; SAMPE, R.; MIYANO, S.; NUMAO, N. On the antibacterial activity of normal and reversed magainin 2 analogs against *Helicobacter pylori*. *Biol. Pharm. Bull.*, 1997, vol. 20, p. 267-270.
- JACK, R.W; CARNE, A.; METZGER, J.; STEFANOVIC, S.; SAHL, H.G.; JUNG, G.; TAGG, J. Elucidation of the structure of SA-FF22, a lanthionine-containing antibacterial peptide produced by *Streptococcus pyogenes* strain FF22. *FEBS*, 1994, vol. 220, p. 455-462.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide Antimicrobial Agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 19, p. 491-511.
- JOBLING, M.F.; BARROW, C.J.; WHITE, A.R.; MASTERS, C.L.; COLLINS, S.J.; CAPPAL, R. The synthesis and spectroscopic analyses of the neurotoxin prion peptide 106-126. Comparative use of manual Boc and Fmoc chemistry. *Letts. Pept. Sci.*, 1999, vol. 6, p. 129-134.
- JOERGER, R.D. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.*, 2003, vol. 82, p. 640-647.
- JOHNSON, T.; QUIBELL, M.; OWEN, D.; SHEPPARD, R.C. A reversible protecting group for the amide bond in peptides. Use in the synthesis of "difficult sequences". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, vol. 4, p. 369-372.
- JOHNSON, T.; QUIBELL, M.; SHEPPARD, R.C. N,O-bisFmoc derivatives of N-(2-hydroxy-4-methoxybenzyl)-amino acids: useful intermediates in peptide synthesis. *J. Pept.Sci.*, 1995, vol. 1, 11-25.

- JOHNSON, T.; QUIBELL, M. The N-(2-hydroxybenzyl) protecting group for amide bond protection in solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol. 35, p. 463-466.
- JONES, E.M.; SMART, A.; BLOOMBERG, G.; BURGESS, L.; MILLAR M.R. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, vol. 77, p. 208-214.
- JORCANO, J.L.; FRANZ, J.K.; FRANKE, W.W. Amino acid sequence diversity between bovine epidermal cytokeratin polypeptides of the basic (type II) subfamily as determined from cDNA. *Differentiation*, 1984, vol. 28, p. 155-163.
- JUNG, G. Lantibiotics - Ribosomally Synthesized Biologically Active Polypeptides containing Sulfide Bridges and α,β -Didehydroamino Acids. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1991, vol. 30, p.1051-1068
- JUNG, Y.H.; PARK, B.Y.; LEE, D.K.; HAHN, Y.S.; CHUNG, J.H.; MAN, D.M.; MOON, H.J.; LEE, B.L.; LEE, Y.H. Biochemical and molecular characterization of an antifungal PROTEIN from tenebrio-molitor larvae. *Mol. Cells*, 1995, vol. 5, p. 287-292.
- KACPRZYK, L.; RYDENGAARD, V.; MOERGELIN, M.; DAVOUDI, M.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, 2007, vol. 1768, p. 2667-2680.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R.L.; BOSSINGER, C.D.; COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, p. 595-598.
- KAISER, E.T.; MIHARA, H.; LAFORET, G.A.; KELLY, J.W.; WALTERS, L.; FINDEIS, M.A.; SASAKI, T. Peptide and protein synthesis by segment synthesis condensation. *Science*, 1989, vol. 243, p. 187-192.
- KAISER, T.; WOLFGANG, V. Solid-phase peptide synthetic approaches to mouse macrophage migration inhibitory factor (mMIF). Synthesis of peptide fragments for a convergent solid-phase peptide synthetic strategy. *Journal fuer Praktische Chemie*, 1997, vol. 339, p. 371-380.
- KAPPE, C. O. Speeding up solid-phase chemistry by microwave irradiation: A tool for high throughput synthesis. *Am. Laborat.*, 2001, vol. 33, p. 13-16.
- KARELIN, A.A.; FILIPPOVA, M.M.; IATSKIN, O.N.; BLISHCHENKO, E.L.; NAZIMOV, I.V.; IVANOV, V.T. Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes results in formation of biologically active peptides. *Bioorganicheskaja khimija*, 1998, vol. 24, p. 271-281.
- KELLER, B.; SCHMID, J.; LAMB, C.J. Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein-beta-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, p. 1309-1314.
- KEMPE, M.; BARANY, G. CLEAR: A novel family of highly cross-linked polymeric support for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118, p. 7083-7093.
- KENT, S.B.H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1988, vol. 57, p. 957-989.
- KETCHUM, R.; HU, W.; CROSS, T.A. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science*, 1993, vol. 261, p. 1457-1460.
- KICHLER, A.; MASON, A.J.; BECHINGER, B. Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 2006, vol. 1758, p. 301-307.
- KICHLER, ANTOINE; LEBORGNE, CHRISTIAN; DANOS, OLIVIER; BECHINGER, B. Characterization of the gene transfer process mediated by histidine-rich peptides. *J. Mol. Med.*, 2007, vol. 85, p. 191-201.

