

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARLOS FILIPE REIS COSTA GUIMARÃES**

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO HOMOTARSININA: SÍNTESE, ESTUDOS  
REAIONAIS DE DIMERIZAÇÃO E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE**

**DIAMANTINA, MG  
2013**

**CARLOS FILIPE REIS COSTA GUIMARÃES**

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO HOMOTARSININA: SÍNTESE, ESTUDOS  
REACIONAIS DE DIMERIZAÇÃO E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly

**DIAMANTINA, MG  
2013**

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 - 2618.

G963h	<p>Guimarães, Carlos Filipe Reis Costa Peptídeo Antimicrobiano Homotarsinina: Síntese, Estudos Reacionais de Dimerização e Ensaio de Citotoxicidade / Carlos Filipe Reis Costa Guimarães. – Diamantina: UFVJM, 2013. 109 p.</p> <p>Orientador: Rodrigo Moreira Verly Coorientador: Jarbas Magalhães Resende</p> <p>Dissertação (Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Química) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Peptídeo Antimicrobiano. 2. Análise Conformacional de Peptídeos. 3. Síntese em Fase Sólida. 4. <i>Phyllomedusa tarsius</i>. 5. Homotarsinina. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 547</b></p>
-------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO HOMOTARSININA: SÍNTESE, ESTUDOS  
REACIONAIS DE DIMERIZAÇÃO E ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE**

**Carlos Filipe Reis Costa Guimarães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 18 / 07 / 2013

Prof. Marcelo Porto Bemquerer – Embrapa

Prof. David Lee Nelson – UFVJM

Prof. Jarbas Magalhães Resende – UFMG

Prof. Rodrigo Moreira Verly – UFVJM  
Presidente

**DIAMANTINA, MG  
2013**

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo da vitória é o desejo de vencer.”*

*Mahatma Gandhi*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao longo da vida, encontramos pessoas que fazem a diferença em nosso dia a dia. Quando caímos, eles nos levantam, quando estamos fragilizados, eles nos protegem, quando estamos tristes, eles nos confortam e quando estamos perdidos eles nos direcionam. Por esses e outros motivos eu agradeço:

- ✓ Primeiramente a Deus que, por algum motivo, está sempre mostrando o caminho e está sempre ao meu lado;
- ✓ À minha mãe Marilene, que me ensinou a superar todo e qualquer problema e é a grande responsável por minhas motivações. Ao meu pai José Carlos, que sempre manifestou o orgulho que tem pelos seus filhos;
- ✓ Aos avós, tios, primos, irmãos e amigos que compreendem exatamente o que é a essência das palavras união, família e amizade.
- ✓ À Camila Neves, que personifica o sentido das palavras carinho e companheirismo e, mais do que ninguém, soube lidar com os meus momentos de nervosismo com muita paciência e maturidade;
- ✓ À Osvaldo Landes, Victor Hugo, Dênio Emanuel e Antônio Carlos, que nunca mediram esforços para me ajudar e são exemplos raros de amizade verdadeira;
- ✓ À Profa. Dra. Dorila Piló-Veloso e ao Prof. Dr. Jarbas Magalhães, que incentivaram e deram um valioso suporte para a realização e manutenção deste trabalho. Aos colegas do LASEP-UFMG, pela recepção durante a realização dos experimentos.
- ✓ À Profa. Dra. Mariana Quezado pelos ensinamentos em Química de Proteínas (UFG) e pela realização das análises de Espectrometria de Massas na UFMG;
- ✓ Ao Dr. Marcelo Porto Bemquerer pelas análises de Espectrometria de Massas realizadas na Embrapa;
- ✓ Aos colegas do LASEB-UFVJM pela colaboração e aprendizado;
- ✓ Ao Prof. Dr. Álvaro Dutra por deixar o liofilizador à minha disposição;
- ✓ Ao Prof. Dr. Gustavo Brito e a Doutoranda Bethania Avelar por disponibilizarem seus tempos para a realização dos ensaios de citotoxicidade;
- ✓ Ao Prof. Dr. Sandro L. Barbosa por me inserir na vida científica;
- ✓ E por fim, ao Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly que, com coragem e ousadia, aceitou o desafio de me orientar e, não por menos, desempenhou esse papel com elegância e grande competência. Muito obrigado pela oportunidade e pelos ensinamentos!

## RESUMO

---

Neste trabalho foi estudada a influência dos efeitos estruturais na reação de dimerização associada à obtenção do peptídeo antimicrobiano homotarsinina (Htr), bem como foram realizados ensaios hemolíticos e de toxicidade desse peptídeo perante células humanas. Primeiramente foi realizada a síntese da cadeia monomérica da homotarsinina (Htr-M), empregando-se a estratégia Fmoc de síntese em fase sólida. Em seguida, o produto foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), tendo sido o homodímero obtido sequenciado e caracterizado por espectrometria de massas (MALDI-ToF). Foram realizados estudos das preferências conformacionais da Htr-M por dicroísmo circular (CD) em diferentes meios e condições, como na presença de tampão Tris-HCl aquoso, em diferentes misturas de TFE-H<sub>2</sub>O e na presença de micelas de SDS. Realizou-se então a reação de dimerização do monômero em três meios: (i) solução tampão Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5, (ii) solução micelar de SDS 350 mmol·L<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5 e (iii) solução TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v) em Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5. O acompanhamento cinético das reações de dimerização foi realizado por CLAE-FR. Como resultado, foi observado que em solução micelar de SDS a reação se completa em aproximadamente 6h (rendimento de 62%), enquanto que em solução tampão e em solução de TFE:H<sub>2</sub>O são necessárias 24h e 48h (rendimentos de 66% e 85%), respectivamente. Os resultados de CD obtidos para a Htr-M em condições similares às empregadas nas reações de dimerização mostraram que a Htr-M apresenta predominantemente conformação randômica em tampão Tris-HCl aquoso, enquanto adota predominantemente estrutura de hélice  $\alpha$  em solução de TFE:H<sub>2</sub>O (40:60) ou na presença de micelas de SDS. Assim, os resultados do acompanhamento cinético da reação de dimerização indicam que a conformação predominantemente randômica da Htr-M em tampão Tris-HCl aquoso, bem como a diminuição de sua mobilidade e maior interação com a superfície das micelas de SDS e os efeitos de agregação que ocorrem em solução de TFE:H<sub>2</sub>O influenciam diretamente na forma de aproximação das cadeias monoméricas, atuando de maneiras diferentes na formação da ligação dissulfeto. Por fim, foram realizados ensaios de toxicidade em células humanas, os quais mostraram que Htr-M e Htr não apresentam toxicidade a leucócitos mononucleares, além do que também não apresentam atividade hemolítica.

**Palavras-chave:** Peptídeo antimicrobiano, Análise conformacional de peptídeos, Síntese em fase sólida, *Phyllomedusa tarsius*, Homotarsinina.

## ABSTRACT

---

This dissertation is mainly related to studies concerning the role of the structural effects on the dimerization reaction that leads to the antimicrobial peptide homotarsinin (Htr). Besides, hemolytic assays as well as the toxicity of this peptide against human cells have also been investigated. Firstly, the monomeric chain (Htr-M) was obtained by Fmoc solid-phase synthesis. The product was purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and then sequenced and characterized by mass spectrometry (MALDI-ToF). Circular dichroism (CD) studies regarding the Htr-M conformational preferences were performed for the peptide in different media and conditions, such as Tris-HCl aqueous buffer, TFE:H<sub>2</sub>O mixtures, as well as in the presence of SDS micelles. The dimerization reaction was then performed in three distinct media, namely: (i) Tris-HCl aqueous buffer 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.5, (ii) SDS micellar solution of 350 mmol·L<sup>-1</sup> in Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.5 and (iii) TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 in Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8.5. CD studies performed in similar conditions indicated that Htr-M presents predominantly random conformations in aqueous Tris-HCl buffer, whereas it adopts  $\alpha$ -helical arrangements in either TFE:H<sub>2</sub>O (40:60) solution or in the presence of SDS micelles. The kinetic monitoring of the dimerization reactions was carried out by RP-HPLC. The results indicated that the reaction is completed in about 6 h (yield 62%) in the presence of SDS micelles, whereas 24 h and 48 h (yields 66% and 85%) are necessary for the dimerizations performed in the aqueous Tris-HCl and in the TFE:H<sub>2</sub>O solutions, respectively. Therefore, the kinetic studies indicated that the predominantly random conformation of Htr-M in Tris-HCl aqueous buffer, as well as the mobility decrease alongside with the peptide-micelle interactions in the presence of SDS, as well as the aggregation effects in the TFE:H<sub>2</sub>O solution directly affect the inter-chain approach process, which leads to different pathways of the disulfide bond formation. Finally, toxicity assays were performed in human cells and the results showed that both Htr-M and Htr are not toxic against mononuclear leukocytes and also do not show hemolytic activity.

**Key-words:** Antimicrobial peptide, Conformational analysis of peptides, solid phase synthesis, *Phyllomedusa tarsius*, Homotarsinin.



**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1: Esquema de formação de dipeptídeo por ligação peptídica.	4
Figura 2: Representação de um tripeptídeo mostrando a direção da cadeia peptídica.	4
Figura 3: Representação de estrutura planar da ligação peptídica. $C\alpha$ , C, N e H se situam no plano do papel.	6
Figura 4: Rotação em torno de ligações em um peptídeo.	6
Figura 5: Estruturas dos peptídeos.	9
Figura 6: Representação de uma alça beta estabilizada por ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico do primeiro resíduo <i>N</i> -terminal (Val) e o hidrogênio amídico do quarto resíduo (Asn).	10
Figura 7: Modelos das maiores classes estruturais de PAMs.	10
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura mostrando os grânulos da resina e visualização geral progressiva de uma resina mostrando as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas..	15
Figura 9: Estrutura química das principais resinas poliméricas utilizadas na SPFS via estratégia Fmoc.	16
Figura 10: Esquema geral da rota de SPFS.	17
Figura 11: Síntese de peptídeos em fase sólida - estratégia Merrifield.	20
Figura 12: Esquema do princípio da SPFS via estratégia Fmoc.	22
Figura 13: Reagentes ativadores e aditivos mais comuns utilizados na etapa de acoplamento da SPFS.	25
Figura 14: Mecanismo de remoção do grupo amino protetor Fmoc.	26
Figura 15: Abertura do anel de peptídeo de oxazolidina.	29
Figura 16: Epimerização via oxazolona.	30
Figura 17: Resíduo de 3-(1-piperidinil)-alanina.	31

Figura 18: Formação da aspartimida e outros produtos.	32
Figura 19: Formação de DKP.	33
Figura 20: Formação de ligação de dissulfeto entre dois resíduos de cisteínas.	33
Figura 21: kalabata B1 (PDB 1NB1) e o homodímero homotarsinina (Verly, 2010).	34
Figura 22: Suporte sólido utilizado para a síntese do peptídeo Htr-M.	36
Figura 23: Reação da ninidrina para identificação de grupamento amino livre.	38
Figura 24: Perfil cromatográfico analítico da amostra bruta de Htr-M.	49
Figura 25: Espectro de massas (MALDI ToF/ToF) da amostra bruta de Htr-M.	50
Figura 26: Perfil cromatográfico em condições semi-preparativas para purificação de Htr-M.	51
Figura 27: Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) para amostra purificada de Htr-M.	52
Figura 28: Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) da fração do pico com $t_r$ 21,3 min.	53
Figura 29: Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por <i>Roepstorff-Fohlmann-Biemann</i> dos fragmentos formados.	53
Figura 30: Espectro de massas MS/MS do peptídeo Htr-M.	54
Figura 31: Região ampliada do espectro MS/MS comum para alguns íons imônio de Htr-M.	55
Figura 32: Região ampliada do espectro mostrando o fragmento da série $-b_2$ e o fragmento da série $-a_2$ correspondente de Htr-M.	55
Figura 33: Região do espectro ampliada mostrando o assinalamento dos fragmentos $-b_3$ , $-b_4$ e $-b_5$ (em azul) de Htr-M.	56
Figura 34: Região ampliada do espectro destacando o pico de $m/z$ equivalente ao fragmento $-b_{19}$ de Htr-M (A).	

Região ampliada do espectro destacando o fragmento $-y_5$ para Htr-M (B).	57
Figura 35: Espectro de massas MS/MS do peptídeo Htr-M assinalado.	58
Figura 36: Perfil cromatográfico da amostra bruta de $[S^{23}]Htr-M$ .	60
Figura 37: Espectro de massas (MALDI ToF/ToF) da amostra bruta de $[S^{23}]Htr-M$ .	60
Figura 38: Perfil cromatográfico em condições semi-preparativas para purificação de $[S^{23}]Htr-M$ .	61
Figura 39: Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) da amostra purificada de $[S^{23}]Htr-M$ .	62
Figura 40: Espectro de massas MS/MS para o peptídeo $[S^{23}]Htr-M$ .	62
Figura 41: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo $[S^{23}]Htr-M$ .	63
Figura 42: Conteúdo de hélice de $[S^{23}]Htr-M$ em soluções de TFE:H <sub>2</sub> O de diferentes proporções.	64
Figura 43: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em tampão Tris-HCl 100 mmol·L <sup>-1</sup> pH 8,5.	67
Figura 44: Variação das concentrações de Htr-M (laranja) e Htr (preto) na reação de dimerização em Tris-HCl 100 mmol·L <sup>-1</sup> pH 8,5.	67
Figura 45: Perfil cromatográfico mostrando a reação de dimerização no tempo 0 h.	68
Figura 46: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr na presença de micelas de SDS 350 mmol·L <sup>-1</sup> .	69
Figura 47: Variação das concentrações de Htr-M (laranja) e Htr (preto) na reação de dimerização em solução contendo micelas de SDS 350 mmol·L <sup>-1</sup> .	70
Figura 48: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H <sub>2</sub> O 40:60 (v:v).	71

Figura 49: Espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) para os picos relativos ao $t_r$ de 14,9 e 15,3 min.	72
Figura 50: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H <sub>2</sub> O 40:60 (v:v) com alíquotas diluídas.	73
Figura 51: Espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) da Htr, obtida para amostra da reação de dimerização em TFE utilizando as alíquotas diluídas.	74
Figura 52: Variação das concentrações de Htr-M e Htr na reação de dimerização em solução TFE:H <sub>2</sub> O 40:60 (v/v).	75
Figura 53: Estrutura calculada de Htr-M em solução TFE:H <sub>2</sub> O 30:70 (v/v) a partir de dados de RMN.	75
Figura 54: Gráfico de viabilidade celular do monômero Htr-M e do homodímero Htr no teste de toxicidade avaliado pela técnica de exclusão de azul de Tripán e pela incorporação de iodeto de protídeo.	77
Figura 55: Percentual de hemácias que foram lisadas na presença de Htr-M e Htr.	78

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1: Estrutura primária de alguns PAMs.	5
Tabela 2: Ocorrências das estruturas secundárias baseadas em estudos conformacionais de RMN conhecidas até 2011.	7
Tabela 3: Aspectos fundamentais da SPFS.	16
Tabela 4: Grupos protetores mais comumente usados para diferentes cadeias laterais.	23
Tabela 5: Estrutura primária dos peptídeos sintetizados.	47
Tabela 6: Dados do acompanhamento da síntese de Htr-M.	48
Tabela 7: Dados do acompanhamento da síntese de [S <sup>23</sup> ]Htr-M.	59

**LISTA DE ABREVIATURA E ACRÔNIMOS**

---

ACN	Acetonitrila
$\alpha$ -MSH	Hormônio $\alpha$ -melanócito estimulante, do inglês <i><math>\alpha</math>-melanocyte-stimulating hormone</i>
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CHCA	alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
CMC	Concentração micelar crítica
DBU	1,8-diazobiciclo [5,4,0]undec-7-eno
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DKP	Dicetopiperazina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
eV	elétron-volt
EDT	1,2-etanoditiol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
FSH	Hormônio folículo estimulante, do inglês <i>follicle-stimulating hormone</i>
<i>H</i>	Porcentagem de hélice ou teor de helicidade

Hmb	2-hidroxi-4-metoxibenzila
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1- hidroxibenzotriazol
Htr	Homotarsinina
Htr-M	Cadeia monomérica da Htr
[S <sup>23</sup> ]Htr-M	Cadeia monomérica análoga à Htr-M
IPA	2-propanol
$\lambda$	Comprimento de onda
LH	Hormônio luteinizante, do inglês <i>luteinising hormone</i>
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
m/z	Razão entre a massa e carga
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidina
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PAM	do inglês <i>peptidylglycine <math>\alpha</math>-amidating monooxygenase</i>
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PDB	Banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
PIPE	Piperidina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RPMI	do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPFS	Síntese de peptídeo em fase sólida
SRH	Hormônio liberador de somatotropina, do inglês <i>somatotropin releasing hormone</i>
$\theta$	Elipcidade molar
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	triisopropilsilano
$t_r$	tempo de retenção
ToF	Tempo de vôo, do inglês <i>time of flight</i>
Tris	tris-hidroxiaminometilmetano
TSH	Hormônio estimulador da tireoide, do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i>
UV	Ultravioleta



## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURA E ACRÔNIMOS .....	viii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 Peptídeos Antimicrobianos .....	3
2.2 Diversidades estruturais dos peptídeos antimicrobianos .....	3
2.2.1 Estrutura Primária .....	3
2.2.2 Estrutura Secundária e suas Diversidades Conformacionais .....	6
2.2.2.1 Hélice $\alpha$ .....	8
2.2.2.2 Folha $\beta$ .....	8
2.2.2.3 Conformação em alça e volta reversa .....	9
2.2.2.4 Outras Estruturas e Conformações .....	11
2.2 Síntese de Peptídeos .....	13
2.3.1 Síntese Química de Peptídeos .....	13
2.3.1.1 Síntese em solução .....	14
2.3.1.2 Síntese de Peptídeos em Fase Sólida .....	14

2.3.1.2.1 Estratégia Merrifield .....	19
2.3.1.2.2 Estratégia Fmoc .....	21
2.3.2 Ligações de Dissulfeto em Peptídeos Antimicrobianos .....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
3.1 Síntese do Peptídeo Htr-M.....	36
3.1.1 Preparação da Resina para a SPFS .....	37
3.1.2 Etapa de Acoplamento .....	39
3.1.3 Etapa de Desproteção .....	40
3.1.4 Reação de Clivagem do Peptídeo da Resina .....	40
3.2 Síntese do Peptídeo Homodimérico Htr .....	41
3.2.1 Acompanhamento da Reação de Obtenção de Htr .....	41
3.3 Purificação dos Peptídeos por CLAE-FR .....	41
3.4 Secagem das Amostras .....	42
3.5 Análise por Espectrometria de Massas (MS) e Sequenciamento <i>De Novo</i> .....	42
3.6 Estudo conformacional por Dicroísmo Circular .....	43
3.7 Ensaios de Citotoxicidade de Htr-M e Htr.....	44
3.7.1 Ensaios de Toxicidade a Leucócitos Mononucleares.....	44
3.7.2 Avaliação da Atividade Hemolítica .....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Obtenção da Cadeia Monomérica Htr-M.....	48

4.1.1 Peptídeo Monomérico [ $S^{23}$ ]Htr-M .....	58
4.2 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular .....	63
4.3 Obtenção do Peptídeo dimérico Htr.....	66
4.3.1 Reação de dimerização em tampão Tris-HCl, pH 8,5.....	66
4.3.2 Reação de dimerização na presença de micelas SDS.....	68
4.3.3 Reação de dimerização em TFE:H <sub>2</sub> O.....	70
4.4 Ensaios de Citotoxicidade de Htr-M e Htr.....	76
4.4.1 Ensaios de Toxicidade a Leucócitos Mononucleares.....	77
4.4.2 Avaliação da Atividade Hemolítica .....	78
5. CONCLUSÕES .....	79
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80
7. ANEXOS .....	91

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

---

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas biologicamente ativas isoladas e caracterizadas de praticamente todos os organismos vivos (Wang, 2011). Geralmente são constituídos de até 60 resíduos de aminoácidos, o que possibilitam propriedades conformacionais variadas e características catiônicas anfipáticas, o que viabiliza o estudo dessas moléculas em diversos ambientes miméticos de membranas celulares (Barnham *et al.*, 1999; Munishkina *et al.*, 2003).

Os PAMs apresentam um amplo espectro de ação contra diversos microorganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus, representando um grande potencial como alternativa aos antibióticos convencionais, que enfrentam um constante problema, devido à resistência adquirida por parte dos microorganismos (Seo *et al.*, 2013). Neste contexto, os PAMs têm sido alvos de estudos em várias linhas de pesquisa de diversas áreas, as quais englobam a ocorrência e isolamento dessas moléculas na natureza, incluindo também os estudos estruturais, que de posse da versatilidade química, determinam a conformação preferencial e sua relação com os mecanismos de ação. Todavia, a obtenção de PAMs de fontes naturais é uma dos grandes problemas devido à ínfima quantidade isolada, sendo necessárias sínteses, para obtê-los em maior quantidade (Machado *et al.*, 2004). Nesse sentido, uma variedade de técnicas para obtenção destas moléculas vem sendo desenvolvida, permitindo a obtenção de uma ampla variedade estrutural de peptídeos (Coin *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2012). A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) aliada a técnicas de caracterização, purificação e de estudos estruturais revolucionaram a forma de compreender o comportamento dos PAMs e proporcionaram uma nova perspectiva para a busca de moléculas, que possam atuar eficientemente como alternativa aos antibióticos no combate aos microorganismos patogênicos.

Além de fazer diversas considerações relacionadas à química e biologia dos PAMs e a importantes conceitos sobre a síntese de peptídeos, este trabalho teve como objetivo aprofundar os estudos sobre o peptídeo antimicrobiano homotarsinina (Htr), o qual foi isolado do anuro da espécie *Phyllomedusa tarsius* e se apresenta na forma de um homodímero, composto por duas cadeias de vinte e quatro resíduos de aminoácidos e unidas por uma ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína (Prates, 1999).

Neste trabalho, a cadeia monomérica (Htr-M) foi sintetizada, caracterizada e submetida a estudos conformacionais de dicroísmo circular (CD) para, posteriormente, ser investigada a influência dos efeitos estruturais na velocidade e no rendimento da reação de formação do homodímero (Htr) em ambientes que mimetizam membranas biológicas. Foram feitos ainda, estudos de viabilidade celular e ensaios de atividade hemolítica para verificar a toxicidade de Htr-M e Htr a células humanas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos são substâncias químicas evolutivamente antigas. A ampla distribuição dessas moléculas nos reinos animal e vegetal sugere que elas tiveram um papel fundamental no sucesso evolutivo dos mais complexos organismos multicelulares (Zasloff, 2002). Eles estão presentes em praticamente todas as formas de vida munidas de sistema imunológico inato, atuando como primeira linha de defesa contra organismos patogênicos e/ou como imunomoduladores em organismos superiores, o que os torna detentores de um vasto arsenal de mecanismos para proteger o hospedeiro de constantes interações com microorganismos infecciosos (Jenssen *et al.*, 2006).

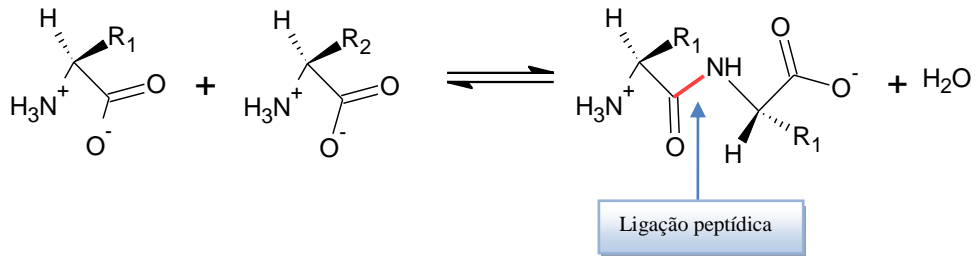
Dentre os peptídeos com atividades biológicas já comprovadas, mais de 2000 apresentam atividade antimicrobiana, dos quais se destacam, principalmente, os antivirais, antifúngicos, antibacterianos e antiparasitários sendo estes isolados e caracterizados de praticamente todos os organismos vivos (Wang, 2011; Wang *et al.*, 2009). As bactérias possuem as chamadas bacteriocinas que se distribuem amplamente na natureza com cerca de 190 moléculas conhecidas. Nos insetos, são conhecidos aproximadamente 166 peptídeos antimicrobianos (PAMs) que são sintetizados de forma constitutiva nos hemócitos e armazenados em seus grânulos, ou de forma indutiva na gordura corporal durante a resposta sistêmica contra patógenos, sendo então, secretados para hemolinfa. Alguns vertebrados como mamíferos, anfíbios e peixes têm seus PAMs expressos em numerosos tecidos e em diferentes tipos de células. Em vertebrados superiores, muitos desses peptídeos têm sido encontrados associados às camadas epiteliais ou sintetizados e secretados por mastócitos e/ou neutrófilos circulantes (Auvynet *et al.*, 2009; Bachere *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Wang, 2011).

### 2.2 Diversidades estruturais dos peptídeos antimicrobianos

#### 2.2.1 Estrutura Primária

Os peptídeos são biomoléculas formadas pela união de vários resíduos de aminoácidos que, através de ligações peptídicas (ligação amídica), se unem covalentemente pela carboxila de um aminoácido e um grupo amino de outro, resultando na perda de uma molécula de água,

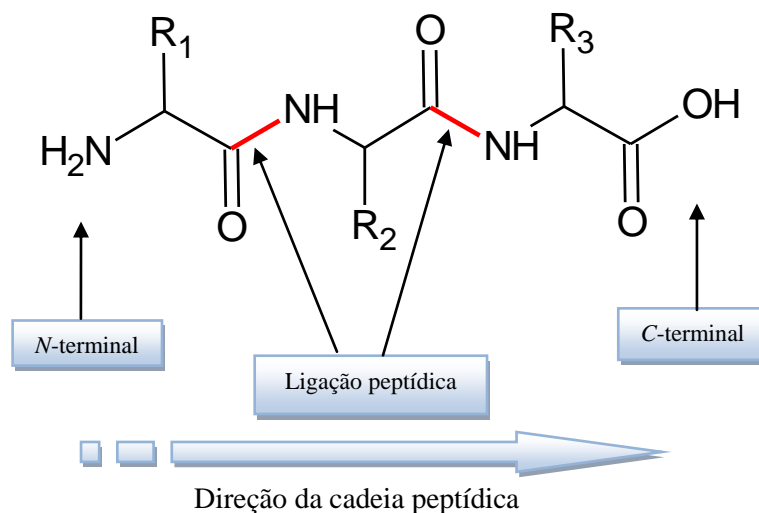
como mostrado na Figura 1 (Berg *et al.*, 2006). Eles se diferem das proteínas em número de resíduos de aminoácidos apresentando normalmente entre 20 e 60, enquanto que as proteínas podem ter mais de três mil resíduos (Li *et al.*, 2012; Zubay *et al.*, 1995).



**Figura 1: Esquema de formação de dipeptídeo por ligação peptídica.**

A cadeia peptídica é constituída de uma parte que se repete regularmente, chamada de cadeia principal, arcabouço ou espinha dorsal, e de uma parte variável que corresponde às cadeias laterais. A cadeia principal tem duas extremidades diferentes: uma extremidade formada por uma amina  $\alpha$  chamada amino-terminal (*N*-terminal) e outra com uma carboxila chamada carboxi-terminal (*C*-terminal). Convencionalmente, a amino terminal é considerada como sendo o início de uma cadeia peptídica (Figura 2) (Berg *et al.*, 2006).

A cadeia peptídica pode apresentar diferentes tamanhos. O peptídeo antimicrobiano Cn-Amp1 (Tabela 1), isolado da água de coco, apresenta uma cadeia com apenas nove resíduos de aminoácidos (Mandal *et al.*, 2009), enquanto que a hidramacina-1, isolada da *Hydra magnipapillata*, um pólipo de água doce, apresenta 60 resíduos (Jung *et al.*, 2009).



**Figura 2: Representação de um tripeptídeo mostrando a direção da cadeia peptídica.**

Além dos diferentes tamanhos, a cadeia peptídica pode apresentar também algumas modificações químicas que influenciam na atividade biológica de muitos peptídeos. A sulfonação e a fosforilação são menos comuns. No entanto, alguns peptídeos com função hormonal, como o hormônio estimulador da tireoide (TSH), o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), requerem glicosilação para exercer efetivamente sua função. Já a acetilação aumenta a potência do hormônio melanócito estimulante ( $\alpha$ -MSH) e da endorfina  $\beta$  no organismo (Murakami *et al.*, 2004).

Alguns peptídeos de ocorrência natural, como hormônio liberador da somatotropina (SRH), a sarcotoxina 1A e peptídeos antimicrobianos  $\alpha$  helicoidais de anfíbios, são amidados na porção C-terminal da cadeia. Essa modificação é necessária para a atividade biológica em no mínimo metade dos vertebrados e na maioria dos invertebrados, sendo a principal responsável por essa modificação *in vivo* a enzima PAM (do inglês *peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase*) (Martínez *et al.*, 1996; Merkler, 1994).

O número e a sequência de resíduos de aminoácidos, que são conectados em um peptídeo, são chamados de estrutura primária e essa característica influencia diretamente o comportamento conformacional dos peptídeos, como será visto a seguir.

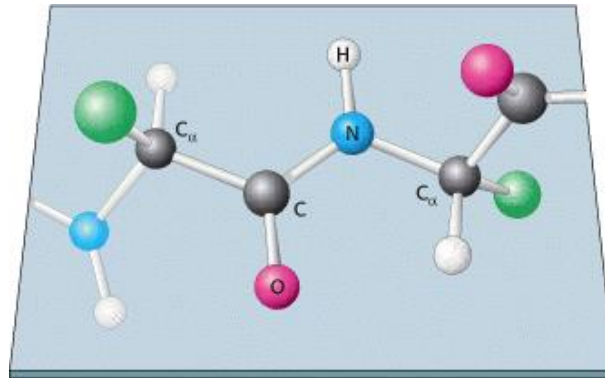
**Tabela 1:** Estrutura primária de alguns PAMs

Nome	Estrutura Primária	Referência
<b>Filoseptina</b>	FLSLIPHAINAVSTLVHMF - NH <sub>2</sub>	(Leite <i>et al.</i> , 2005)
<b>Distinctina</b>	ENREVPPGFTALIKTLRKCKII NLVSGLIEARKYLEQLHRKLNCKV	(Batista <i>et al.</i> , 2001)
<b>KR-20 humana</b>	KRIVQRIKDFLRNLVPRTES - NH <sub>2</sub>	(Murakami <i>et al.</i> , 2004)
<b>Medusina</b>	LGMIPLVAISASISLSKL - NH <sub>2</sub>	(Xi <i>et al.</i> , 2013)
<b>Cn-AMP1</b>	SVAGRAQGM	(Mandal <i>et al.</i> , 2009)



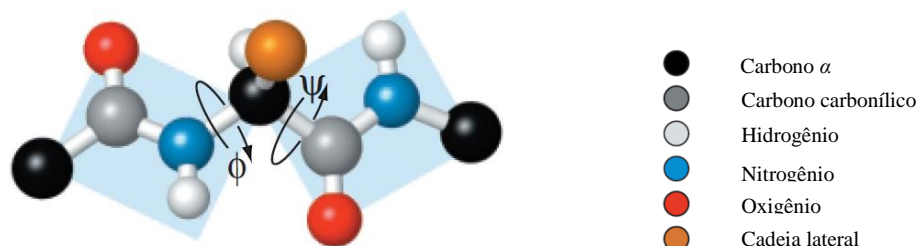
### 2.2.2 Estrutura Secundária e suas Diversidades Conformacionais

A estrutura primária apresenta diversos aspectos importantes em relação à geometria espacial de peptídeos (Barrett *et al.*, 2004; Metzler, 2000; Schmidt, 2000; Zubay *et al.*, 1995). Um dos aspectos está relacionado à ligação peptídica, que é essencialmente plana (Figura 3).



**Figura 3: Representação de estrutura planar da ligação peptídica.**  $C\alpha$ , C, N e H se situam no plano do papel. As esferas verdes representam as cadeias laterais. Extraído de Berg *et al.*, 2006.

Neste caso, o carbono  $\alpha$  com o grupamento C=O de um aminoácido e o grupamento NH com o carbono  $\alpha$  do aminoácido adjacente se situam no mesmo plano. Esta característica de ligação plana é devido ao caráter de ligação dupla parcial da ligação peptídica, o que impede uma rotação em torno dela mesma pela falta de mobilidade do arcabouço peptídico. Já as ligações entre a amina e o carbono  $\alpha$  e entre este e a carbonila são ligações simples puras e são especificadas por ângulos diedros (Figura 4) (Berg *et al.*, 2006).



**Figura 4: Rotação em torno de ligações em um peptídeo.**  $\Phi$  e  $\psi$  correspondem aos ângulos diedros. Extraído e adaptado de Horton *et al.*, 2006.

O ângulo de rotação em torno da ligação entre o átomo de nitrogênio e o de carbono  $\alpha$  é chamado de *phi* ( $\varphi$ ) e o ângulo em torno da ligação entre o carbono  $\alpha$  e a carbonila é chamado de *psi* ( $\psi$ ). Juntos, esses ângulos determinam a orientação espacial da cadeia peptídica, que de

acordo com a liberdade de rotação em torno deles, permitem com que os peptídeos e proteínas se enovalem de modos diferentes, desde que possíveis estericamente (Berg *et al.*, 2006).

Desse modo, a conformação mais estável da estrutura de um peptídeo é determinada por ângulos diedros energeticamente favoráveis, bem como por fatores adicionais estabilizantes, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Sewald & Jakubke, 2002). Essa conformação mais estável é conhecida como estrutura secundária, e descreve um arranjo tridimensional do esqueleto peptídico. Tais conformações podem ser ordenadas de natureza periódica, como as conformações em hélice  $\alpha$  ou em folha  $\beta$ , ou ainda, de natureza não periódica, chamadas de voltas e alças. Nos últimos anos, os estudos conformacionais de peptídeos se tornaram bastante difundidos e atualmente é possível classificar essas estruturas secundárias em quatro famílias distintas (Wang, 2011):  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha\beta$  combinados e peptídeos que não formam  $\alpha$  nem  $\beta$ . A magainina é um peptídeo antimicrobiano  $\alpha$  helicoidal e é um exemplo típico da família  $\alpha$  (Zasloff, 1987). A defensina HNP-3 apresenta um par de fitas  $\beta$  e representa a família  $\beta$  (Selsted *et al.*, 1985). A protegrina 3 apresenta as estruturas  $\alpha$  e  $\beta$  combinadas (Kokryakov *et al.*, 1993) e, por fim, a indolicidina, que não apresenta nem a estrutura  $\alpha$  nem a  $\beta$  (Selsted *et al.*, 1992), enquadrando-se na quarta família (ver Figura 7, p. 10). A Tabela 2 mostra o número de ocorrências dessas quatro famílias estruturais baseados em estudos conformacionais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em fase líquida e em diferentes meios.

**Tabela 2: Ocorrências das estruturas secundárias baseadas em estudos conformacionais de RMN conhecidas até 2011.** Extraído de Wang, 2011

<b>Reino</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b><math>\beta</math></b>	<b><math>\alpha\beta</math></b>	<b>Indefinida</b>	<b>Total</b>
<b>Bactéria</b>	13	4	2	0	19
<b>Plantas</b>	0	12	19	0	31
<b>Animal</b>	69	24	17	3	113
<b>Humano</b>	4	2	3	0	9

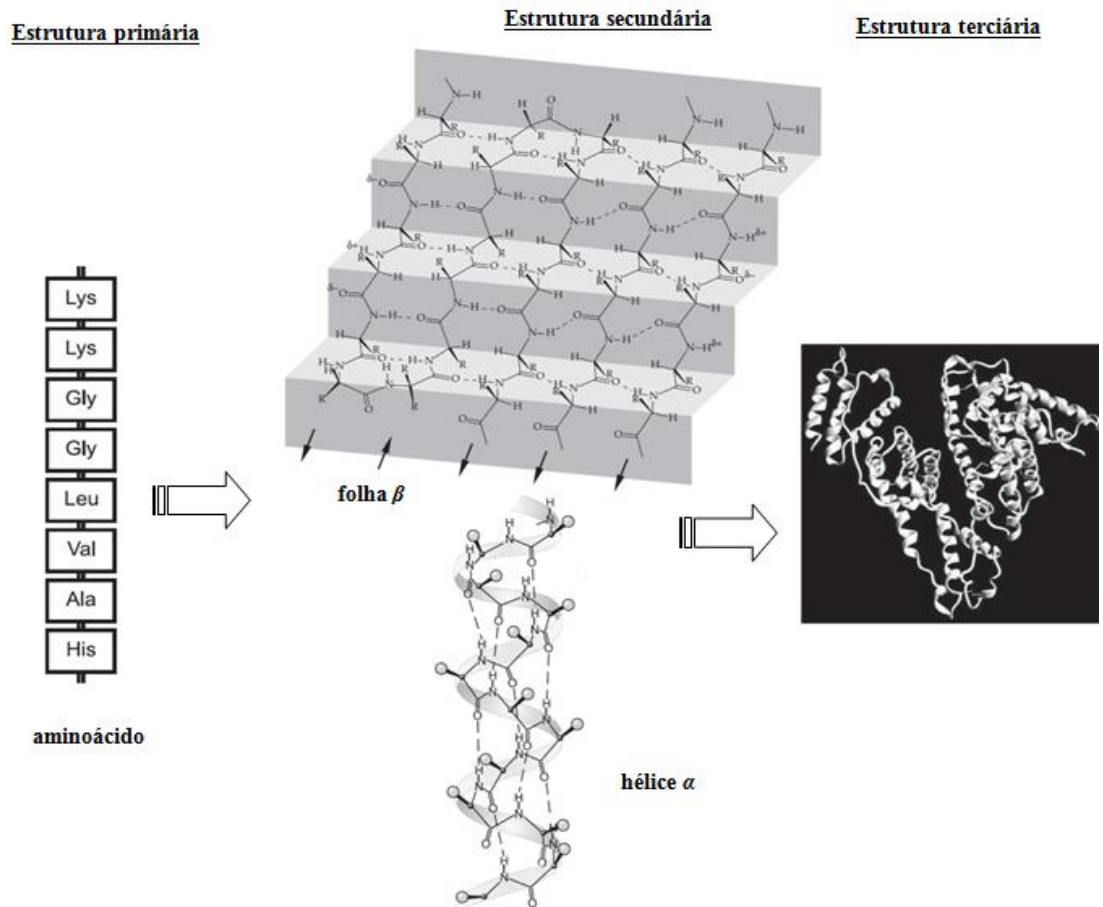
Quando ocorrem interações intramoleculares entre os elementos da cadeia secundária, forma-se a estrutura terciária, que descreve alguma estrutura tridimensional e/ou determina a forma global do peptídeo (Figura 5, p. 9) (Berg *et al.*, 2006; Sewald & Jakubke, 2002).