- KIM, D.H.; LEE, D.G.; KIM, K.L.; LEE, Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, p. 4449-4458.
- KIRKUP, B.C. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 2006, vol. 13, p. 3335-3350.
- KITCHEN, C.M.R.; NUNO, M.; KITCHEN, S.G.; KROGSTAD, P. Enfuvirtide antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2008, vol. 4, p. 433-439.
- KOLTUNOW A.M.; TRUETTNER, J.; COX, K.H.; WALLROTH, M.; GOLDBERD, R.B. Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell.*, 1990, vol. 2, p. 1201-1224.
- KRAGOL, G.; LOVAS, S.; VARADI, G.; CONDIE, B.A.; HOFFMANN, R.; OTVOS, L. The Antibacterial Peptide Pyrrocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, p. 3016-3026.
- KUBIAK, T.; WHITNEY, D.B.; MERRIFIELD, R.B. Synthetic peptides VH (27-68) and VH (16-68) of the myeloma immunoglobulin M603 heavy chain and their association with the natural light chain to form an antigen-binding site. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, p. 7849-7855.
- LAI, R.; LIU, H.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 295, p. 796-799.
- LARSEN, B.D.; CHRISTENSEN, D.H.; HOLM, A.; ZILLMER, R.; NIELSEN, O.F. The Merrifield peptide synthesis studied by near-infrared Fourier-transform Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol. 115, p. 6247-6253.
- LAWYER, C.; PAI, S.; WATABE, M.; BORGIA, P.; MASHIMO, T.; EAGLETON, L.; WATABE, K. Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett.*, 1996, vol. 390, p. 95-98.
- LEDERBERG, J. Infectious History. *Science*, 2000, vol. 288, p. 287-293.
- LEE, S.Y.; MOON, H.J.; KURATA, S.; NATORI, S.; LEE, B.L. Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol. Pharm. Bull.*, 1995, vol. 18, p. 1049-1052.
- LEE, I.H.; CHO, Y.; LEHRER, R.I. Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, p. 2898-2903.
- LEE, D.G.; KIM, H.K.; KIM, S.A.; PARK, Y.; PARK, S.C.; JANG, S.H.; HAHM, K.S. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 305, p. 305-310.
- LEHRER, R.I.; SELSTED, M.E.; SZKLAREK, D.; FLEISCHMANN, J. Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Infect. Immun.*, 1983, vol. 42, p. 10-14.
- LEHRER, R.I.; GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999, vol. 11, p. 23-27.
- LEI, M.; WU, R. A novel glycine-rich cell wall protein gene in rice. *Plant Mol. Biol.*, 1991, vol. 16, p. 187-198.
- LEVASHINA, E.A.; OHRESSER, S.; BULET, P.; REICHHART, J.M.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.A. Metchnikowin: a novel immune-inducible proline-rich peptide from

- Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 233, p. 694-700.
- LI, S.; FINLEY, J.; LIU, Z.J.; QIU, S.H.; CHEN, H.; LUAN, C.H.; CARSON, M.; TSAO, J.; JOHNSON, D.; LIN, G.; ZHAO, J.; THOMAS, W.; NAGY, L.A.; SHA, B.; DELUCAS, L.J.; WANG, B.C.; LUO, M. Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) domain. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 48596-48601.
- LI, X.S.; REDDY, M.S.; BAEV, D.; EDGERTON, M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 28553-28561.
- LIN, W.C.; CHENG, M.L.; WU, J.W.; YANG, N.S.; CHENG, C.P. A glycine-rich protein gene family predominantly expressed in tomato roots, but not in leaves and ripe fruit. *Plant Sci.*, 2005, vol. 168, p. 283-295.
- LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N. A.; MIRANDA, M.T.M.; Further Studies on Solid-Phase Peptide Synthesis at High Temperature. Em: (Escher, E.; Lubell, W.D.; Valle, S.D., eds.) *Peptides for Youth*, American Peptide Society, San Diego, CA, EUA, 2008.
- LORENZINI, D.; DA SILVA JR, P.; FOGAÇA, A.; 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. 781-791.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Convergent solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, p. 11065-11133.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. CRC Press, Florida, USA., 1997, 278p.
- 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 α -hemoglobin: Effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolymers*, 2007, vol. 88, p. 413-426.
- MAK, P. Hemocidins in a functional and structural context of human antimicrobial peptides. *Front. Biosci.*, 2008, vol. 13, p. 6859-6871.
- MALOY, W.L.; KARI, U. P. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers*, 1995, vol. 37, p. 105-122.
- MANT, C.T.; HODGES, R.S. High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separations, analysis, and conformation. CRS Press, Boca Raton, Florida, 1991, 938p.
- MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; DERBYSHIRE, M.K.; DEWEESE-SCOTT, C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HAO, L.; HE, S.; HURWITZ, D.I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; KRYLOV, D.; LANCZYCKI, C.J.; LIEBERT, C.A.; LIU, C.; LU, F.; LU, S.; MARCHLER, G.H.; MULLOKANDOV, M.; SONG, J.S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R.A.; YIN, J.J.; ZHANG, D.; BRYANT, S.H. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35, p. D237-D240.
- MASON, A.J.; GASNIER, C.; KICHLER, A.; PREVOST, G.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M.H.; BECHINGER, B. Enhanced Membrane Disruption and Antibiotic Action against Pathogenic Bacteria by Designed Histidine-Rich Peptides at Acidic pH. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, p. 3305-3311.
- MASON, A.J.; LEBORGNE, C.; MOULAY, G.; MARTINEZ, A.; DANOS, O.; BECHINGER, B.; KICHLER, A. Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J. Control. Rel.*, 2007, vol. 118, p. 95-104.