### **2.2.2.1 Hélice $\alpha$**

Segundo Wang (2011), a hélice  $\alpha$  é o padrão de estrutura secundária mais amplamente encontrada em peptídeos antimicrobianos. Ela corresponde a um padrão de estrutura espiralada, que é estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares. Nesse padrão de estrutura, há um arcaço fortemente espiralado formando a parte interna com as cadeias laterais se projetando externamente ao eixo principal helicoidal. Esse tipo de arranjo tridimensional permite que as cadeias laterais estejam disponíveis para interação com membranas celulares, onde grande parte dos peptídeos bioativos exerce suas atividades biológicas (Huang *et al.*, 2010). Na Figura 5 (p. 9), é possível observar o padrão de ligação de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos, onde cada volta corresponde a 3.6 resíduos de aminoácidos (Sewald & Jakubke, 2002).

### **2.2.2.2 Folha $\beta$**

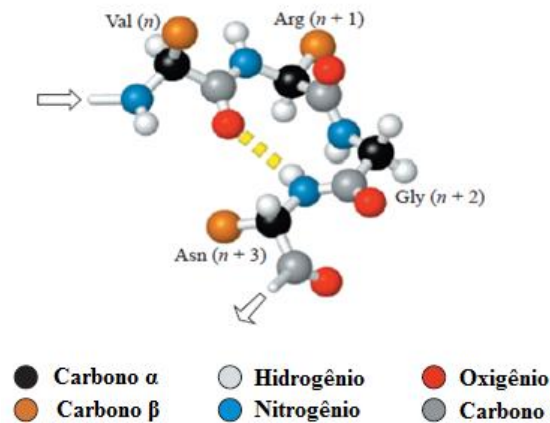
A folha  $\beta$  é estabilizada por ligações de hidrogênio entre filamentos de peptídeos, conhecidos como fitas  $\beta$ . É composta de duas ou mais porções da cadeia peptídica devido a interações de diferentes fitas  $\beta$ . Essa fita é quase que totalmente distendida em vez de espiralada e as cadeias laterais situam-se alternadamente acima e abaixo do plano da fita. Quando as fitas  $\beta$  adjacentes se estendem no mesmo sentido tem-se uma folha  $\beta$  paralela e cada resíduo de aminoácido de uma fita interage por ligação de hidrogênio a um aminoácido de outra fita. Quando as fitas  $\beta$  adjacentes se estendem em sentido contrário, tem-se uma folha  $\beta$  antiparalela e, nesse caso, cada resíduo de aminoácido interage por ligação de hidrogênio com apenas um resíduo de aminoácido da outra fita (Figura 5, p. 9) (Berg *et al.*, 2006).



**Figura 5: Estruturas dos peptídeos.** Na ordem: estrutura primária, secundária e terciária. Extraída e adaptada de Sewald & Jakubke, 2002.

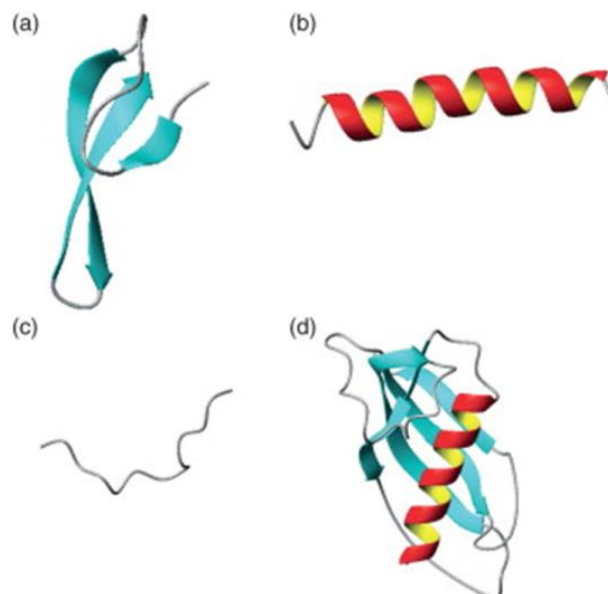
### 2.2.2.3 Conformação em alça e volta reversa

Em uma hélice  $\alpha$  ou uma folha  $\beta$ , nas quais não há ocorrência de ligações de dissulfeto nem a presença de resíduos de aminoácidos consecutivos que possuem estruturas similares que se repete ao longo da cadeia peptídica, a conformação estendida ou linear é mais comum. No entanto, em muitos casos é possível verificar na estrutura diferentes seguimentos de motivos de estrutura secundária distintos, que causam mudanças na direção da cadeia peptídica principal permitindo uma dobra sobre ela mesma. Ligações de hidrogênio de aminoácidos separados por três resíduos na cadeia principal estabilizam essas dobras em formato de “U”, que são chamadas de conformação em alça e/ou volta reversa (Figura 6, p.10) (Horton *et al.*, 2006; Xi *et al.*, 2013).



**Figura 6:** Representação de uma alça beta estabilizada por ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico do primeiro resíduo *N*-terminal (Val) e o hidrogênio amídico do quarto resíduo (Asn). As setas indicam o sentido da cadeia. Extraída e adaptada de Horton *et al.*, 2006.

Apesar das diversas origens, PAMs tendem a apresentar características comuns: são pequenos quando comparados a proteínas (até 60 aminoácidos); muitos são fortemente catiônicos em pH fisiológico (pI 8,9-10,7), com cargas líquidas entre +2 e +9 devido a presença de resíduos de aminoácidos básicos (Lys, Arg) (Findlay *et al.*, 2010); normalmente apresentam próximo de 50% de resíduos hidrofóbicos o que favorece uma característica anfipática; apresentam estabilidade térmica (100°C, 15 min) e muitos possuem pouco ou nenhum efeito em célula eucariótica. Um resumo das estruturas secundárias dos PAMs é apresentado na Figura 7.



**Figura 7:** Modelos das maiores classes estruturais de PAMs. (a) Estrutura folha  $\beta$  (HNP-3; PDB 1DFN); (b) estrutura hélice  $\alpha$  (magainina; PDB 2MAG); (c) estrutura estendida (indolicidina; PDB 1G89); (d)  $\alpha\beta$  estabilizada por cisteína (protegrina-3; PDB 1PF P). Extraída de Kindrachuk *et al.*, 2010.

#### 2.2.2.4 Outras Estruturas e Conformações

Não obstante, os peptídeos podem apresentar algumas outras diversidades estruturais devido às suas versatilidades químicas. Peptídeos cíclicos são formados devido a uma ou mais ligações dissulfeto intra- ou intercadeias peptídicas ou via ligação entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais, o que proporciona maior estabilidade neste tipo de estrutura (Conlan *et al.*, 2010; Daly *et al.*, 2009). São encontrados em organismos procarióticos e eucarióticos, principalmente em plantas, como é o caso da kalata B10, ChaC4 e da Psyle A (Gerlach *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012; Plan *et al.*, 2007).

Os dímeros são formados por duas cadeias peptídicas, que podem ser iguais (homodímero) ou diferentes (heterodímero), conectadas por ligação de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína. Entretanto, peptídeos contendo resíduos de cisteína em ligação de dissulfeto intermolecular são raros. Nos últimos anos, tem sido relatado o isolamento e a síntese de peptídeos diméricos naturais e análogos conectados por ligação de dissulfeto (Batista *et al.*, 2001; Lorenzón *et al.*, 2012; Raimondo *et al.*, 2005).

Um exemplo de heterodímero é o peptídeo distinctina, isolado do anuro *Phyllomedusa distincta*, típico da mata atlântica brasileira, que apresenta duas cadeias interligadas, uma com 22 (Cadeia A) e outra com 25 (Cadeia B) resíduos (Batista *et al.*, 2001). A distinctina é um dos peptídeos antimicrobianos mais estudados, devido ser exemplo único de heterodímero isolado da pele de rã (Batista *et al.*, 2001; Dalla Serra *et al.*, 2008; Evaristo *et al.*, 2012; Mullen *et al.*, 2012; Raimondo *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2009; Simonetti *et al.*, 2012). Estudos recentes desse heterodímero mostram como que a presença da ligação de dissulfeto é essencial para conferir características excepcionais a estas moléculas. A estrutura de RMN da distinctina em solução aquosa mostrou ser um tetrâmero formado por dois heterodímeros, em que os resíduos hidrofóbicos estão completamente situados no interior da estrutura expelindo moléculas de água (Raimondo *et al.*, 2005) mas, por outro lado, os resíduos hidrofílicos se encontram na face externa da estrutura. Esse arranjo tridimensional pode explicar elevada resistência da distinctina às peptidases, como a tripsina (Dalla Serra *et al.*, 2008; Raimondo *et al.*, 2005). Recentemente, foram relatadas por estudos de RMN em fase sólida, acentuadas mudanças conformacionais na estrutura tridimensional da distinctina que favorecem sua interação com a bicamada fosfolipídica (Resende *et al.*, 2009). Nesse caso, a interação peptídeo-peptídeo, que ocorre em solução aquosa, dá origem à interação peptídeo-membrana

resultando em uma estrutura  $\alpha$  helicoidal aberta do peptídeo, sobre a superfície da bicamada fosfolipídica. Nesse arranjo, uma das cadeias (Cadeia A) é ancorada na interface da bicamada, enquanto a outra (Cadeia B) se insere no interior da membrana e interage mais livremente com as moléculas dos fosfolipídeos.

Um exemplo de homodímero é o peptídeo LLP1 que consiste de duas cadeias contendo 28 resíduos de aminoácidos conectados por ligação de dissulfeto entre dois resíduos de cisteínas na região central da cadeia monomérica (Tencza *et al.*, 1999). O LLP1 é um peptídeo artificial que, quando em forma de dímero, apresenta um aumento na atividade antimicrobiana e pode ser objeto para o desenvolvimento de protótipos de peptídeos ainda mais potentes de peptídeos ativos (Tencza *et al.*, 1999).

Estudos para avaliar o efeito da estrutura na atividade biológica de peptídeos derivados do antimicrobiano Ctx-Ha mostraram grande diminuição na habilidade de inibir o crescimento de bactéria ou fungos e um aumento na atividade hemolítica devido à dimerização (Lorenzón *et al.*, 2012). Não obstante, houve um aumento na atividade bactericida para alguns peptídeos diméricos análogos. Além disso, os resultados mostraram uma alta similaridade entre a estrutura secundária dos dímeros e monômeros e uma pequena diferença no tamanho do poro formado em vesículas fosfolipídicas.

O peptídeo antimicrobiano homotarsinina (Htr) é originalmente encontrado na forma de homodímero e isolado da espécie de anuro *Phyllomedusa tarsius*, habitante das florestas brasileiras (Prates, 1999). Sua cadeia monomérica é composta por 24 resíduos de aminoácidos e apresenta o grupo C-terminal amidado, modificação que tem mostrado efeito na promoção de atividade biológica em outras sequências peptídicas (Dennison *et al.*, 2009; Kim & Seong, 2001; Martínez *et al.*, 1996; Merkler, 1994). Dessa forma, Htr possui 48 resíduos de aminoácidos, pois é formado pela ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína (Cys) de duas cadeias monoméricas. Foram descritos recentemente por Verly (2010) estudos estruturais e alguns estudos iniciais da reação de dimerização para formação da Htr. No entanto no presente trabalho, foram realizados estudos mais aprofundados para a dimerização desse peptídeo antimicrobiano e os resultados foram relacionados com dados estruturais já conhecidos e obtidos experimentalmente.

Contudo, de posse do crescente interesse em ampliar e aprimorar os estudos de isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação dos PAMs, deparou-se com a

necessidade de sintetizar estas moléculas e análogos (derivados com modificações pontuais) em escalas variadas. De fato, boa parte das fontes naturais é pobre nestes compostos, o que dificulta o isolamento em quantidades suficientes à realização destes estudos (Machado *et al.*, 2004).

## 2.2 Síntese de Peptídeos

Há basicamente três métodos gerais de síntese de peptídeos: a) a síntese química, que se divide em duas modalidades: síntese em solução, ou clássica, onde se utilizam os métodos e técnicas convencionais da síntese orgânica (Sakakibara, 1999), e a síntese em fase sólida, na qual o peptídeo é sintetizado sobre uma matriz insolúvel e, no final, liberado da mesma (Merrifield, 1963); b) síntese enzimática, onde enzimas proteolíticas, em condições muito específicas, estabelecem ligações peptídicas ao invés de hidrolisá-las (Kullmann, 1987); e c) síntese via DNA recombinante, empregado principalmente para obtenção de proteínas ou peptídeos grandes (Maxam *et al.*, 1977).

A síntese química será introduzida brevemente e, por ter sido empregada neste trabalho, a síntese química em fase sólida será descrita de forma mais detalhada.

### 2.3.1 Síntese Química de Peptídeos

A síntese química é quase sempre uma opção tecnológica melhor do que métodos biotecnológicos de DNA recombinante e de biocatálise para a síntese de peptídeos de tamanhos pequenos e médios (5 a 60 resíduos de aminoácidos), além de outras moléculas do âmbito farmacêutico que são relevantes (Kimmerlin *et al.*, 2005).

Durante um longo período, a síntese química de peptídeos era realizada em solução. No entanto, desde a introdução da síntese em fase sólida por Merrifield (1963), essa tecnologia se tornou amplamente difundida, ganhando maior relevância e alcançando avanços em diversos aspectos, como no desenvolvimento de novos suportes poliméricos e ligantes, grupos protetores reversíveis e métodos para ativação da formação da ligação covalente, contribuindo assim para o avanço da química orgânica como uma forte ferramenta para pesquisa de proteínas e peptídeos (Guzmán *et al.*, 2007).



### 2.3.1.1 Síntese em solução

Conhecida também como síntese “clássica”, a síntese em solução consiste na dissolução de todos os reagentes em um solvente no meio reacional (de Aguiar Amaral *et al.*, 2003). Esta técnica tem sido usada para a síntese de pequenos fragmentos de peptídeos compostos por cerca de 10 resíduos de aminoácidos (Sakakibara, 1999). Sua principal vantagem é a possibilidade de isolar e purificar, desproteger e recombinar seus produtos intermediários depois de cada acoplamento para obter a sequência desejada. A síntese em solução é altamente flexível em relação às estratégias química de acoplamento e combinação de fragmentos peptídicos. Têm sido estudadas novas estratégias, que vão do desenvolvimento de grupos funcionais para as cadeias laterais e condensação de fragmentos para a síntese de moléculas maiores até o uso de novos reagentes de acoplamento (Janda, 1999; Kirschning *et al.*, 2001).

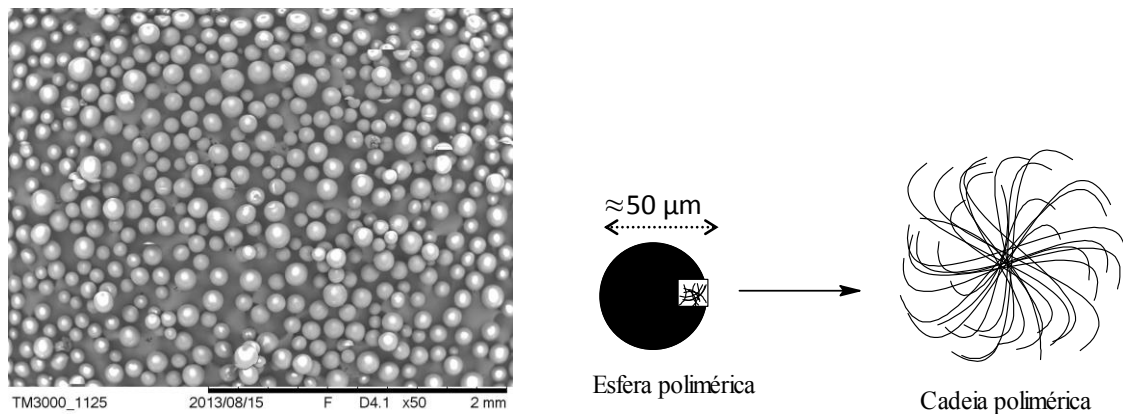
### 2.3.1.2 Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

O primeiro relato sobre o emprego da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) data de 1963 (Merrifield, 1963), quando Robert Bruce Merrifield desenvolveu uma metodologia para a síntese de peptídeos, utilizando polímeros insolúveis e inertes, que serviram de suportes para a síntese, proporcionando não somente uma evolução na síntese de peptídeos, como também revolucionando a química orgânica nos últimos 20 anos.

Tais suportes sólidos são constituídos por polímeros insolúveis, também conhecidos como resinas, que possuem uma sub-unidade responsável pela sustentação física da molécula em formação (estrutura polimérica inerte) e outra parte, conhecida como ligante (*linker*), responsável por promover a ligação ou fixação do material de partida (Marquardt *et al.*, 2001). O suporte mais comumente utilizado é a resina polimérica de ligação cruzada, produzida na forma de grãos de elevada porosidade de aproximadamente 50 micrometros de diâmetro. Estes grãos de resina foram introduzidos por Merrifield em sua publicação original de síntese em fase sólida (Merrifield, 1963) e é mostrado na Figura 8, p. 15 (Kent, 1988).

A resina deve apresentar propriedades físico-químicas favoráveis para o desenvolvimento desta tecnologia, como ser insolúvel em solventes orgânicos, resistente a altas pressões e inertes a todos os reagentes e solventes empregados no processo de síntese. Sua porosidade permite a difusão dos solventes e reagentes no interior dos grãos, deixando os

“sítios ativos” mais acessíveis. Dessa forma, a resina, quando preenchida, exerce um forte efeito solvatante na cadeia peptídica e permite que a formação da cadeia peptídica ocorra também no interior da rede polimérica (Kent, 1988). Não obstante, as resinas poliméricas podem sofrer determinadas modificações químicas que permitem gerar ligações eficientes com o primeiro resíduo de aminoácido a ser fixado (Kassem *et al.*, 2009; Mende & Seitz, 2011; Zikos *et al.*, 2003).