- MATSUI, M.; TOYOSAMA, I.; FUKUDA, M. Purification and characterization of a glycine-rich protein from the aleurone layer of soybean seeds. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 1995, vol. 59, p. 2231-2234.
- MATSUYAMA, T.; SATOH, H.; YAMADA, Y.; HASHIMOTO, T. A maize glycine-rich protein is synthesized in the lateral root cap and accumulates in the mucilage. *Plant. Physiol.*, 1999, vol. 120, p. 665-674.
- MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, p. 11361-11368.
- MELINO, S.; RUFINI, S.; SETTE, M.; MORERO, R.; GROTTESI, A.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R. Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, p. 9626-9633.
- MELINO, S.; GALLO, M.; TROTTA, E.; MONDELLO, F.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R. Metal-Binding and Nuclease Activity of an Antimicrobial Peptide Analogue of the Salivary Histatin 5. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, p. 15373-15383.
- MERRIFIELD, B. Solid phase peptide synthesis. Em Peptides: Synthesis, structures and applications. Gutte, B. Ed. 1995. p. 93-169.
- MERRIFIELD, B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods enzymol.*, 1997, vol. 289, p. 3-13.
- MIDOUX, P.; KICHLER, A.; BOUTIN, V.; MAURIZOT, J.C.; MONSIGNY, M. Membrane Permeabilization and Efficient Gene Transfer by a Peptide Containing Several Histidines. *Bioconjugate Chem.*, 1998, vol. 9, p. 260-267.
- MIDOUX, P.; LECAM, E.; COULAUD, D.; DELAIN, E.; PICHON, C. Histidine Containing Peptides and Polypeptides as Nucleic Acid Vectors. *Somat. Cell Mol. Gen.*, 2002, vol. 27, p. 27-47.
- MIHALA, N.; BODI, J.; GOMORY, A.; SULI-VARGHA, H. An alternative solid phase peptide fragment condensation protocol with improved efficiency. *J. Pept. Sci.*, 2001, vol. 7, p. 565-568.
- MILTON, R.C.L.; MILTON, S.C.F.; ADAMS, P.A. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, p. 6039-6046.
- MILTON, S.C.F.; BRANDT, W.; SCHNOLZER, M.; MILTON, R.C.L. Total solid-phase synthesis and prolactin-inhibiting activity of the gonadotropin-releasing hormone precursor protein and the gonadotropin-releasing hormone associated peptide. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, p. 8799-8809.
- MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M. ; JOUVENSAL L.; VOVELLE, F.; BULET, P; DAFFRE, S. Gomesin: a powerful antimicrobial peptide isolated from the Brazilian tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. In: M. E Lima. (Org.), ANIMAL TOXINS: STATE OF THE ART. Perspectives in Health and Biotechnology, Kerala, India: Research Signpost, 2008, no prelo.
- MIRANDA, L.P.; MEUTERMANS, W.D.F.; SMYTHE, M.L.; ALEWOOD, P.F. An Activated O->N Acyl Transfer Auxiliary: Efficient Amide-Backbone Substitution of Hindered "Difficult" Peptides. *J. Org. Chem.*, 2000, vol. 65, p. 5460-5468.
- MIRANDA, M.T.M.; 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.*, 1993, vol. 36, p. 1681-1688.

- MIYAZAWA, T. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations. *J. Chem. Phys.*, 1960, vol. 32, p.1647.
- MONTAGNIER, L. Historical essay: a history of HIV discovery. *Science*, 2002, vol. 298, p. 1727-1728.
- MORTENSON, E.; DREYFUSS, G. Rnp in maize protein. *Nature*, 1989, vol. 337, p. 312-312.
- NADEAU, J.A.; ZHANG, X.S.; LI, J.; O'NEILL, S.D. Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell.*, 1996, vol. 8, p. 213-239.
- NAKAIE, C.R.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; OLIVEIRA, E.; MARCHETTO, R.; MALAVOLTA, L.; CILLI, E.M.; TOMINAGA, M.; OKADA, Y.; JUBILUT, G.N. Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: relevance for peptide synthesis methodology. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Systems*. Kerala: Research Signpost, 2007, p.141-160.
- NAKAZAWA, Y.; BAMBA, M.; NISHIO, S.; ASAKURA, T. Tightly winding structure of sequential model peptide for repeated helical region in *Samia cynthia ricini* silk fibroin studied with solid-state NMR. *Protein Sci.*, 2003, vol. 12, p. 666-671.
- NARITA, M.; ISHIKAWA, K.; NAKANO, H.; ISOKAWA, S. Tertiary peptide bond containing-oligo(Leu)s. Conformational studies in solution of oligo (L-leucine)s with L-proline residue and glycyl-N-(2, 4-dimethoxybenzyl)-L-leucine sequence. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1984, vol. 24, p. 14-24.
- NARITA M.S.H.; UMEYAMA, H.; OBANA, S. The Solubility of Peptide Intermediates in Organic Solvents. Solubilizing Potential of Hexafluoro-2-propanol. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1988, vol. 61, p. 281-284.
- NIRUNSUKSIRI, W.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Characterization of a novel nodulin gene in soybean that shares sequence similarity to the gene for nodulin-24. *Plant Mol. Biol.*, 1990, vol. 15, p. 835-849
- OBOOKATA, J.; OHME, M.; HAYASHIDA, N. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a putative glycine-rich protein of 19.7 kDa in *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.*, 1991, vol. 17, p. 953-955.
- OPPENHEIM, F.G.; XU, T.; MCMILLIAN, F.M.; LEVITZ, S.M.; DIAMOND, R.D.; OFFNER, G.D.; TROXLER, R.F. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, p. 7472-7477.
- OREN, Z.; HONG, J.; SHAI, Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic α -helical peptide and its antimicrobial β -sheet diastereomer. *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 259, p. 360-369.
- PARK, J.M.; JUNG, J.E.; LEE, B.J. Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, vol. 205, p. 948-954.
- PARK, C.B.; KIM, H.S.; KIM, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, vol. 244, p. 253-257.
- PARK, C.J.; PARK, C.B.; HONG, S.S.; LEE, H.S.; LEE, S.Y.; KIM, S.C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. *Plant. Mol. Biol.*, 2000, vol. 44, p. 187-97.

- PARK, S.C.; KIM, J.Y.; JEONG, C.Y.; SHIN, S.Y.; PARK, Y.; HAHM, K.S. Alteration of biological activity and mechanism of antibiotic peptide, PMAP-23 by C-terminal amidation. *Peptide Science*, 2006, p. 240-241.
- PARRINO, J.; GRAHAM, B. S. Smallpox vaccines: past, present, and future. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, vol. 118, p. 1320-1326.
- PENA, S.D.; MACEDO, A.M.; BRAGA, V.M.; RUMJANEK, F.D.; SIMPSON, A.J. F10, the gene for the glycine-rich major eggshell protein of *Schistosoma mansoni* recognizes a family of hypervariable minisatellites in the human genome. *Nucleic Acids Res.*, 1990, vol. 18, p. 7466.
- PERSSON, D.; THOREN, E.G.; ESBJORNER, E.K.; GOKSOR, M.; LINCOLN, P.; NORDEN, B. Vesicle size-dependent translocation of penetratin analogs across lipid membranes. *Biochim. Biophys Acta -Biomembranes*, 2004, vol. 1665, p. 142-155.
- PIETERSE, C.M.; VAN, WEST, P.; VERBAKEL, H.M.; BRASSE, P.W.; VAN DEN BERG-VELTHUIS, G.C.; GOVERS, F. Structure and genomic organization of the ipiB and ipiO gene clusters of *Phytophthora infestans*. *Gene*, 1994, vol. 138, p. 67-77.
- POWERS, J.P.S.; HANCOCK, R.E.W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides*, 2003, vol. 24, p. 1681-1691.
- PRIGGE, S.T.; MAINS, R.E.; EIPPER, B.A.; AMZEL, L.M. New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell. Mol. life Sci.*, 2000, vol. 57, p. 1236-1259.
- PROJAN, S.J. Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, vol. 5, p. 427-430.
- PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. *J. Peptide Sci.*, 2007, vol. 13, p. 386-392.
- QUIBELL, M.; TURNELL, W.G.; JOHNSON, T. Reversible modification of the acid labile 2-hydroxy-4-methoxybenzyl(Hmb) amide protecting group: a simple scheme yielding backbone substituted free peptides. *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol. 35, p. 2237-2238.
- QUIBELL, M.; PACKMAN, L. C.; JOHNSON, T. Synthesis of the 3-Repeat Region of Human Tau-2 by the Solid Phase Assembly of Backbone Amide-Protected Segments. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, p. 11656-11668.
- RAHMAN, S.S.; BUSBY, D.J.; LEE, D.C. Infrared and Raman Spectra of a Single Resin Bead for Analysis of Solid-Phase Reactions and Use in Encoding Combinatorial Libraries. *J. Org. Chem.*, 1998, vol. 63, p. 6196-6199.
- 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. 3898-3905.
- RAMAGE, G.; VANDEWALLE, K.; BACHMANN, S.P.; WICKES, B.L.; LOPEZ-RIBOT, J.L. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 2002, vol. 46, p. 3634-3636.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. Polarization of scattered light quanta. *Nature*, 1928, vol. 122, p. 169.
- REDDY, A.S.N.; POOVAIAH, B.W. Accumulation of a glycine rich protein in auxin-deprived