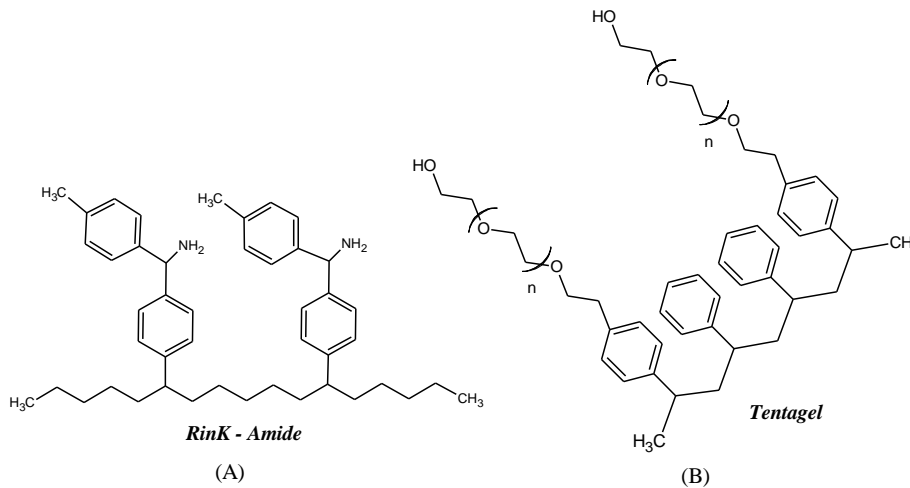


**Figura 8:** À esquerda, microscopia eletrônica de varredura mostrando os grânulos da resina. À direita, visualização geral progressiva de uma resina mostrando as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas.

Na SPFS utilizando a estratégia Merrifield, o aminoácido *C*-terminal é ancorado por intermédio da formação de um éster benzílico com um copolímero de estireno e divinilbenzeno derivatizados com grupo hidroximetilfenilacetamidometil poliestireno (resina PAM) (Benoiton, 2006). O suporte original clorometil poliestireno é raramente empregado, principalmente durante a síntese de cadeias peptídicas longas, pois foi verificado que seu uso pode levar a um aumento no número de reações secundárias que são causadas, dentre outros fatores, pela instabilidade da ligação peptidil-éster benzílico em meio ácido (Barany *et al.*, 1987).

Para a SPFS utilizando a estratégia Fmoc, a rede polimérica é normalmente baseada em um copolímero de poliestireno e divinilbenzeno (Figura 9a, p. 16) ou polietilenoglicol (Figura 9b, p.16). Nessas cadeias poliméricas, cerca de 10 a 90% da massa total correspondem às unidades funcionais, como os substituintes aromáticos derivatizados, que promovem a fixação do primeiro resíduo de aminoácido, atuando como sítios de ligação (agentes ancorantes) entre a cadeia peptídica e o suporte sólido, protegendo, conseqüentemente, o grupo *C*-terminal durante o processo de síntese da molécula (Chan &

White, 2000). Estes agentes de ancoragem podem ser planejados para determinar uma substituição do grupo C-terminal no produto final após a reação de clivagem. No caso do emprego da resina *RINK*, após a clivagem, o peptídeo obtido apresenta um grupo amida em substituição ao grupo ácido carboxílico na região C-terminal (Grant, 2002).

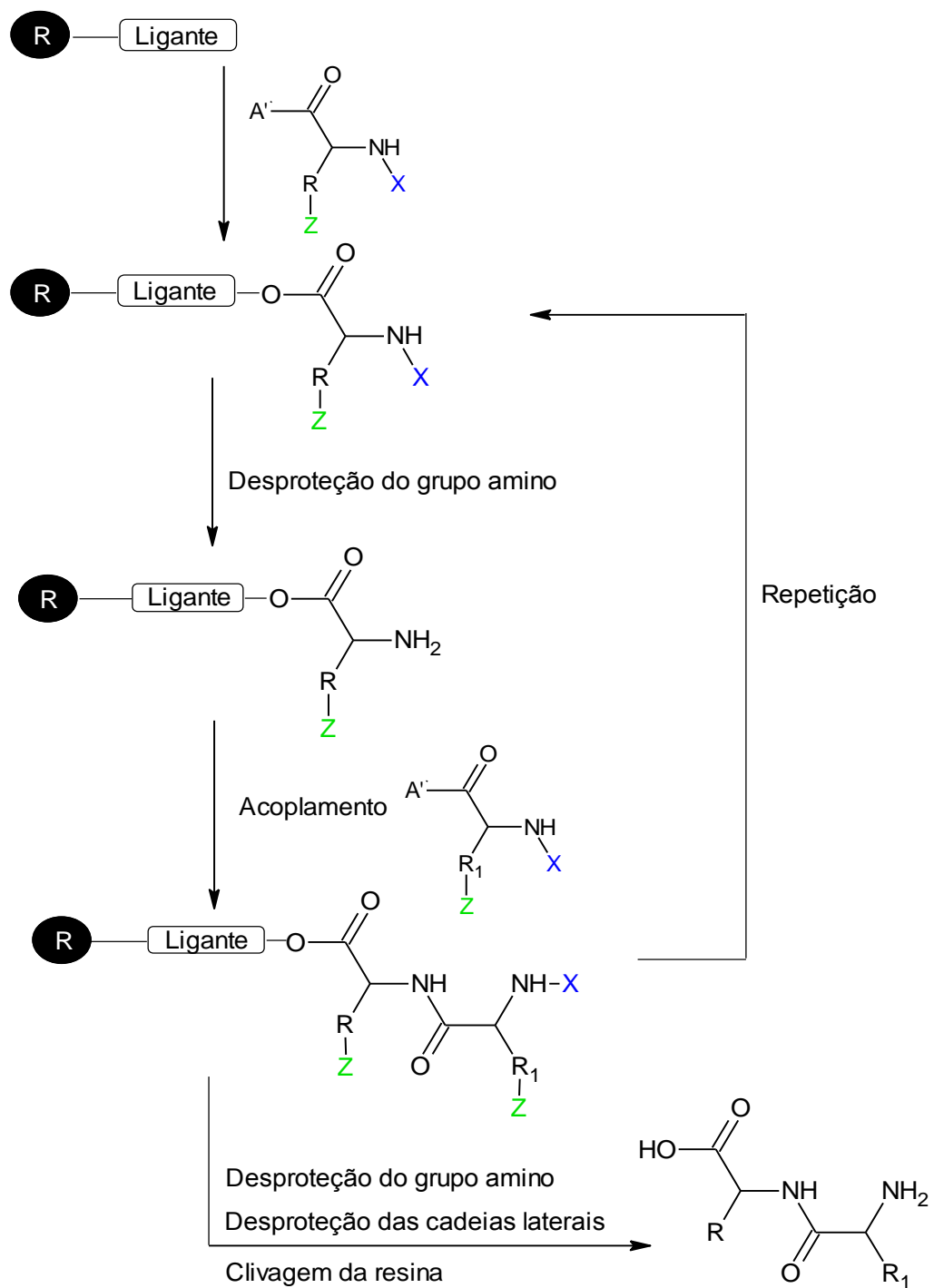


**Figura 9: Estrutura química das principais resinas poliméricas utilizadas na SPFS via estratégia Fmoc.**

A síntese em fase sólida revolucionou a síntese química de peptídeos, que ao longo de um quarto de século, graças aos constantes avanços nos processos químicos e de automação, tem permitido obter uma vasta variedade estrutural de peptídeos (Juliano, 1990). Aspectos fundamentais desta metodologia são mostrados na Tabela 3, ao passo que a Figura 10 (p.17) mostra de forma esquemática a estratégia de SPFS.

**Tabela 3: Aspectos fundamentais da SPFS. Extraído de Kent, 1988**

1. Peptídeo covalentemente ligado ao suporte sólido;
2. Suporte sólido: interpenetração da rede polimérica, intumescimento;
3. A síntese ocorre dentro do suporte intumescido;
4. Peptídeo e resina, mutuamente, aumentam a solvatação um do outro;
5. Cadeia peptídica eficientemente fixada em solução;
6. Diminuição da influencia do comprimento da cadeia na eficiência sintética;
7. Reações são rápidas.



**Figura 10: Esquema geral da rota de SPFS.** Em verde, o grupo protetor da cadeia lateral e, em azul, o grupo protetor do grupo amino  $\alpha$ . Extraído e adaptado de Chan & White, 2000.

A síntese se inicia quando o primeiro resíduo de aminoácido *C*-terminal da sequência peptídica desejada é fixado covalentemente ao suporte sólido, sendo essa ligação resistente às condições reacionais empregadas ao longo da síntese do peptídeo. Para evitar possíveis reações indesejadas, o grupo amino e os grupos reativos da cadeia lateral do resíduo de

aminoácido são, normalmente, protegidos. As espécies químicas que agem como grupos protetores das cadeias laterais são escolhidos de modo que não sejam removidas nas condições reacionais empregadas durante a formação da ligação peptídica. Esses grupos têm a função de proteger as cadeias laterais ao longo de toda a síntese e são denominados de grupos protetores permanentes. Já as espécies químicas que atuam como protetores dos grupos amino  $\alpha$  são seletivamente removidos durante a síntese, sendo denominados de grupos protetores temporários. A próxima etapa consiste justamente na remoção do grupo amino  $\alpha$  protetor, deixando-o livre para reagir com um segundo derivado de aminoácido. Em seguida, é realizada uma etapa de acoplamento que consiste na introdução de um novo derivado de aminoácidos e, para a formação da ligação peptídica, essa etapa exige a ativação do grupamento carboxi do derivado de aminoácido que pode ser realizada por diferentes estratégias, as quais serão detalhadas mais adiante. Como a metodologia de fase sólida consiste em uma síntese linear, é necessária a execução satisfatória de cada etapa de acoplamento, pois a etapa global desta reação determinará o rendimento do produto final (Chan & White, 2000). Visando à máxima eficiência nesta etapa, é comum empregar excesso de reagentes e de derivado de aminoácido que, após um dado tempo reacional, são removidos por filtração, seguida de uma lavagem do conjunto resina-peptídeo (peptidilresina). Ao final dessa etapa de acoplamento, o grupo amino da peptidilresina se encontra protegido novamente e é removido para o acoplamento do terceiro derivado de aminoácido. Essas etapas de desproteção e acoplamento se repetem até a obtenção da sequência peptídica desejada. Ao final da síntese, o peptídeo é liberado de seu suporte sólido e os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos, sendo esta etapa da síntese denominada de clivagem. Geralmente, a resina e os grupos protetores das cadeias laterais são escolhidos de forma que na clivagem a separação do peptídeo da resina e a desproteção ocorram simultaneamente sob mesmas condições (Benoiton, 2006; Chan & White, 2000; Kent, 1988; Sewald & Jakubke, 2002; Stewart & Young, 1984).

A síntese em fase sólida apresenta como maior vantagem a simplicidade para purificação dos produtos obtidos em cada etapa da rota sintética. Essa purificação permite a separação dos peptídeos intermediários, fixados à resina, de reagentes solúveis em solução e a remoção de solventes por simples filtração, com subsequente lavagem. Dessa maneira, eliminam-se os excessos de solventes, reagentes e possíveis produtos indesejados não covalentemente ligados à resina. Tal metodologia resulta na economia de tempo e em uma maior capacidade do uso de condições químicas mais agressivas (maior temperatura e

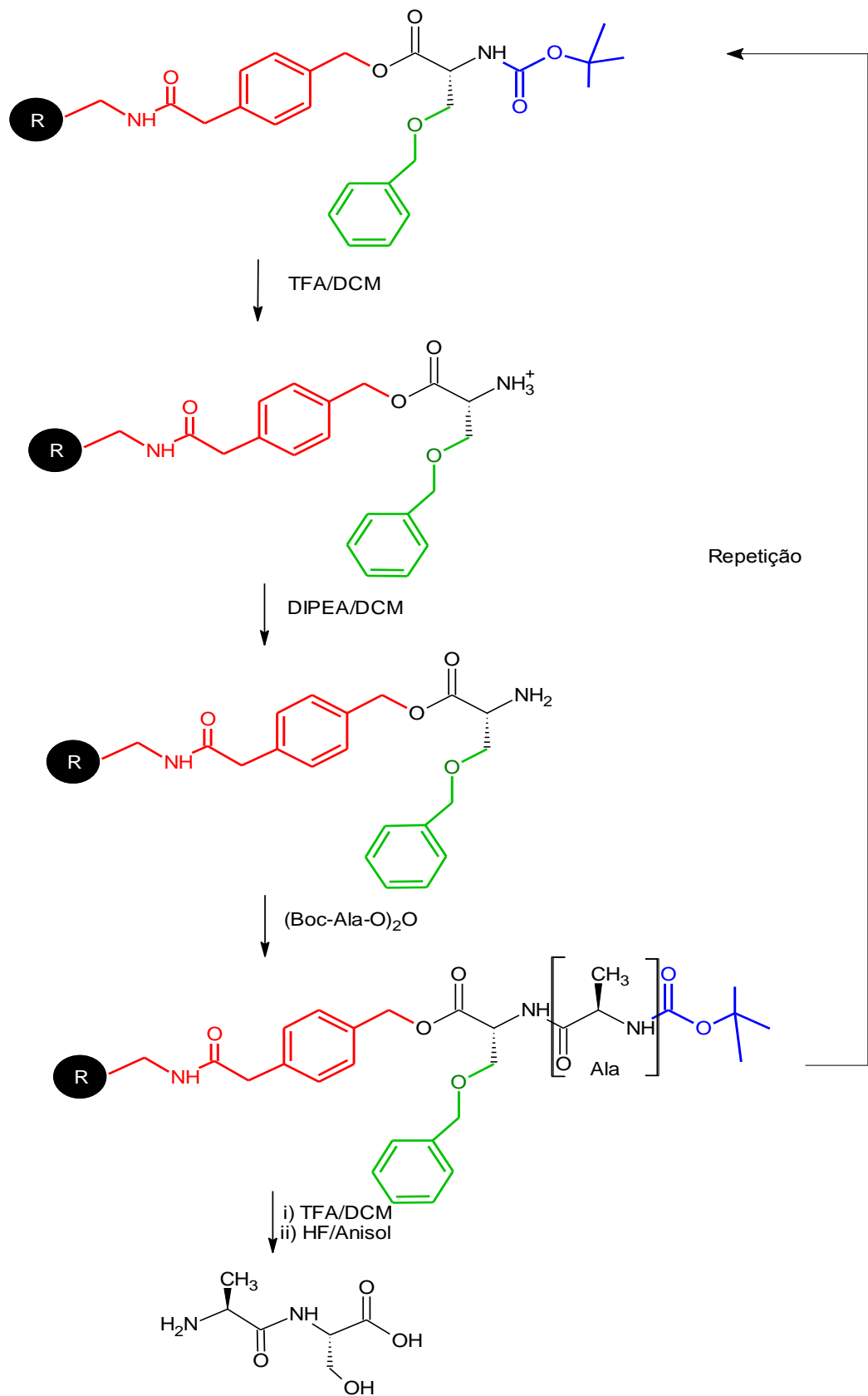
pressão, microondas, etc.) do que aquelas empregadas na síntese em solução. Isto permitiu que diversas alterações ocorressem nos procedimentos clássicos empregados em síntese orgânica e, além disso, desenvolvessem muitas adaptações para a síntese em fase sólida, resultando inclusive na automação de vários destes processos. Atualmente, é possível encontrar diferentes sintetizadores automáticos, não só para a síntese de peptídeos, como também para a síntese orgânica como um todo e alguns, inclusive, acoplados a sistemas de microondas para otimizar a cinética reacional (Malik *et al.*, 2010; Mende *et al.*, 2010; Nissen *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2012; Tofteng *et al.*).

Entretanto, a SPFS possui algumas desvantagens. A difusão dos reagentes pela matriz polimérica é um fator limitante que exige o emprego de excesso de reagente para garantir rendimentos altos e minimização das perdas físicas do peptídeo. A formação de subprodutos devido à reações secundárias ou incompletas dificultam a separação, pois levam a formação de produto cuja natureza química é muito semelhante ao do peptídeo formado. Além disso, há uma escassez de métodos analíticos para o monitoramento das reações (Chan & White, 2000; Dias & Corrêa, 2001).

#### **2.3.1.2.1 Estratégia Merrifield**

A Figura 11 (p.20) mostra o esquema geral da síntese de Merrifield. Nesta estratégia o grupo *tert*-butoxicarbonila (Boc) é para proteção temporária do grupo amino  $\alpha$  e sua remoção é feita em meio ácido, normalmente empregando-se solução de ácido trifluoracético (TFA). Inicialmente, a etapa de acoplamento era realizada com diciclohexilcarbodiimida (DCC) em diclorometano (DCM) sem a pré-ativação do primeiro derivado de aminoácido (Merrifield, 1964), mas atualmente é comum o uso de anidridos simétricos anidros pré-formados, ou éster benzotriazolil em DMF ou em *N*-metilpirrolidina (NMP) (Stewart & Young, 1984). A liberação do peptídeo da resina e a desproteção das cadeias laterais são também realizadas em meio ácido, porém em condições mais fortes do que aquelas utilizadas na remoção do grupo Boc (Chan & White, 2000).

Entretanto, nos processos de desproteção das cadeias laterais ocorre a formação de carbocátions intermediários, que propiciam a ocorrência de reações secundárias e, com o intuito de se evitarem estas reações, observou-se a necessidade da adição de substâncias que atuam como “sequestradores” de carbocátions, como é o caso do anisol, tioanisol ou triisopropilsilano (TIS) (Sewald & Jakubke, 2002).



**Figura 11: Síntese de peptídeos em fase sólida - estratégia Merrifield.** Em vermelho está representado o ligante do suporte polimérico, em azul o grupo protetor do grupo amino (Boc) e em verde o grupo protetor das cadeias laterais reativas. Extraída e adaptada de Chan & White, 2000.

As principais limitações dessa estratégia estão relacionadas às condições reacionais extremamente agressivas empregadas no processo de clivagem e remoção dos grupos protetores das cadeias laterais. Essas condições favorecem diversas reações secundárias, como alquilação das cadeias laterais, hidrólise de ligações peptídicas, rearranjos, entre outros. Além disso, observa-se a necessidade da utilização de aparatos especiais para a etapa final da síntese, devido ao emprego de HF, como recipientes de politetrafluoroetileno (Grant, 2002; Howl, 2005; Sewald & Jakubke, 2002).