- strawberry fruits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, vol. 147, p. 885-891.
- REMUZGO, C.; ANDRADE, G. F. S.; TEMPERINI, M. L. A.; MIRANDA, M. T. M.; Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60°C of a novel difficult sequence, *Biopolymers*, 2008, DOI: 10.1002/bip.21110, *in press*.
- REMUZGO, C. M. R.; Estudo da Síntese Convergente de Peptídeos em Fase Sólida: abordagem clássica e uso de temperatura alta. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2003, 108p.
- RICHARD, J.P.; MELIKOV, K.; VIVES, E.; RAMOS, C.; VERBEURE, B.; GAIT, M.J.; CHERNOMORDIK, L.V.; LEBLEU, B. Cell-penetrating Peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 585-590.
- RIEZMAN, H.; MUNN, A.; GELI, M.I.; HICKE, L. Actin myosin-and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia*, 1996, vol. 52, p. 1033-1041.
- RINGLI, C.; KELLER, B.; RYSER, U. Glycine-rich proteins as structural components of plants cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, vol. 58, p. 1430-1441.
- RINIKER, B.; FLORSHEIMER, A.; FRETZ, H.; SIEBER, P.; KAMBER, B. A general strategy for the synthesis of large peptides – The combined solid-phase and solution approach. *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, p. 9307-9320.
- RINNOVA; M., LEBL; M., SOUCEK; M. Solid-phase peptide synthesis by fragment condensation: coupling in swelling volume. *Lett. Pept. Sci.*, 1999, vol. 6, p. 15-22.
- RIVAS, L.; GANZ, T.; Eukaryotic antibiotic peptides: not only a membrane business. *Drug Discov. Today*, 1999, vol. 4, p. 254-256.
- RIVIER, J.; MIRANDA, M.T.M.; Solid-phase peptide synthesis at elevated temperature. In: M Goodman; A Felix; L Moroder; C Toniolo. (Org.), *Synthesis of peptides and peptidomimetics*. 1ª ed. Stuttgart: Thieme, 2002, v. E22, p. 806-813.
- RIVIER, J.; MIRANDA, M.T.M.; Solid-phase peptide synthesis at elevated temperature. In: M Goodman; A Felix; L Moroder; C Toniolo. (Org.), *Synthesis of peptides and peptidomimetics*. 2a. ed. Stuttgart: Thieme, 2004, v. E22a, p. 806-813.
- ROBSON, P.; WRIGHT, G.M.; SITARZ, E.; MAITI, A.; RAWAT, M.; YOUSON, J.H.; KEELEY, F.W. Characterization of lamprin, an unusual matrix protein from lamprey cartilage. Implications for evolution, structure, and assembly of elastin and other fibrillar proteins, *J Biol Chem.*, 1993, vol. 268, p. 1440-1447.
- RUISSSEN, A.L.A., GROENINK, J., HELMERHORST, E.J., WALGREEN-WETERINGS, E., VAN'T HOF, W., VEERMAN, E.C.I. AND NIEUW AMERONGEN, A.V. Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem. J.*, 2001, vol. 356, p. 361-368.
- RUITER, R.K.; VAN ELDIK, G.J.; VAN HERPEN, M.M.; SCHRAUWEN, J.A.; WULLEMS, G.J. Expression in anthers of two genes encoding Brassica oleracea transmembrane channel proteins. *Plant. Mol. Biol.*, 1997, vol. 34, p. 163-168.
- RYDENGARD, V.; NORDAHL, E.A.; SCHMIDTCHEN, A. Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*. *FEBS J.*, 2006, vol. 273, p. 2399-2406.
- RYDENGARD, V.; OLSSON, A.K.; MORGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Histidine-rich glycoprotein exerts antibacterial activity. *FEBS J.*, 2007, vol. 274, p. 377-389.
- RYTTERSGARD, J.; DUE LARSEN, B.; HOLM, A.; CHRISTENSEN, D.H.; FAURSKOV NIELSEN, O. Monitoring of a solid phase peptide synthesis by NIR-FT-Raman spectroscopy. *Spectrochim. Acta*, 1997, vol. 53, p. 91-98.
- SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L.O.; DE OLIVEIRA, D.E. Plant glycine rich proteins: a

- family or just proteins with a common motif? *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, vol. 1492, p. 1-14.
- SAMPSON, W.R.; PATSIOURAS, H.; EDE, N.J. The synthesis of "difficult" peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: a comparative study, *J. Pept. Sci.*, 1999, vol. 5, p. 403-409.
- SANDAL, N.N.; BOJSEN, K.; RICHTER, H.; SENGUPTA-GOPALAN, C.; MARCKER, K.A. The nodulin 24 protein family shows similarity to a family of glycine-rich plant proteins, *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 18, p. 607-610.
- SANSOM, M.S.P. The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1991, vol. 55, p. 139-235.
- SANSOM, M.S.P. Alamethicin and related peptaibols - Model ion channels, *Eur. Biophys. J.* 1993, vol. 22, p. 105-124.
- SANTINO, C.G.; STANFORD, G.L.; CONNER, T.W. Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes, *Plant Mol. Biol.*, 1997, 33, 405-416.
- SATHIYAMOORTHY, P.; SHANMUGASUNDARAM, S. Preparation of cyanobacterial peptide toxin as a biopesticide against cotton pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, vol. 46, p. 511-513.
- SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B.; BAUER, J.; KALBACHER, H.; STEVANOVIC, S.; SCHIRLE, M.; SCHROEDER, K.; BLIN, N.; MEIER, F.; RASSNER, G.; GARBE, C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands, *Nat. Immunol.*, 2001, vol. 2, p. 1133-1137.
- SCHNOELZER, M.; ALEWOOD, P.; JONES, A.; ALEWOOD, D.; KENT, S.B.H. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences, *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 1992, vol. 40, p. 180-193.
- SCHROEDER, G.; FRUHLING, A.; PUHLER, A.M.; PERLICK, A.M. The temporal and spatial transcription pattern in root nodules of *Vicia faba* nodulin genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Mol. Biol.*, 1997, vol. 33, p. 113-123.
- SEEBACH, D.; THALER, A.; BECK, A.K. Solubilization of peptides in non-polar organic solvents by the addition of inorganic salts: facts and implications. *Helv. Chim. Acta*, 1989, vol. 72, p. 857-867.
- SELSTED, M.E.; SZKLAREK, D.; GANZ, T.; LEHRER, R.I. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 1985, vol. 49, p. 202-206.
- 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. 4292-4295.
- SFORÇA, M.L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R.C.R.; OYAMA JR., S.; SILVA, F.D.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; MIRANDA, M.T.M.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T.A. The Micelle-Bound Structure of an Antimicrobial Peptide Derived from the α -Chain of Bovine Hemoglobin Isolated from the Tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, p. 6440-6451.
- SHAI, Y.; OREN, Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 2001, vol. 22, p. 1629-1641.
- SHALEV, D.E.; MOR, A.; KUSTANOVICH, I. Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3, *Biochemistry*, 2002, vol. 41, p. 7312-7317.
- SHEPPARD, R.C.; WILLIAMS, B.J. Acid-labile resin linkage agents for use in solid phase peptide synthesis. *Int. J. peptide Prot. Res.*, 1982, vol. 20, p. 451-454.

- SHI J.; GANZ T. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, p. 3611-3617.
- SHIN, S.Y.; YANG, S.T.; PARK, E.J.; EOM, S.H.; SONG, W.K.; KIM, Y.; HAHM, K.S.; KIM, J.I.L. Salt Resistance and Synergistic Effect with Vancomycin of [alpha]-Helical Antimicrobial Peptide P18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 290, p. 558-562.
- SHOWALTER A.M; ZHOU J.; RUMEAU D.; WORST S.G.; VARNER J.E. Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. *Plant Mol. Biol.*, 1991, vol. 16, p. 547-65.
- SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell.*, 1993, vol. 5, p. 9-23.
- SILVA, P.I.,JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin , an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, p. 33464-33470.
- SIMMONDS R. G. Use of the Hmb backbone-protecting group in the synthesis of difficult sequences. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1996, vol. 47, p. 36-41.
- SITU, H.; BOBEK, L.A. In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, vol. 44, p. 1485-1493.
- SMALL, E.W.; FANCONI, B.; PETICOLAS, W.L. Raman spectroscopy and the phonon dispersion of polyglycine. *J. Chem. Phys.*, 1970, vol. 52, p. 4369-4379.
- SMILLIE, L.B.; NATTRIS, M. Amino acid analyses of proteins and peptides: an overview. Em: High performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analyses and conformation. Mant, C.T. e Hodges, R.S. (Eds.), CRC Press, Florida, USA. 1991, 847-858.
- SOUZA, M.P; TAVARES, M.F.M.; MIRANDA, M.T.M. Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperature. *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, p. 4671-4681.
- STEINBERG, F.M.; RASO, J.; Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1998, vol. 1, p. 48-59.
- STEINERT, P.M.; MACK, J.W.; KORGE, B.P.; GAN, S.Q.; HAYNES, S.R.; STEVEN, A.C. Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, vol. 13, p. 130-139.
- STEWART, J.M; YOUNG, J.D.; Solid Phase Peptide Synthesis. Pierce Chemical Company, Rockford, USA. 1984, p. 1-49.
- SULAKVELIDZE, A. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections, *Drug Discov. Today*, 2005, vol. 10, p. 807-809.
- SUMMERS, W.C.; Bacteriophage therapy, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, vol. 55, p. 437.
- SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M.G.; MARCHETTI, M. New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15, 900-911.
- SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Dis. Aquat. Org.*, 2004, vol. 61, p. 123-135.