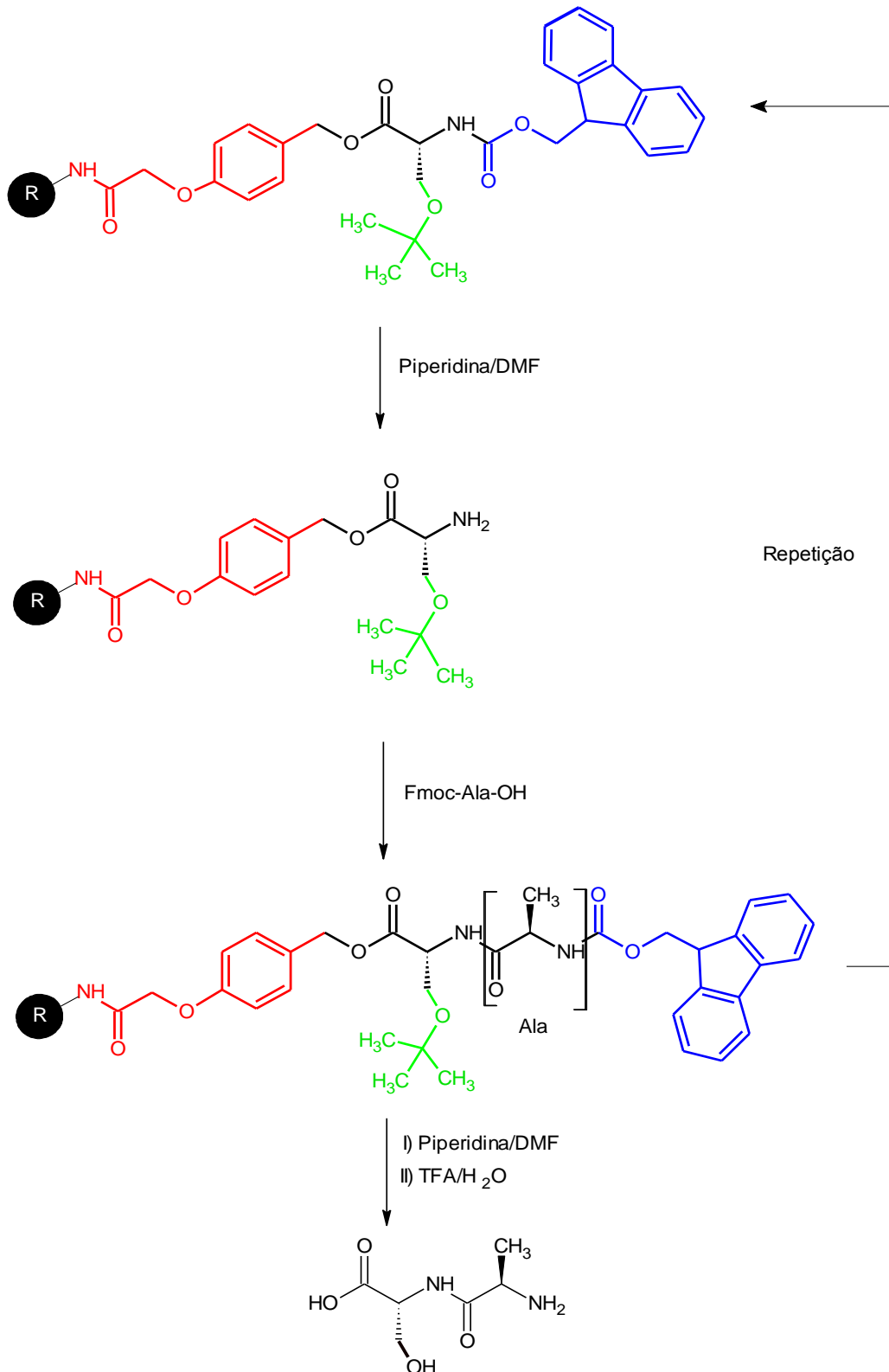
### 2.3.1.2.2 Estratégia Fmoc

Como descrito anteriormente (seção 2.3.1.2.1), a estratégia Merrifield emprega uma variação de acidez para alcançar a seletividade necessária na remoção da proteção temporária (Boc) e da permanente (Benoiton, 2006; Carpino *et al.*, 1972; Grant, 2002). A estratégia Fmoc é uma metodologia de síntese em fase sólida, que envolve o uso do grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupamento amino (Figura 12, p.22, em azul). Nessa estratégia, tem-se um sistema ortogonal de remoção dos grupos protetores, onde o Fmoc é removido por eliminação  $\beta$  catalisada por base e o protetor permanente é removido por acidólise. Dessa forma, a remoção dos grupos protetores temporários e permanentes ocorre por mecanismos químicos completamente diferentes.

Grupos protetores das cadeias laterais e agentes ancorantes podem ser empregados de forma que as condições de remoção sejam mais moderadas do que as utilizadas no método original de Merrifield. Na prática, são usados normalmente grupos que podem ser removidos com o emprego de TFA. No caso para proteção das cadeias laterais, é bastante empregado o *t*-butila (tBu) e tritila (Trt) e, para fixação do peptídeo à resina, um grupo alcoxibenzila.

Mais da metade destes aminoácidos comumente encontrados nas proteínas apresenta cadeias laterais que contêm grupos funcionais reativos. Estes grupos potencialmente reativos são protegidos a fim de se evitarem reações secundárias e para alcançarem elevados níveis de eficiência durante toda a síntese peptídica. Para sínteses rotineiras, frequentemente são empregados grupos protetores de fácil remoção na presença de TFA e que permitem que o peptídeo seja globalmente desprotegido durante a etapa de clivagem. Atualmente, é possível encontrar uma grande variedade de grupos protetores de cadeias laterais disponíveis, possibilitando a modificação seletiva de cadeias laterais para cada resíduo da cadeia peptídica.





**Figura 12: Esquema do princípio da SPFS via estratégia Fmoc.** Em azul está representado o grupo amino protetor 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) e em verde o protetor da cadeia lateral. Extraído e adaptado de Chan & White, 2000.

A Tabela 4 lista alguns grupos protetores de cadeias laterais mais comumente usados para diferentes aminoácidos.

**Tabela 4:** Grupos protetores mais comumente usados para diferentes cadeias laterais

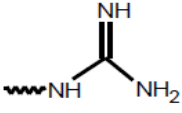
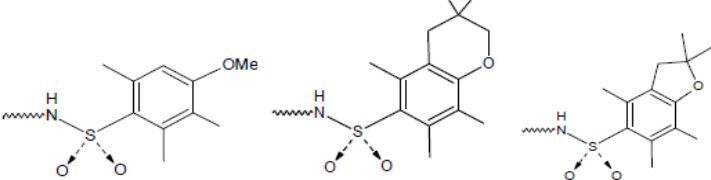
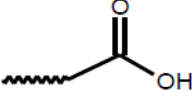
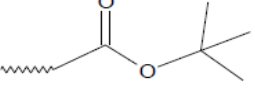
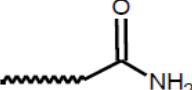
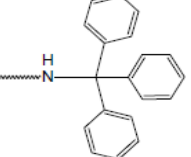

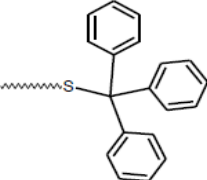
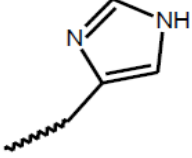
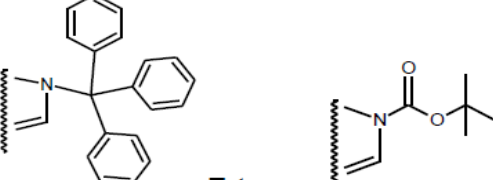

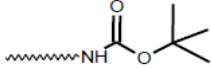
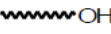
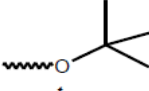
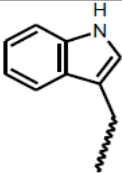
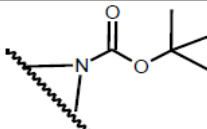
<b>Aminoácido</b>	<b>Cadeia lateral</b>	<b>Grupos protetores</b>
<b>Arg - R</b> (Arginina)		 <p style="text-align: center;"><b>Mtr</b>                      <b>Pmc</b>                      <b>Pbf</b></p>
<b>Asp</b> (Ác. Aspártico)  <b>Glu</b> (Ác. Glutâmico)		 <p style="text-align: center;"><b>O<sup>t</sup>Bu</b></p>
<b>Asn</b> (Asparagina)  <b>Gln</b> (Glutamina)		 <p style="text-align: center;"><b>Trt</b></p>
<b>Cys - C</b> (Cisteína)		 <p style="text-align: center;"><b>Trt</b></p>
<b>His - H</b> (Histidina)		 <p style="text-align: center;"><b>Trt</b>                      <b>Boc</b></p>

Tabela 4: Continuação

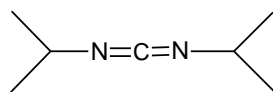
Aminoácido	Cadeia lateral	Grupos protetores
Lys - K (Lisina)		 Boc
Ser (Serina) Thr (Treonina) Tyr (Tirosina)		 tBu
Trp - W (Tryptofano)		 Boc

O princípio da estratégia Fmoc está ilustrado na Figura 12 (p.22). A primeira etapa no processo de síntese consiste na fixação do grupo C-terminal do primeiro resíduo de aminoácido à resina através de um ligante. A execução satisfatória deste processo é particularmente importante, pois a extensão desta reação determinará o rendimento do produto final (Chan & White, 2000). No caso de resinas em que o ponto de ancoragem é um grupo hidroxila, o processo é frequentemente acompanhado por epimerização, devido às fortes condições para levar a efeito esta esterificação. O problema é mais sério com histidina e cisteína e, para estes resíduos, o uso de resina de base tritil é recomendado por serem preparados sob condições que não causam perda de integridade quiral.

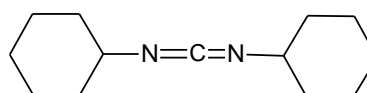
Nesta estratégia, a ativação é realizada por reagentes ativadores *in situ* como as dicicloalquilcarbodiimidas solubilizadas em DMF e/ou DCM. Um exemplo típico desta classe de ativadores é o dicitlohexilcarbodiimida (DCC); no entanto, algumas circunstâncias, como a solubilidade do co-produto uréia no DCC, fazem com que o uso do diisopropilcarbodiimida (DIC) seja mais conveniente. Para aumentar a eficiência do acoplamento mediado pelas carbodiimidas, é comum o uso do 1- hidroxibenzotriazola (HOBt) ou do 1-hidroxi-7-azabenzotriazola (HOAt) como aditivos. Mais atualmente, devido à dificuldade em se obter os reagentes HOBt e HOAt, podem-se empregar as oximas (Subirós-Funosas *et al.*, 2009).

Estes ativadores ajudam também a suprimir problemas de racemização e inibem a desidratação da cadeia lateral carboxiamida da Asn e da Gln que gera nitrilas correspondentes (Benoiton, 2006; Gerlach *et al.*, 2010). Os sais de fosfônio e urônio também podem ser utilizados como agentes ativadores (Knorr *et al.*, 1989). Essas substâncias estão representadas na Figura 13.

#### Carbodiimidias

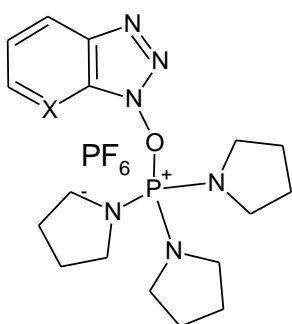


diisopropilcarbodiimida



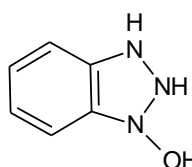
diciclo-hexilcarbodiimida

#### Sais de fosfônio

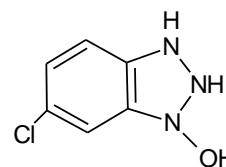


PyAOP se X = N  
PyBOP se X = CH

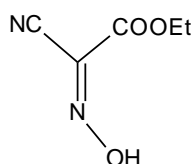
#### Acopladores Adicionais



Hidroxibenzotriazola



6-cloro-hidroxibenzotriazola



2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etila (Oxima)

**Figura 13: Reagentes ativadores e aditivos mais comuns utilizados na etapa de acoplamento da SPFS.**

Antes de cada acoplamento, é necessária a remoção do grupo *N*-Fmoc (Figura 14, p.26). Essa desproteção é realizada em meio básico, normalmente por tratamento com solução de piperidina (PIPE) ou 4-metilpiperidina 20-50% em DMF (% volume) ou NMP. A piperidina abstrai o próton ácido da posição 9 do anel fluoreno para gerar o intermediário aromático ciclopentadienila; segue-se então uma eliminação  $\beta$  para formar o dibenzofulveno (composto 1), um intermediário altamente reativo, que, por sua vez, é rapidamente consumido por um excesso da amina secundária para formar um estável e inofensivo aduto (Grant, 2002). O produto da desproteção absorve fortemente na região do ultravioleta em 300 nm, fornecendo uma possibilidade para o monitoramento da extensão de desproteção, a qual é empregada em alguns processos automatizados.

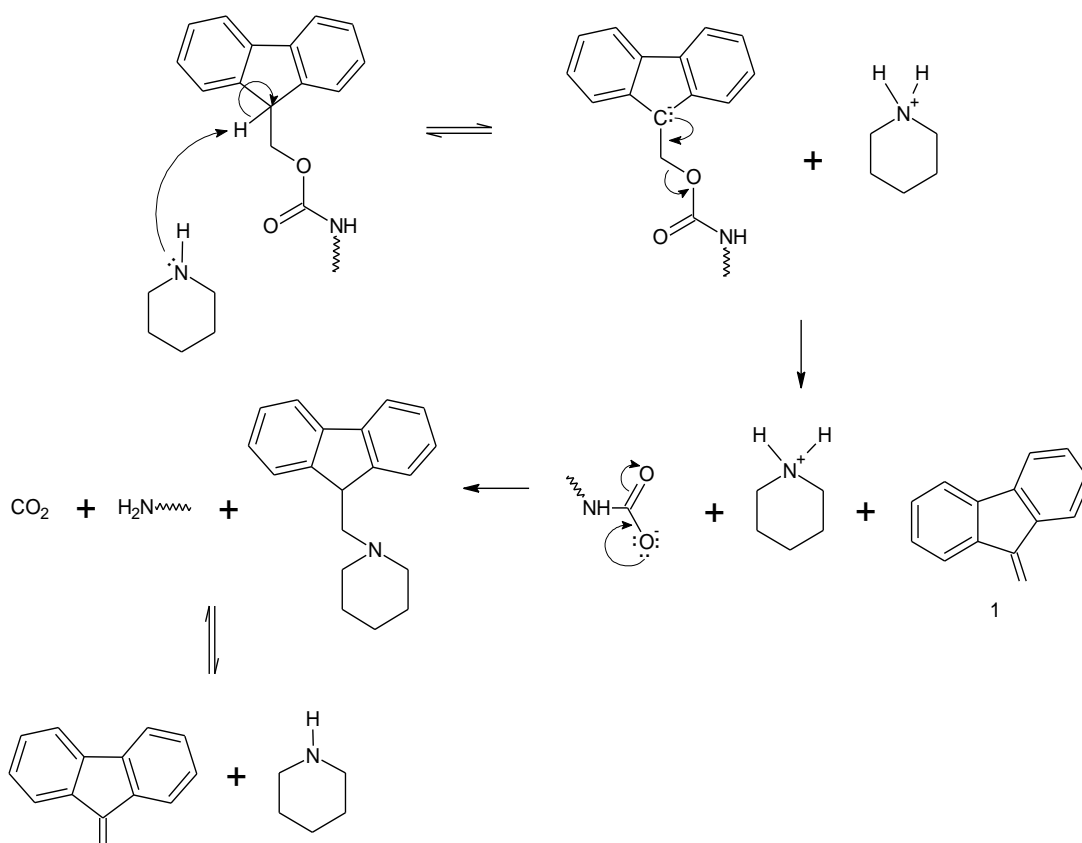


Figura 14: Mecanismo de remoção do grupo amino protetor Fmoc. Extraído de Chan & White, 2000.

Ainda que a desproteção com piperidina seja efetiva na maioria dos casos, a literatura mostra que, para cadeias peptídicas longas, pode ocorrer uma desproteção incompleta do grupo Fmoc, até mesmo na presença de concentrações elevadas de piperidina. Nesses casos é aconselhável o aumento no tempo usado para desproteção e, apesar de menos efetivo, pode ser usado uma base mais forte como 1,8-diazobicyclo [5,4,0]undec-7-eno (DBU) (Srivastava *et al.*, 2009) ou ainda outras alternativas, como a descrita por Maegawa (2009), onde o grupo Fmoc pode ser removido sob condições neutras de hidrogenação utilizando acetonitrila para acelerar o processo (Maegawa *et al.*, 2009).

A etapa de clivagem é a última de todo o processo de obtenção de um peptídeo. A reação ocorre em meio ácido, sendo amplamente empregado 90 a 95% de ácido trifluoroacético (TFA) para remoção simultânea do peptídeo da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais (Urban *et al.*, 1996). Nessas condições, os grupos protetores das cadeias laterais produzem carbocátions relativamente estáveis, que podem reagir com outras cadeias laterais ricas em elétrons de aminoácido como cisteína (Cys), metionina (Met), tirosina (Tyr), treonina (Thr), serina (Ser) e triptofano (Trp), levando a subprodutos não desejados (Chan & White,

2000; King *et al.*, 1990). A fim de minimizar esse efeito, são adicionados reagentes capazes de estabilizar os carbocátions na mistura de clivagem. Numerosas formulações de clivagem vêm sendo otimizadas para sequências particulares. Muitas destas soluções têm sido preparadas à base de derivados de silanos, que além de apresentarem bons resultados, possuem odor menos desagradável do que aqueles baseados em tióis (Pearson *et al.*, 1989).

Apesar de outros métodos descritos não envolverem o uso do TFA na clivagem (Palladino *et al.*, 2012), este reagente é muito interessante para a síntese de peptídeos, podendo ser usado como padrão em muitos laboratórios e, por ser facilmente volatilizado, é removido por evaporação simples. De fato, tal característica torna os procedimentos da reação de clivagem simples, não exigindo uma instrumentação especial como ocorre na estratégia Boc (Merrifield), na qual se utiliza o fluoreto de hidrogênio (Chan & White, 2000). Além disso, o uso de ácidos mais fracos, como o TFA, aumenta a facilidade com a qual o método pode ser adaptado para a síntese de muitos peptídeos, razão pela qual a estratégia Fmoc/*t*Bu tem ganhado muita popularidade em laboratórios de pesquisa.

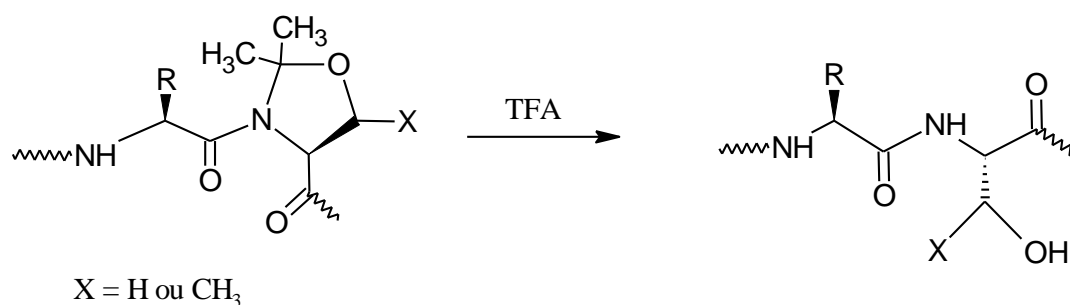
Nas últimas décadas, os grupos protetores, os ligantes e as estratégias de clivagem sofreram significativas melhoras graças aos inúmeros esforços por parte dos pesquisadores (Hermkens *et al.*, 1996; Kimmerlin *et al.*, 2005). No entanto, existem algumas desvantagens que estão relacionados com reações incompletas, provavelmente causadas por fatores como agregação, epimerização e algumas reações paralelas. Estes são as principais causas de falhas na síntese em fase sólida e, inevitavelmente, diminuem o rendimento final da síntese (Chan & White, 2000).