- SZETO, H.H.; SCHILLER, P.W.; ZHAO, K.; LUO, G. Fluorescent dyes alter intracellular targeting and function of cell-penetrating tetrapeptides. *FASEB J.*, 2005, vol. 19, p. 118-120.
- TAILOR, R.H.; ACLAND, D.P.; ATTENBOROUGH, S.; CAMMUE, B.P.; EVANS, I.J.; OSBORN, R.W.; RAY, J.A.; REES, S.B.; BROEKAERT, W..F. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, p. 24480-24487.
- TAKESHIMA, K.; CHIKUSHI, A.; LEE, K.K.; YONEHARA, S.; MATSUZAKI, K. Translocation of Analogues of the Antimicrobial Peptides Magainin and Buforin across Human Cell Membranes. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, p. 1310-1315.
- TAM, J.P.; LU, Y.-A.; YANG, J.-L.; YU, Q. Cyclic cystine-knot β -stranded antimicrobial peptides: Occurrence, design and synthesis, Editor(s): Lohner, Karl. Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies, 2001, p. 215-240.
- TELLO, J.C.; La antigüedad de la sífilis en el Perú. Lima SanMarti y Ca, 1908. 208p.
- THALER, A.; SEEBACH, D.F.C.; CARDINAUX, F. Lithium-salt effects in Peptide synthesis. *Helv. Chim. Acta.*, 1991, vol. 74, p. 628-643.
- THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H.H.; THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A.; FRANCOIS, I.E.J.A. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today*, 2007, vol. 12, p. 966-971.
- TITBALL, R. W. An elusive serial killer: Plague: The Mysterious Past and Terrifying Future of the World's Most Dangerous Disease by Wendy Orent. *Nature*, 2004, vol. 430, p. 145-146.
- TORREGGIANI, A.; FINI, G. Raman spectroscopic studies of ligand-protein interactions: the binding of biotin analogues by avidin. *J. Raman Spect.*, 1998, vol. 29, p. 229-236.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 2000, vol. 55, p. 4-30.
- TROXLER, R.F.; OFFNER, G.D.; XU, T.; VANDERSPEK, J.C.; OPPENHEIM, F.G. Structural relationship between human salivary histatins, *J. Dent. Res.*, 1990, vol. 69, p. 2-6.
- 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. 102-108.
- VASSILIOU, A.G.; NEUMANN, G.M.; CONDRON, R.; POLYA, G.M. Purification and mass spectrometry-assisted sequencing of basic antifungal proteins from seeds of pumpkin (*Cucurbita maxima*). *Plant Sci.*, 1998, vol. 134, p. 141-162.
- VELASCO, M.; DIAZ-GUERRA, M.J.; DIAZ-ACHIRICA, P.; ANDREU, D.; RIVAS, L.; BOSCA, L. Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression, *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, p. 4437-4443.
- VELDHUIZEN, E.J.A.; RIJNDERS, M.; CLAASSEN, E.A.; VAN DIJK, A.; HAAGSMAN, H.P. Porcine β -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol. Immun.*, 2008, vol. 45, p. 386-394.
- VOGT, T.C.B.; BECHINGER, B. The Interactions of Histidine-containing Amphipathic Helical Peptide Antibiotics with Lipid Bilayers. The effects of charges and pH. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, p. 29115-29121.
- VYLKOVA, S.; SUN, J.N.; EDGERTON, M. The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. *Purinergic Signal.*, 2007, vol. 3, p. 91-97.