Quando as reações de desproteção do grupo amino  $\alpha$  e de acoplamento dos aminoácidos não se completam, essas etapas são repetidas ou mantidas sob reação por tempo prolongado, o que causa, provavelmente, o aparecimento de problemas relacionados à agregação (Howl, 2005). Normalmente, esse efeito é resultado da auto-associação ou formação de agregados entre as cadeias peptídicas, ou mesmo com a própria resina. A ocorrência desta associação intra e intercadeias podem estar relacionadas com ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas (Hyde *et al.*, 1994; Krchňák *et al.*, 1993). Dessa forma, há uma solvatação incompleta da peptidil-resina e encolhimento súbito da matriz, redução da penetração do solvente e, conseqüentemente, inacessibilidade dos reagentes ao grupo amino

*N*-terminal, o que diminui as taxas reacionais, promovendo baixo rendimento nos acoplamentos (Chan & White, 2000).

A tendência de agregação pode ocorrer a partir do quinto resíduo acoplado e é intensificada pela presença de proporções elevadas de resíduos hidrofóbicos como alanina (Ala), valina (Val) e isoleucina (Ile) (Mergler & Dick, 2005) além de outros resíduos como a asparagina (Asn) e a glutamina (Gln) (Bedford *et al.*, 1992; Coin *et al.*, 2007). Para sequências de peptídeos acima de 50 resíduos de aminoácidos, a síntese se torna inviável devido à grande ocorrência de agregação entre as cadeias peptídicas, e, conseqüentemente, à acumulação de subprodutos no sistema. Por essas e outras razões, técnicas de combinação de síntese em fase sólida e em solução vêm sendo empregadas para obtenção de cadeias peptídicas mais longas (Amblard *et al.*, 2005, 2006; Mutter *et al.*, 1995).

Existem várias formas para tentar impedir a formação da estrutura secundária e contornar o problema da agregação durante a síntese. A primeira envolve a mudança do ambiente através da adição, ao meio reacional, de sal caotrópico (tiocianato de potássio ou cloreto de lítio), detergentes, como o Triton<sup>®</sup> X, e solventes como o DMSO ou o hexafluoroisopropanol (Hyde *et al.*, 1992; Milton *et al.*, 1990a; Milton *et al.*, 1990b). A segunda envolve mudanças estruturais na cadeia peptídica por meio de três estratégias diferentes: (i) através da inserção de resíduos de prolina ou de aminoácidos *N*-alquílicos na sequência, o que dificulta a formação das folhas  $\beta$  e de outras estruturas secundárias (Büchel & Goodman, 2003), (ii) através da introdução de grupos protetores à ligação amídica selecionada, como o 2-hidroxi-4-metoxibenzila (Hmb), que é um derivado da glicina; ou ainda, (iii) envolvendo a conversão reversível de resíduos de serina ou treonina em um resíduo de pseudoprolina, via a formação de um dipeptídeo oxazolidínico (Abedini *et al.*, 2005; Dumy *et al.*, 1997; Mutter *et al.*, 1995). A pseudoprolina é introduzida como uma unidade de dipeptídeo, superando os problemas normalmente associados com acilação de aminoácidos secundários. Como a unidade de pseudoprolina é estável em solução de AcOH/TFE/DCM, peptídeos preparados em resinas extremamente ácido-lábeis, como cloreto de 2-clorotritila, podem ser isolados com a pseudoprolina. A vantagem da preparação destes peptídeos contendo unidades de pseudoprolinas está relacionada às frequentes melhorias nas solubilidades de seus análogos (Wöhr *et al.*, 1996). Os resíduos de treonina (Thr) ou serina (Ser) de oxazolidina podem ser regenerados pelo tratamento com TFA (Figura 15, p.29).



**Figura 15: Abertura do anel de peptídeo de oxazolidina.** Extraído e adaptado de Wöhr *et al.*, 1996.

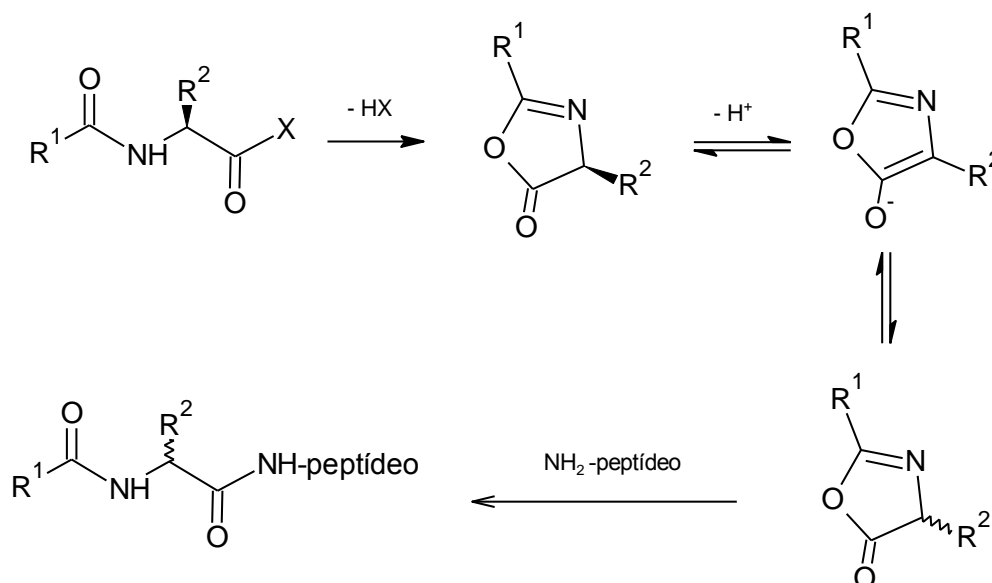
Vários estudos têm mostrado que a irradiação de microondas também é uma ferramenta vantajosa na química de peptídeos (Pedersen *et al.*, 2010; Pedersen *et al.*, 2012). Nesses casos, a temperatura é elevada de forma rápida e precisa, sendo controlada de forma eficiente durante a síntese. Em um reator de microondas, as cadeias peptídicas, através de seus momentos dipolares, interagem com as ondas eletromagnéticas passando por uma agitação molecular intensa (com a frequência das microondas) (Tierney *et al.*, 2009). Nesta reação, a energia fornecida ao sistema (em torno de 0,0016 eV) é grande o suficiente para quebrar as interações inter e intramoleculares causadoras de efeitos de agregação, diminuindo o tempo reacional e aumentando a eficiência no acoplamento de aminoácidos volumosos e  $\beta$  folhados, além de ajudar na desproteção da amina  $\alpha$  de peptidil-polímeros impedidos estericamente (Kappe, 2004).

Manter a integridade estereoquímica de peptídeos durante a síntese é de extrema importância, uma vez que as propriedades biológicas dessas biomoléculas são criticamente dependentes da configuração dos centros quirais (Berg *et al.*, 2006; Metzler, 2000). Dos 20 aminoácidos comuns encontrados nas proteínas, com exceção da prolina, todos têm um centro quiral de configuração *L* nos carbonos  $\alpha$ , e dois, Ile e Thr, também tem um centro quiral em suas cadeias laterais.

Em todos os 19 aminoácidos opticamente ativos, um dos substituintes do carbono  $\alpha$  é o hidrogênio, que é potencialmente ácido. A remoção e a subsequente reposição desse próton durante as etapas de síntese representam um potencial mecanismo para a enantiomerização do centro quiral. A etapa de acoplamento, normalmente coloca a integridade quiral do aminoácido em risco, uma vez que a acidez do próton é aumentada quando o grupo carboxila é ativado (Colombo *et al.*, 1984).

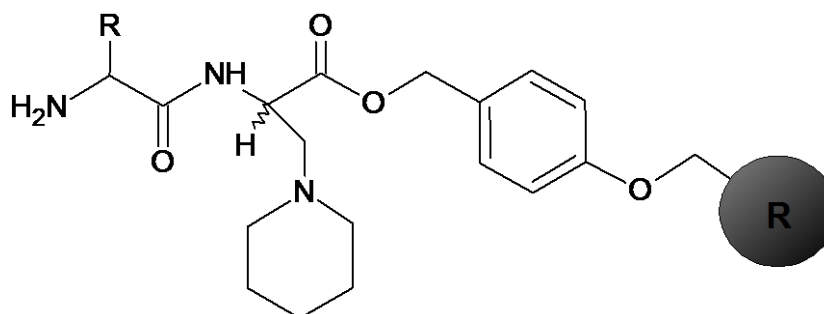


Outro mecanismo relacionado à epimerização envolve a desprotonação e abertura do anel de um intermediário de oxazolona, que é gerado pelo ataque no grupo carboxila ativado da ligação peptídica adjacente (Figura 16). Na prática, epimerização via formação de oxazolona está principalmente associada à condensação dos fragmentos, envolvendo, inevitavelmente, a ativação do grupo carboxila dos fragmentos peptídicos (Goodman *et al.*, 1964).



**Figura 16: Epimerização via oxazolona.**

Quando peptídeos contendo resíduos de cisteína (Cys) são sintetizados em resinas à base de hidroximetila, durante o acoplamento ou durante a remoção do grupo Fmoc por piperidina, o resíduo 3-(1-piperidinil)-alanina (Figura 17, p. 31) pode ser formado no grupo C-terminal. Neste caso, o resíduo Cys é ancorado à resina via ligação éster, sofrendo posteriormente, o mecanismo do tipo eliminação  $\beta$  (Ni *et al.*, 2010). Utilizando o *N*-Fmoc-4-hidrazino-ácido benzóico ancorado à resina, esse tipo de enantiomerização é minimizado. Por outro lado, com o resíduo de His, a proximidade dos elétrons  $\pi$  do nitrogênio básico da cadeia lateral imidazólica em relação ao hidrogênio  $\alpha$ , influencia na enantiomerização do derivado ativado deste resíduo (Chan & White, 2000).

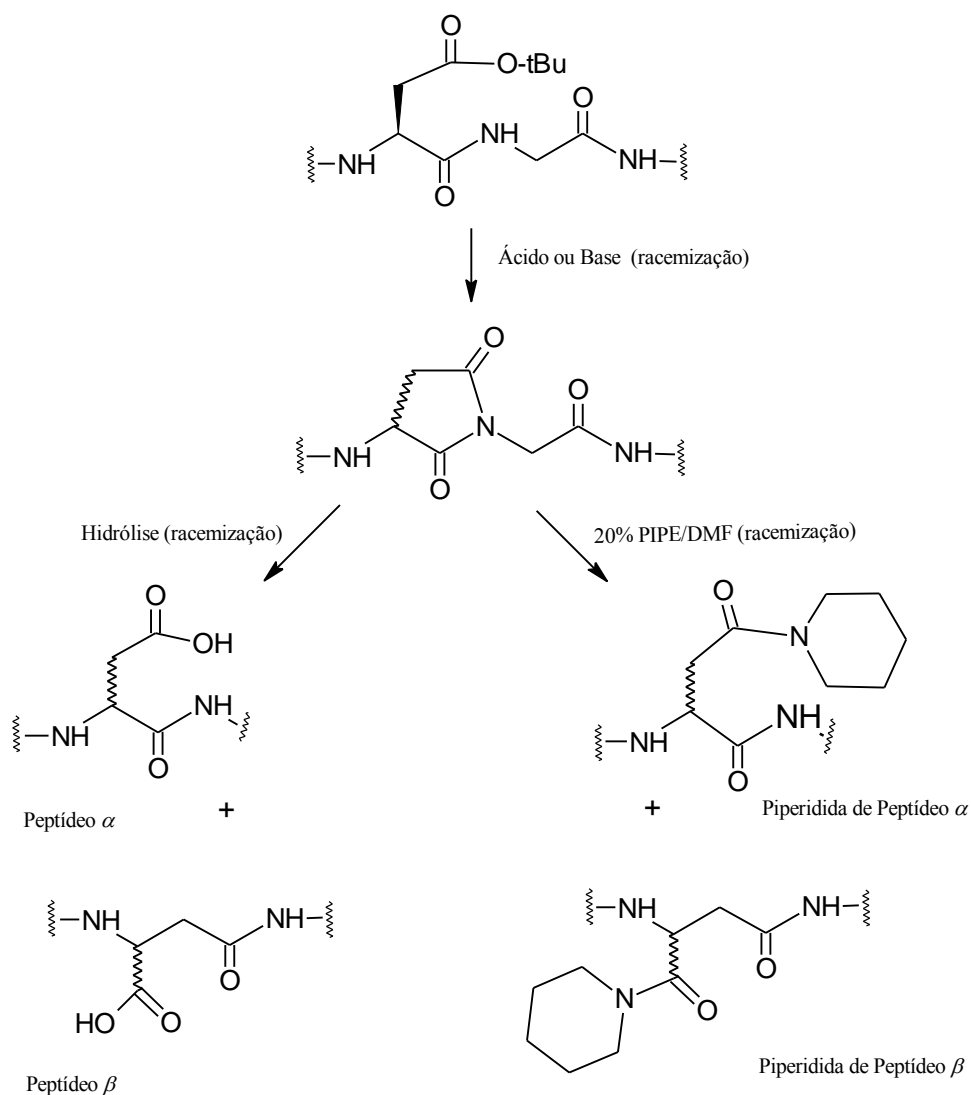


**Figura 17: Resíduo de 3-(1-piperidinil)-alanina.** Extraído de Ni *et al.* 2010.

Dependendo do tipo de resíduo e da sequência que se deseja, reações paralelas podem ocorrer na montagem da cadeia (Benoiton, 2006).

A formação de aspartimida requer especial atenção por ser a mais provável nas sínteses de rotina (Mergler *et al.*, 2005; Mergler *et al.*, 2003a; Mergler *et al.*, 2003b; Ruczyński *et al.*, 2008). A reação envolve o ataque do nitrogênio amídico do resíduo anterior à carbonila do ácido aspártico ou da asparagina, à cadeia lateral éster ou grupo amida, respectivamente, resultando na formação de uma imida de cinco membros (Figura 18, p.32). Esta reação é altamente dependente da estrutura primária, mas ocorre com maior frequência em peptídeos contendo Asn(Trt), Gly, Ser e Thr ligado a Asp(OtBu)-. Uma solução mais efetiva para esse problema seria adicionar HOBt à solução de PIPE ou mesmo proteger, temporariamente, o nitrogênio do resíduo precedente aos resíduos de Asp ou Asn, que é mais facilmente alcançado, com um grupo Hmb (Cardona *et al.*, 2008), que é removido na etapa de clivagem realizada com TFA.

Outra importante reação secundária está relacionada à formação da dicetopiperazina (DKP) ocorrendo na porção C-terminal desprotegido por clivagem intramolecular entre o éster ligante e a amina livre do penúltimo amino ácido ligado ao C-terminal sob condições básicas, formando um ciclo de seis membros (Figura 19, p.33). Peptídeos contendo prolina ou glicina na sequência dipeptídica C-terminal são especialmente sensíveis à formação da DKP. Em alguns casos, resinas baseadas em ligantes bloqueados com grupos tritil devem ser usadas para evitar sua formação e, conseqüentemente, evitar a perda do dipeptídeo C-terminal da resina (Howl, 2005).



**Figura 18: Formação da aspartimida e outros produtos.** Extraído de Mergler *et al.* 2003b.

Por fim, recentes conceitos e avanços nas estratégias de síntese química de peptídeos têm sido descritos na literatura com o intuito de tentar contornar a maioria desses problemas descritos na SPFS (Monbaliu *et al.*, 2012). Em um desses estudos, Castro e colaboradores descreveram o desenvolvimento de ligantes que, ao serem submetidos ao meio ácido do processo de clivagem, evitam a formação de muitas reações paralelas descritas anteriormente, as quais são grandes responsáveis pelo acúmulo de subprodutos ao final da síntese (Castro *et al.*, 2012).

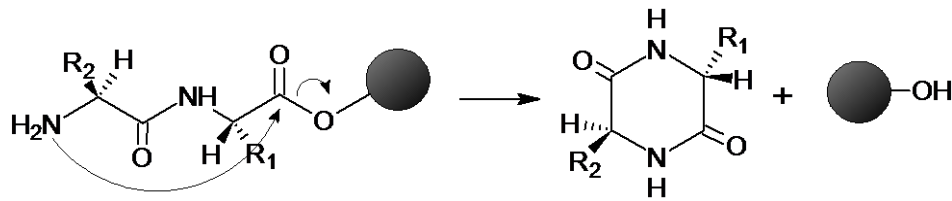


Figura 19: Formação de DKP. Howl, 2005

### 2.3.2 Ligações de Dissulfeto em Peptídeos Antimicrobianos

Ligações covalentes entre grupos funcionais de cadeias laterais de aminoácidos são muito comuns em peptídeos e proteínas para a manutenção da integridade estrutural dessas biomoléculas, especialmente quando essas ligações envolvem resíduos de cisteína (Cys).

A ligação de dissulfeto ocorre entre dois grupamentos tióis (R-SH) das cadeias laterais de cisteínas distintas, que se ligam covalentemente resultando em um resíduo de cistina (R-S-S-R'), como ilustrado na Figura 20 (Sewald & Jakubke, 2002).

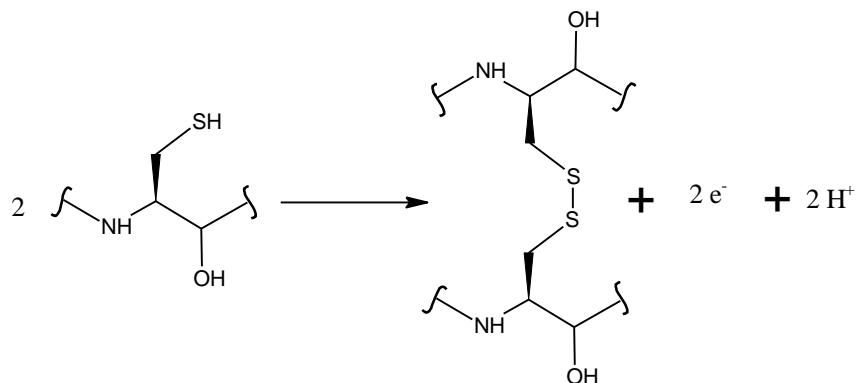
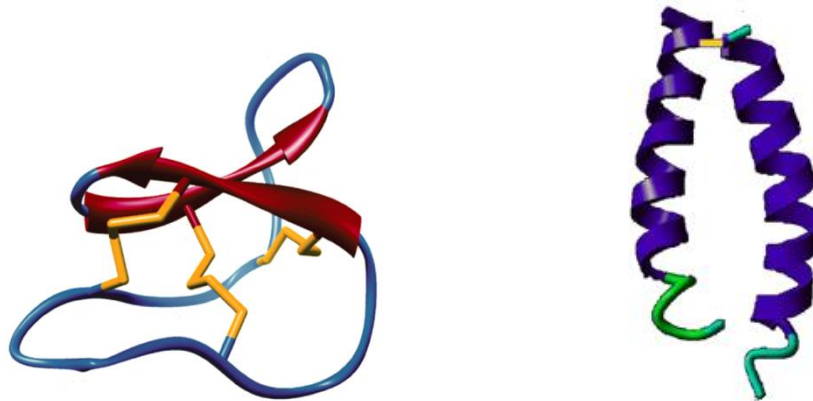


Figura 20: Formação de ligação de dissulfeto entre dois resíduos de cisteínas.

As ligações de dissulfeto podem ser intramoleculares, como ocorre em ciclotídeos, como a kalabata B1, onde ligações de dissulfeto se formam entre resíduos de Cys de uma mesma cadeia peptídica (Gerlach *et al.*, 2010). Ligações de dissulfeto intermoleculares podem levar a peptídeos diméricos, como no caso do homodímero homotarsinina (Verly, 2010) (Figura 21, p. 34).



**Figura 21:** Ciclotídeo kalabata B1 (PDB 1NB1) e o homodímero homotarsinina (Verly, 2010).

Essas ligações ocorrem espontaneamente em condições suaves, que permitem grupos tióis da cadeia lateral de cisteína ficarem próximos para serem oxidados por  $O_2$  ou outro reagente. Entre os métodos convencionais para a formação de ligação de dissulfeto, a oxidação utilizando  $O_2$  do ar atmosférico em meio aquoso é a mais comumente utilizada (Dalla Serra *et al.*, 2008; Mullen *et al.*, 2012; Raimondo *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 1991).

Alguns estudos demonstram que a formação de ligação de dissulfeto entre duas cadeias monoméricas ocorre naturalmente como uma modificação endógena e pós-traducional específica. Entre as modificações pós-traducionais, que são características para peptídeos provenientes da pele de anfíbios, as ligações de dissulfeto não são características incomuns. No entanto, muitas das cistinas em peptídeos de anuros são intra-cadeia. Inter-cadeias, entretanto, são bastante raras em peptídeos de pele de anfíbios (Evaristo *et al.*, 2012).

A distinctina é encontrada na pele do anfíbio na sua forma dimerizada e é um exemplo raro de dímero isolado *in vivo*. A sua dimerização *in vitro* ocorre facilmente em meio tamponado, o que pode ser devido a um reconhecimento estrutural entre as cadeias do heterodímero, que interagem entre si e favorecem a formação da ligação de dissulfeto (Dalla Serra *et al.*, 2008; Mullen *et al.*, 2012; Raimondo *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2009; Simonetti *et al.*, 2012). A presença dessa ligação é essencial para dar características excepcionais à distinctina. Como citado anteriormente (seção 2.2.2.4), o arranjo tridimensional adquirido por ela em meio aquoso pode explicar, por exemplo, sua elevada resistência à peptidases (Dalla Serra *et al.*, 2008; Raimondo *et al.*, 2005).

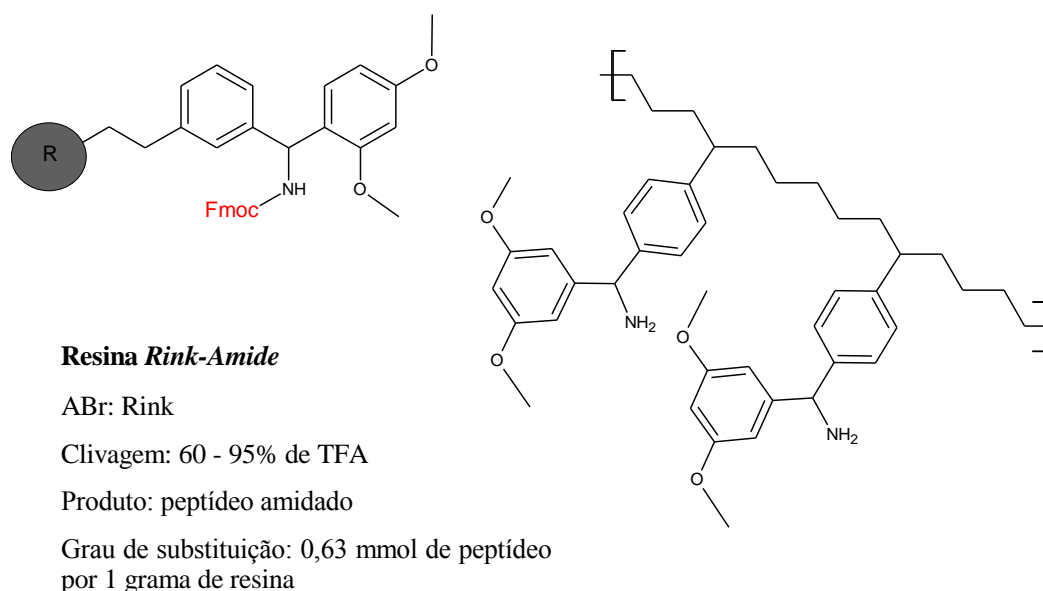
Em virtude da raridade das ligações de dissulfeto em pele de anfíbios, poucos trabalhos foram publicados abordando o isolamento ou a síntese de dímeros e alguns raros

estudos estão relacionados à cinética de reações de dimerização (Verly, 2010). Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de sintetizar e estudar os efeitos que influenciam na cinética de dimerização de um dos raros homodímeros encontrado e isolado da natureza, a homotarsinina (Htr).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese do Peptídeo Htr-M

Os peptídeos Htr-M e [ $S^{23}$ ]Htr-M foram sintetizados manualmente, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida, via estratégia Fmoc (Chan & White, 2000). Foi empregada como suporte sólido a resina *Rink-Amide* fornecida pela *Iris Biotech* (Marktredwitz, Alemanha) (Figura 22), com grau de substituição  $0,63 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  e que fornece, como produto final, os peptídeos amidados no grupamento C-terminal.



**Figura 22: Suporte sólido utilizado para a síntese do peptídeo Htr-M.**

Os derivados de aminoácidos utilizados na síntese foram: Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(*t*bu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(*O**t*bu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(*O**t*bu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH. Todos os derivados de aminoácidos foram obtidos da *Iris Biotech* (Marktredwitz, Alemanha). As pesagens foram feitas em balança analítica Marte<sup>®</sup> AY220 com precisão de 0,0010 g.

As lavagens da resina após as etapas de acoplamento e desproteção, foram realizadas por três vezes alternadas com *N,N*-dimetilformamida (DMF) e 2-propanol (IPA), seguidas por uma lavagem final com diclorometano (DCM).

Durante as etapas de acoplamento foram empregados como agentes ativadores do grupo carboxila a diisopropilcarbodiimida (DIC) e a 1-hidroxibenzotriazola (HOBt), sendo utilizados DMF e DCM como solventes. A *N,N'*-dimetilformamida (DMF) empregada nas etapas de acoplamento foi destilada previamente a pressão reduzida (70°C), seguida por outra destilação fracionada (110°C). Nas etapas de remoção do grupo Fmoc foram empregadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (20% v/v). O acompanhamento da síntese foi realizado após cada etapa de acoplamento e desproteção empregando-se o teste de *Kaiser*, também conhecido como teste de ninidrina (Figura 23, p.38). Esse teste é qualitativo e o resultado indica a presença de grupo amino livre. A Figura 23 apresenta um esquema da reação que ocorre entre a ninidrina e o grupo amino livre de um resíduo de aminoácido. Para esse teste foram utilizadas soluções de 2% (v/v) de solução aquosa de KCN a 1 mmol·L<sup>-1</sup> em piridina, fenol a 80% (m/v) em etanol e ninidrina a 5% (m/v) em piridina, nas proporções 1:2:1 (v:v:v) e, nesta ordem, respectivamente (Troll *et al.*, 1953).

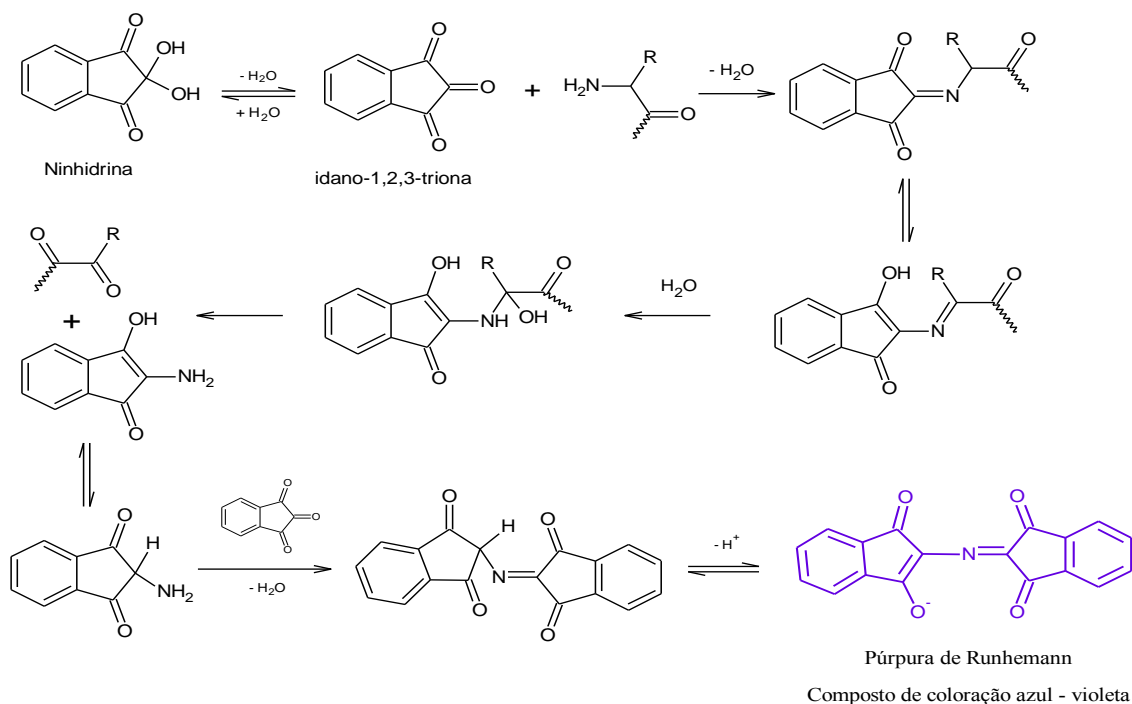
### 3.1.1 Preparação da Resina para a SPFS

Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido ao suporte polimérico, a resina foi previamente preparada segundo o protocolo apresentado no Quadro 1. Foi pesada uma quantidade suficiente de resina para a obtenção de 250 mg de peptídeo bruto.

1. Colocar a resina em um frasco para síntese de peptídeo;
2. Adicionar uma quantidade de DCM suficiente para cobrir a resina ( $\approx 5$  mL) no frasco;
3. Deixar a resina em DCM por cerca de 10 minutos;
4. Remover o DCM por filtração;
5. Repetir o processo por três vezes.

**Quadro 1: Protocolo para preparação da resina suporte da SPFS.**





**Figura 23:** Reação da ninidrina para identificação de grupamento amino livre.

A resina *Rink-amide* precisou ser previamente desprotegida para remoção do grupo Fmoc. Esse procedimento foi realizado empregando solução de 4-metilpiperidina (PIPE) em DMF 20% v/v, conforme descrito no Quadro 2.

1. Adicionar ao frasco de reação aproximadamente 2,5 mL de solução 25% (v/v) de PIPE em DMF.
2. Em seguida, submeter o sistema à agitação por 5 min.
3. Remover a solução de PIPE do frasco de reação, por filtração.
4. Repetir as etapas 1, 2 e 3 duas vezes, com tempo de agitação de 10 min.
5. Lavar a resina conforme protocolo apresentado no Quadro 3.
6. Fazer o acompanhamento da desproteção com o teste de Kaiser.

**Quadro 2:** Protocolo para remoção do grupo Fmoc.

1. Preencher o recipiente com DMF e, após 10 segundos, removê-lo por filtração.
2. Repetir a etapa 1, porém com IPA.
3. Repetir as etapas 1 e 2 mais duas vezes.
4. Encerrar o processo com uma última lavagem com DCM.

**Quadro 3: Protocolo para lavagem da resina após a etapa de desproteção.**

### 3.1.2 Etapa de Acoplamento

A etapa de acoplamento consiste na formação de uma ligação amídica e conseqüente introdução de um novo resíduo de aminoácido ao peptídeo. Para isto, empregou-se a formação de ésteres ativos a partir dos derivados de aminoácidos. Os acoplamentos foram então conduzidos utilizando-se o respectivo derivado de aminoácido e DIC e HOBt como ativadores nas proporções apresentadas no Quadro 4. O tempo médio de reação foi de 2,5 h e foram utilizados como solventes DMF ou uma mistura de DMF e DCM (1:1, v/v).

3 eq Fmoc-Aminoácido

3 eq HOBt

3 eq DIC

Solvente – 3 mL DMF ou DMF/DCM 1:1 (v:v)

**Quadro 4: Relação entre os reagentes para a etapa de acoplamento.**

Ao final dessa etapa, a solução contendo os ativadores foi removida por filtração. Em seguida, repetiu-se o procedimento descrito no Quadro 3 (p. 40) para lavagem da resina e realizou-se o teste de *Kaiser* para acompanhamento da reação. Em caso de resultado do teste negativo, segue-se para etapa de desproteção e, em seguida, para a etapa de acoplamento do próximo resíduo de Fmoc-aminoácido.

### 3.1.3 Etapa de Desproteção

Como todos os derivados de aminoácidos possuem os grupos  $\alpha$  amino devidamente protegidos com Fmoc, após cada adição de um novo derivado de aminoácido da sequência primária, o peptídeo se encontra novamente protegido no grupamento *N*-terminal. Para a remoção do grupo Fmoc, repetiu-se o procedimento descrito no Quadro 2 (p. 39).

### 3.1.4 Reação de Clivagem do Peptídeo da Resina

As reações de clivagem seguiram o protocolo apresentado no Quadro 5, com o emprego do ácido trifluoracético (TFA) para a remoção simultânea do peptídeo da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais.

1. Transferir a resina seca para um tubo de polipropileno de 50 mL onde é adicionada a solução de TFA apropriada (10 – 25 mL/g de resina). Em seguida, submeter a mistura à agitação mecânica vigorosa a temperatura ambiente.
2. Remover a resina por filtração e lavar com TFA.
3. Remover o TFA do filtrado por aplicação de nitrogênio gasoso e, então, adicionar cerca de 3 mL de éter diisopropílico previamente resfriado em nitrogênio líquido, para precipitar o peptídeo.
4. Remover o éter rapidamente após centrifugação.
5. Repetir as etapas 3 e 4 mais quatro vezes.
6. Liofilizar o peptídeo ao final.

#### Quadro 5: Protocolo de clivagem do peptídeo da resina.

No entanto, a escolha da solução de clivagem e o tempo de reação dependem, além da natureza química da resina, da sequência peptídica, uma vez que grupos protetores de cadeias laterais diferentes requerem nucleófilos, para a neutralização dos carbocátions gerados, e tempos de reação distintos para sua remoção completa (Chan & White, 2000). Assim sendo, as soluções de clivagem para os peptídeos sintetizados, segundo suas sequências primárias,

foram estabelecida previamente em 95% de TFA, 2% de água, 2% EDT e 1% de TIS, para Htr-M e 97,5% de TFA, 2,5% de água e 1% de TIS para  $[S^{23}]$ Htr-M, ambas com tempo de reação de 3 horas.

### 3.2 Síntese do Peptídeo Homodimérico Htr

A síntese do peptídeo dimérico Htr foi realizada através da formação da ligação de dissulfeto entre duas cadeias lineares da Htr-M através da oxidação dos grupos sulfidríla, na presença de oxigênio molecular e à temperatura ambiente. Esta reação foi conduzida sob agitação constante (100 rpm) em três meios distintos: (i) solução tampão de Tris-HCl a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ajustando-se o pH com solução de NaOH a  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  para 8,5; (ii) solução de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 v/v) em tampão Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5; e (iii) solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a  $350 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  em tampão Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5. Foi empregada uma concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Htr-M purificado ( $36 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Durante as reações foram realizados acompanhamentos da formação do dímero conforme descrito a seguir.

#### 3.2.1 Acompanhamento da Reação de Obtenção de Htr

O acompanhamento da reação de dimerização foi conduzido por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), utilizando gradientes de dois eluentes diferentes: água ultrapurificada acidulada com 0,1% em volume de TFA (fase A) e acetonitrila grau UV/HPLC em TFA 0,08% (fase B). A detecção foi realizada na região do ultravioleta (UV) no comprimento de onda referente à absorção do grupo amido ( $\lambda_{\text{máx}}$  210-215 nm). Para o acompanhamento da reação foi empregada escala analítica (20  $\mu\text{L}$  de solução  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de peptídeo e fluxo de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). As alíquotas para injeção no cromatógrafo foram retiradas diretamente das reações em diferentes intervalos de tempos.

### 3.3 Purificação dos Peptídeos por CLAE-FR

A CLAE-FR foi empregada também para purificação dos peptídeos Htr-M e  $[S^{23}]$ Htr-M. Foram utilizados gradientes de dois eluentes: água ultrapurificada acidulada com 0,1% de TFA (fase A) e acetonitrila grau UV/HPLC em TFA 0,08% (fase B). Para a detecção,

empregou-se detector de ultravioleta (UV), sendo utilizado  $\lambda_{\text{máx}}$  de 215 nm (210 - 215 nm - faixa de absorção do grupamento amido). A purificação foi conduzida em escala semi-preparativa (3 mg de amostra bruta e fluxo de 2,5 mL·min<sup>-1</sup>). A escala analítica foi usada para a definição das condições da escala semi-preparativa e análise subsequente das frações obtidas durante as purificações. Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente.

Na CLAE-FR foram utilizados dois cromatógrafos: (i) *Varian* modelo *Pro Star* 315 com detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star* 335, válvula de injeção marca *Rheodyne*, do Departamento de Química da FACET da UFVJM. Foram utilizadas as seguintes colunas: analítica *Vydac* C18 (250 x 4,6 mm), semi-preparativa *Varian Pursuit* 5 C18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m) e *loops* de 20  $\mu$ L e 1 mL, respectivamente. A água ultra-purificada foi obtida em aparelho da marca *GEHAKA* modelo *Master Systems P&D*, do Departamento de Química da FACET da UFVJM; e (ii) *Varian* modelo *Pro Star* 210 com detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star* 330, válvula de injeção marca *Rheodyne*, do Departamento de Química do ICEx da UFMG. Foram utilizadas as seguintes colunas: analítica *Vydac* C18 (250 x 4,6 mm), semi-preparativa *Vydac* C-18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m) e *loops* de 5  $\mu$ L, 250  $\mu$ L, respectivamente. A água deionizada foi obtida em aparelho da marca *Millipore* modelo *QPAK*<sup>®</sup>, do Departamento de Química do ICEx da UFMG.

### 3.4 Secagem das Amostras

As frações obtidas da purificação de cada peptídeo foram coletadas em tubos de polipropileno de 15 ou 50 mL e liofilizadas em aparelho *Terroni*<sup>®</sup> modelo LS 3000 do Departamento de Farmácia da FCBS da UFVJM e aparelho *Thermo Electron* modelo *Modulyod Freeze Dryer* do Departamento de Química do ICEx da UFMG.