- WANG, M.; LIU, L.H.; WANG, S.; LI, X.; LU, X.; GUPTA, D.; DZIARSKI, R. Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *J. Immunol.*, 2007, vol. 178, p. 3116-3125.
- WARWICKER, J.O. Comparative studies of fibroins. II. The crystal structures of various fibroins. *J Mol Biol.*, 1960, vol. 2, p. 350-362.
- WEBER, P.J.A.; BADER, J.E.; FOLKERS, G.; BECK-SICKINGER, A.G. A fast and inexpensive method for N-terminal fluorescein-labeling of peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, vol. 8, p. 597-600.
- WENDLAND, B.; EMR, S.D.; RIEZMAN, H. Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, vol. 10, p. 513-22.
- WENRONG, Y.; JARAMILLO, D.; JUSTIN GOODING, J.; BRYNT HIBBER, D.; ZHANG, R.; WILLET, G.D.; FISHER, K.J. Sub-ppt detection limits for copper ions with Gly-Gly-His modified electrodes. *Chem. Commun.*, 2001, vol. 19, p.1982-3
- WHO. Contengamos la resistencia microbiana. WHO. 2000. 67p.
- WILLEY, J.M.; VAN DER DONK, W.A. Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2007, vol. 61, p. 477-501.
- WÖHR, T.; WAHL, F.; NEFZI, A.; ROHWEDDER, B.; SATO, T.; SUN, X.; MUTTER, M. Pseudo-prolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118, p. 9218-9227.
- XU, M.; LEWIS, R.V. Structure of a protein superfiber: spider dragline silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, p. 7120-7124.
- YAMASHIRO, D.; JAMES, B.; CHOH, H.L. The use of trifluoroethanol for improved coupling in solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1976, vol. 17, p. 1469-1472.
- YAN, B.; GREMLICH, H.U.; MOSS, S.; COPPOLA, G.M.; SUN, Q.; LIU, L. A Comparison of Various FTIR and FT Raman Methods: Applications in the Reaction Optimization Stage of Combinatorial Chemistry. *J. Comb. Chem.*, 1999, vol. 1, p. 46-54.
- YANG, E.J.; OH, Y.A.; LEE, E.S.; PARK, A.R.; CHO, S.K.; YOO, Y.J.; PARK, O.K. Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, vol. 305, p. 862-868.
- YANG, S.T.; SHIN, S.Y.; HAHM, K.S.; KIM, J.I.L. Design of perfectly symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2006, vol. 27, p. 325-330.
- YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.*, 2003, vol. 55, p. 27-55.
- ZAHARIEV, S.; GUARNACCIA, C.; ZANUTTIN, F.; PINTAR, A.; ESPOSITO, G.; MARAVIC, G.; KRUST, B.; HOVANESSIAN, A.G.; PONGOR, S. Efficient synthesis and comparative studies of the arginine and N ω , N ω -dimethylarginine forms of the human nucleolin glycine/arginine rich domain. *J. Pept. Sci.*, 2005, vol. 11, p. 17-28.
- ZAIYOU, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.*, 2007, vol. 85, p. 317-329.
- 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. USA*, 1987, vol. 84, p. 5449-5453.
- ZHANG, L.; GOLDAMMER, C.; HENKEL, B.; ZUEHL, F.; PANHAUS, G.; JUNG, G.; BAYER, E. "Magic Mixture", a powerful solvent system for solid-phase synthesis of "difficult

sequences". *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp., 3rd (1994), Meeting Date 1993, p. 711-716.*

ZHU, J.; LUTHER, P.W.; LENG, Q.; MIXSON, A.J. Synthetic histidine-rich peptides inhibit *Candida* species and other fungi in vitro: role of endocytosis and treatment implications. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, vol. 50, p. 2797-2805.

ZINIERIS, N.; ZIKOS, C.; FERDERIGOS, N. Improved solid-phase peptide synthesis of 'difficult peptides' by altering the microenvironment of the developing sequence, *Tetrahedron Lett.*, 2006, vol. 47, p. 6861-6864.

ANEXOS

ANEXO A:

Súmula curricular

ANEXO B

Capas dos artigos publicados no doutorado:

1. Remuzgo, C.; Andrade, G.F.S.; Temperini, M.L.A.; Miranda M.T.M. (2008) Acanthoscurrin fragment 101-132: Total synthesis at 60°C of a novel difficult sequence. *Biopolymers – Peptide Science* (DOI: 10.1002/bip.21110, no prelo).
2. Proti, Patrícia B.; Remuzgo, César; Miranda, M.T.M. (2007) Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-acids. *J. Pep. Sci.* 13: 386-392.
3. Miranda, M.T.M.; Remuzgo, C. (2007) Um passo essencial. Seção Memória. *Ciência Hoje* 241: 64-67.
4. Remuzgo, C.; Andrade, G.F.S.; Temperini, M.L.A., Daffre, S.; Miranda, M.T.M. (2006) The C-terminal fragment of acanthoscurrin is a difficult sequence. Em: *Understanding Biology using Peptides (Proceedings of the 19th American Peptide Symposium)*. Blondelle, S.E., Ed., Springer, New York, p. 86-87.
5. Machado, A.; Liria, C.W.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. (2004) Síntese química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova*, 27, 781-789 (Revisão).