### 3.5 Análise por Espectrometria de Massas (MS) e Sequenciamento *De Novo*

Alíquotas das frações obtidas da purificação cromatográfica foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-ToF/ToF no modo MS e foram realizadas em instrumentos *AutoFlex III* ou *Ultraflex III* (*Bruker Daltonics*) do Instituto de Ciências Biológicas – ICB da UFMG, equipado com *Laser Smart beam*<sup>TM</sup> operado em modo positivo e controlados pelo *software FlexControl 3.0* (*Bruker Daltonics*). As alíquotas foram misturadas em uma solução supersaturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) - 1:1, v/v -

diretamente em placas *MTP AnchorChip* 400/384 ou 800/384 (*Bruker Daltonics*) e secadas a temperatura ambiente. Para a determinação da massa monoisotópica na faixa de 800 a 5000 Da foi utilizado o modo refletido com calibração externa, empregando-se o padrão de calibração de peptídeos indicado pelo fabricante (*Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics*). Para visualização dos resultados foi utilizado o *software* FlexAnalysis 3.0 (*Bruker Daltonics*). Também foi feita a fragmentação dos íons precursores utilizando o modo MS/MS (espectrometria de massas sequencial) e os espectros foram processados no *software* FlexAnalysis 3.0. A estrutura primária do peptídeo foi interpretada manualmente por sequenciamento *de novo* dos espectros obtidos nas análises de MS/MS. Os espectros foram visualizados utilizando-se os *softwares* FlexAnalysis 3.0 e PepSeq (Garrett *et al.*, 1995).

As alíquotas das amostras purificadas de Htr foram encaminhadas para serem analisadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia. O equipamento utilizado foi o *Bruker Autoflex Speed* (*Bruker Daltonics, Billerica, EUA*). Os espectros foram obtidos no modo MS e a faixa de massa utilizada para as amostras de Htr foi de 800 a 6000. Para a preparação da solução da matriz, foram pesados 5,0 mg de CHCA e transferidos para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. O sólido foi dissolvido em 250  $\mu\text{L}$  de ACN, 200  $\mu\text{L}$  de água tipo I (ultrapura) e 50  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de TFA a 3% (em volume). Portanto uma solução de CHCA a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi preparada. Para aplicação na placa, 1  $\mu\text{L}$  da solução de peptídeo foi misturado a 3  $\mu\text{L}$  da solução de matriz. Após secar à temperatura ambiente, a placa foi inserida no equipamento para análise.

### 3.6 Estudo conformacional por Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos, utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-815 do Instituto de Ciências Biológicas – ICB - UFMG. Foi preparado 1 mL de solução estoque 300  $\mu\text{M}$  do peptídeo [ $\text{S}^{23}$ ]Htr-M e alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  foram adicionadas a 220  $\mu\text{L}$  de diferentes concentrações de TFE, SDS, tampões Tris-HCl pH 8,5 e fosfato pH 5,8. A concentração final do peptídeo nas amostras para análise de CD foi de 22  $\mu\text{M}$ . As amostras foram transferidas para uma cubeta com caminho ótico de 1 mm e os espectros foram obtidos a 20°C entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, utilizando-se os seguintes parâmetros de aquisição: velocidade de varredura de  $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , coleta de dados 0,2 nm, 1s de resposta, 1 nm de largura de banda e 8 acumulações. Depois de

registrados, os espectros das amostras contendo peptídeo foram subtraídos dos espectros dos respectivos brancos para correção da linha de base.

Os espectros foram editados no programa *SpectraAnalysis* da plataforma *Spectra Manager* e as deconvoluções de todos os experimentos foram feitas no programa CDPro para obtenção do percentual de estruturas secundárias em cada meio.

### **3.7 Ensaios de Citotoxicidade de Htr-M e Htr**

#### **3.7.1 Ensaios de Toxicidade a Leucócitos Mononucleares**

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de 10 mL de sangue periférico venoso de cinco indivíduos saudáveis, depois de centrifugado em *Histopaque 1077* (Sigma, St. Louis, MO, USA), conforme descrito por Bicalho *et al.* (1981). O anel de PBMC, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) (200 g, 4°C, 10 min). O precipitado de células foi em seguida ressuspenso em 1 mL de RPMI (Sigma, St. Louis, MO, USA). Após contagem das células em câmara de Neubauer, a concentração da suspensão celular foi mantida em  $1 \times 10^7$  células·mL<sup>-1</sup>.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pela exclusão com azul de Tripan e pela técnica de incorporação com iodeto de propídeo a fim de verificar se Htr-M e Htr seriam tóxicos às células após 24 horas de cultura. A avaliação da presença de azul de Tripan no interior da célula é realizada por microscopia ótica e do iodeto de propídeo por citometria de fluxo (Tabera, 2008; Kim *et al.*, 2011).

Para a realização deste teste, um volume de 50 µL de suspensão celular (cerca de  $5 \times 10^4$  células) (n = 5) foi incubado em meio denominado RPMI completo que contém: RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido de L-glutamina (2 mmol·L<sup>-1</sup>), soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) (10%) e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100UI·mL<sup>-1</sup>, estreptomicina 100µg·mL<sup>-1</sup> e anfotericina B 250 ng·mL<sup>-1</sup> - Sigma, St. Louis, MO, USA). Foi acrescido a esse meio PBS solução salina (controle), cloreto de cádmio 20 mmol·L<sup>-1</sup> (controle de morte), Htr-M e Htr, ambos nas concentrações 4, 10 e 20 µg·mL<sup>-1</sup>. Cada cultura foi realizada em tubos de polipropileno em duplicata e cada replicata foi reservada para análise em 24 h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e

95% de umidade. Após o período de incubação as células foram removidas por lavagem com 2 mL de PBS, transferidas para tubo de fundo redondo 5 mL e centrifugadas (200 g, 4° C, 10 min). As células foram ressuspensas em 50 µL de solução salina. 10 µL das suspensões celulares foram incubados com 190 µL de azul de Tripán 0,4% para contagem na câmara de *Neubauer*. A avaliação com iodeto de propídeo foi realizada incorporando 10 µL da suspensão celular com 1 µL de iodeto de propídeo (50 µg·mL<sup>-1</sup>) e avaliado por citometria de fluxo (FACScan® - Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). A viabilidade celular foi determinada pelo percentual de células viáveis (não coradas) no universo de células totais.

A análise estatística utilizada foi de variância unifatorial (*ANOVA*) seguida de *Tukey* para comparação de medidas repetidas. O *software* utilizado foi o *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, USA) e o nível de significância foi de 5%.

### **3.7.2 Avaliação da Atividade Hemolítica**

O teste de hemólise foi realizado conforme Montagner (2005) (Montagner, 2005). Primeiramente foi preparada uma suspensão de hemácias 1:20, adicionando-se 500 µL de sangue total a 10 mL de PBS. Essa suspensão foi mantida sob leve agitação, utilizando um agitador magnético durante toda a execução do teste. Em seguida, os peptídeos foram diluídos em PBS nas concentrações finais de 4, 10 e 20 µg·mL<sup>-1</sup> e incubados na ausência (branco do teste) e na presença de 100 µL de suspensão de hemácias. Em tubos contendo 100 µL de suspensão de hemácias 1:20 com os peptídeos, foi adicionada água *Mili-Q* mantendo sempre as mesmas concentrações finais, para fornecer o controle positivo, que representa 100% de hemólise. O branco desse controle positivo foi feito mantendo-se os mesmos componentes, porém sem a suspensão de hemácias. Também foram confeccionadas culturas de hemólise espontânea (controle negativo) com PBS e 100 µL de suspensão de hemácias. O branco destas culturas apresenta somente PBS.

As culturas foram confeccionadas em tubos de poliestireno e incubadas por 4 horas em estufa úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, os tubos foram centrifugados (7 min, a 500 g e 22°C) e 200 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato.



Na sequência, foi realizada a leitura da absorbância em 540 nm, no leitor de placas. Os valores de absorbância dos brancos foram subtraídos dos valores de absorbância dos testes e dos controles e o resultado foi obtido como percentual de hemólise de acordo com a equação:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Absorbância (composto)} - \text{Absorbância (controle negativo)}}{\text{Absorbância (controle positivo)} - \text{Absorbância (controle negativo)}} \times 100$$

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados e discussões referentes ao estudo da reação de dimerização do peptídeo antimicrobiano homotarsinina (Htr). A homotarsinina (Htr) é um peptídeo homodimérico, isolado da espécie de anuro *Phyllomedusa tarsius*, composto por 48 resíduos de aminoácidos, com uma ligação de dissulfeto entre os resíduos de Cys de duas cadeias monoméricas idênticas, contendo 24 resíduos de aminoácidos cada. A cadeia monomérica da homotarsinina foi denominada neste trabalho de Htr-M. A Tabela 5 mostra as estruturas primárias do monômero (Htr-M) e da homotarsinina, onde o grupo NH<sub>2</sub> representa a amidiação na região C-terminal dos peptídeos.

**Tabela 5: Estrutura primária dos peptídeos sintetizados**

Peptídeo	Sequências
Htr	$\begin{array}{c} \text{NLVSDIIGSKKHMEKLSIISKCR-NH}_2 \\   \\ \text{NLVSDIIGSKKHMEKLSIISKCR-NH}_2 \end{array}$
Htr-M	NLVSDIIGSKKHMEKLSIISKCR-NH <sub>2</sub>

\*NH<sub>2</sub> representa a amidiação do grupamento C-terminal.

A síntese da Htr foi realizada em duas etapas distintas. Primeiramente, foi sintetizada a cadeia monomérica Htr-M de forma manual pela SPFS, de acordo a estratégia Fmoc. Em seguida, foi realizada a dimerização de Htr-M através da formação de ligação de dissulfeto entre dois resíduos de Cys-23 de duas cadeias monoméricas. É importante salientar que, em solução aquosa com pH levemente básico e na presença de oxigênio molecular, a ligação de dissulfeto se forma espontaneamente entre cadeias peptídicas que apresentam resíduos de Cys (Dalla Serra *et al.*, 2008; Mullen *et al.*, 2012; Raimondo *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 1991). Dessa forma, foi necessário ainda sintetizar um peptídeo análogo à Htr-M, substituindo-se o resíduo de Cys-23 por um resíduo de serina ([S<sup>23</sup>]Htr-M), para evitar assim a dimerização de Htr-M durante os estudos conformacionais por CD. A seguir serão apresentados os resultados da obtenção de Htr-M, [S<sup>23</sup>]Htr-M e Htr.

#### 4.1 Obtenção da Cadeia Monomérica Htr-M

A síntese da cadeia monomérica Htr-M não apresentou nenhuma dificuldade especial. Algumas etapas apresentaram reações de acoplamento incompletas, reveladas pelo teste de *Kaiser* (Howl, 2005). Nesses casos, foram necessárias repetições (reacoplamentos) para evitar ao máximo a formação de subprodutos na síntese. A Tabela 6 apresenta os dados do acompanhamento da síntese de Htr-M.

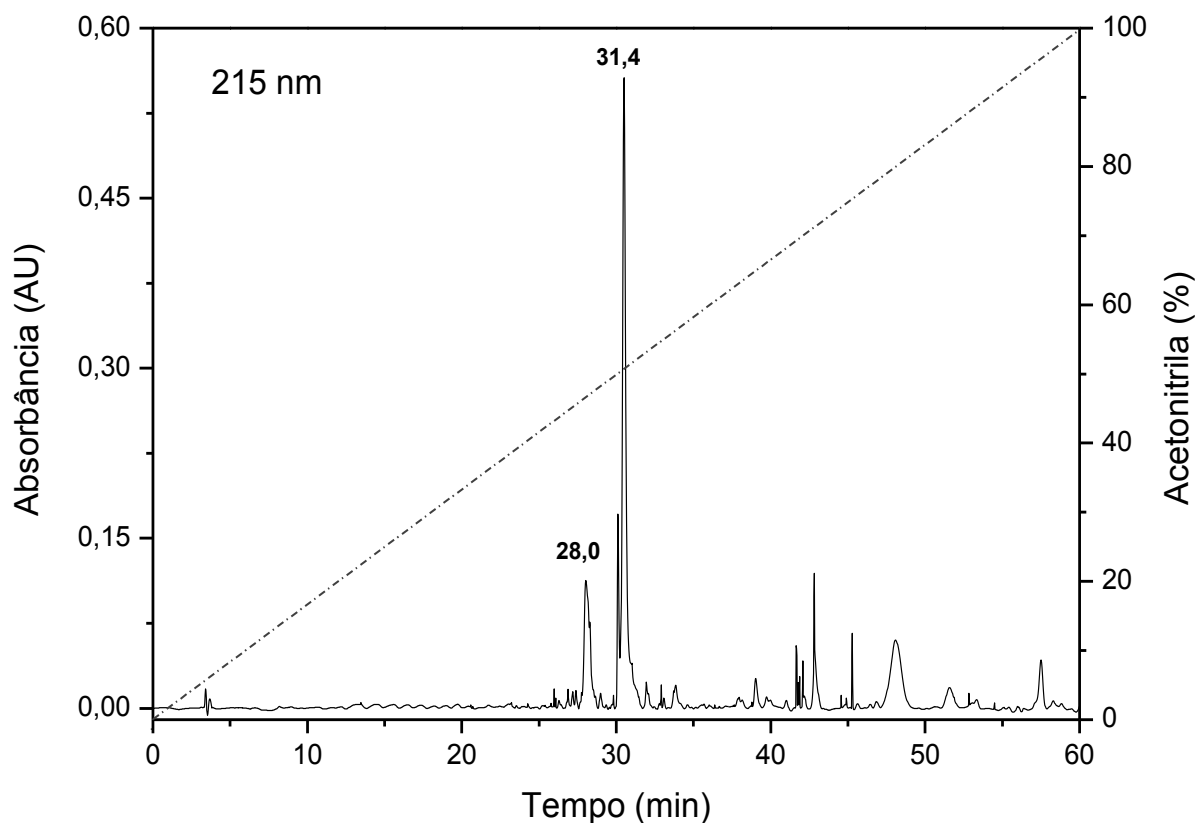
**Tabela 6: Dados do acompanhamento da síntese de Htr-M**

Ordem de acoplamento	Derivado Aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	4	2,5	-	+
2°	Fmoc-Cys(Trt)-OH	3	2,5	-	+
3°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
4°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
5°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
6°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
7°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
8°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	+	~
#	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	2,5	-	+
10°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
11°	Fmoc-Glu(OtBu)-OH*	3	2,5	-	+
12°	Fmoc-Met-OH	3	2,5	-	+
13°	Fmoc-His(Trt)-OH	3	2,5	-	+
14°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	+	~
#	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
15°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
16°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
17°	Fmoc-Gly-OH	3	2,5	-	+
18°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	+	~
#	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
19°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
20°	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	2,5	-	+
21°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
22°	Fmoc-Val-OH	3	2,5	-	+
23°	Fmoc-Leu-OH	3	2,5	-	+
24°	Fmoc-Asn(Trt)-OH	3	2,5	-	+

# Etapas de reacoplamento; \* Repetição do teste; + Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amino livre; - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amino livre; ~ Teste não realizado.

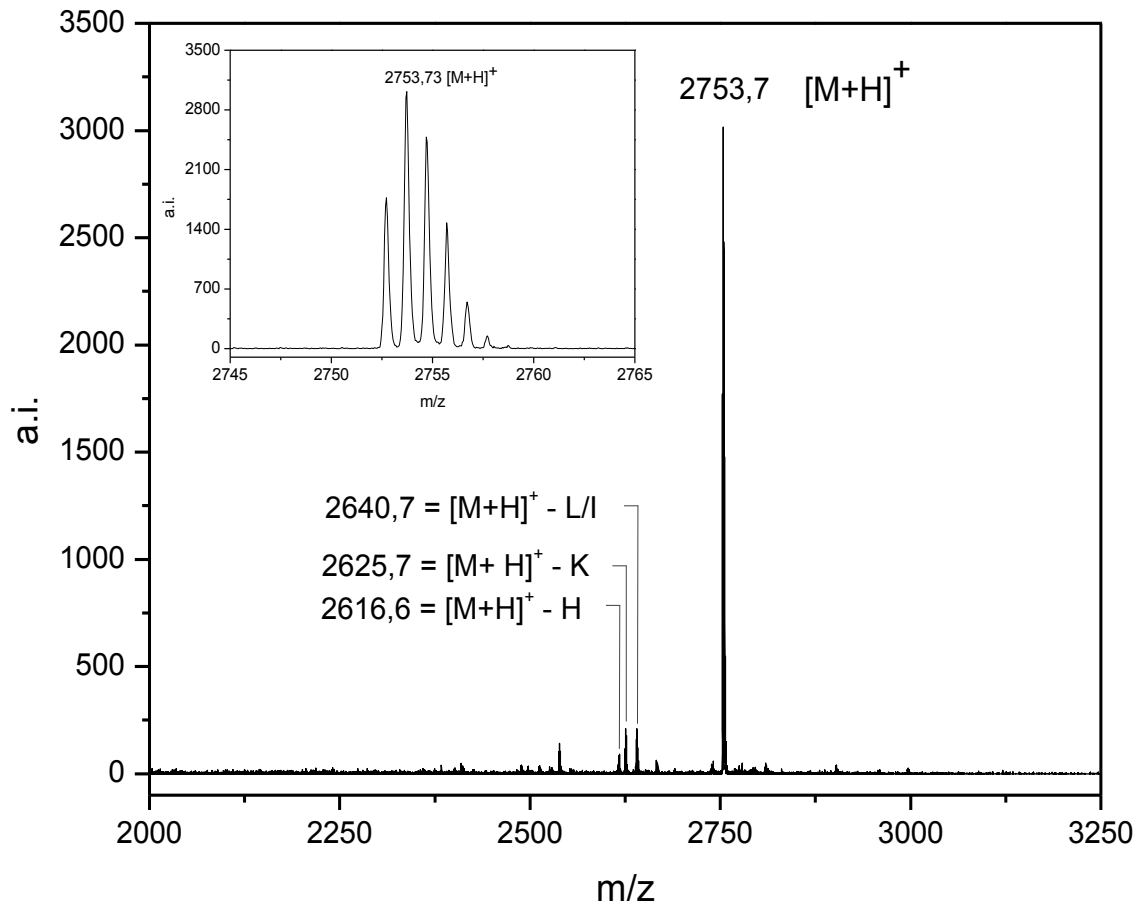
Os derivados de aminoácidos Fmoc-Ile-OH (8° e 18° acoplamentos) e Fmoc-Lys(Boc)-OH (14° acoplamento) foram submetidos a reacoplamentos, mantendo-se as mesmas condições dos acoplamentos originais. Os testes de *Kaiser* realizados após os reacoplamentos mostraram resultado negativo, não necessitando de nenhuma alteração nas condições reacionais do acoplamento, como alteração de ativadores, aumento de excesso de derivado de aminoácido ou tempo de reação.

Ao final da síntese, foi realizada a etapa de clivagem e a amostra bruta foi submetida à análise por CLAE-FR, para verificar a qualidade da síntese através do perfil cromatográfico, e à espectrometria de massas, para confirmação da obtenção do produto desejado. As Figuras 24 e 25 (p. 50) apresentam, respectivamente, o perfil cromatográfico analítico de fase reversa e o espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) para a amostra do produto bruto da síntese de Htr-M.



**Figura 24: Perfil cromatográfico analítico da amostra bruta de Htr-M.** Amostra injetada (20  $\mu$ L) em coluna C<sub>18</sub> Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. A linha tracejada retrata a variação da concentração de ACN.

No cromatograma da amostra bruta da síntese pode ser observada a presença de dois picos principais, com tempos de retenção ( $t_r$ ) de 28,0 e 31,4 min, os quais estão destacados na Figura 24 (p.49). No espectro de massas da Figura 25 é possível verificar o pico devido ao íon  $[M+H]^+$  de  $m/z$  2753,7 Da, que corresponde à massa do peptídeo Htr-M,  $2752,58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  mais um próton, além de análogos com massas inferiores.



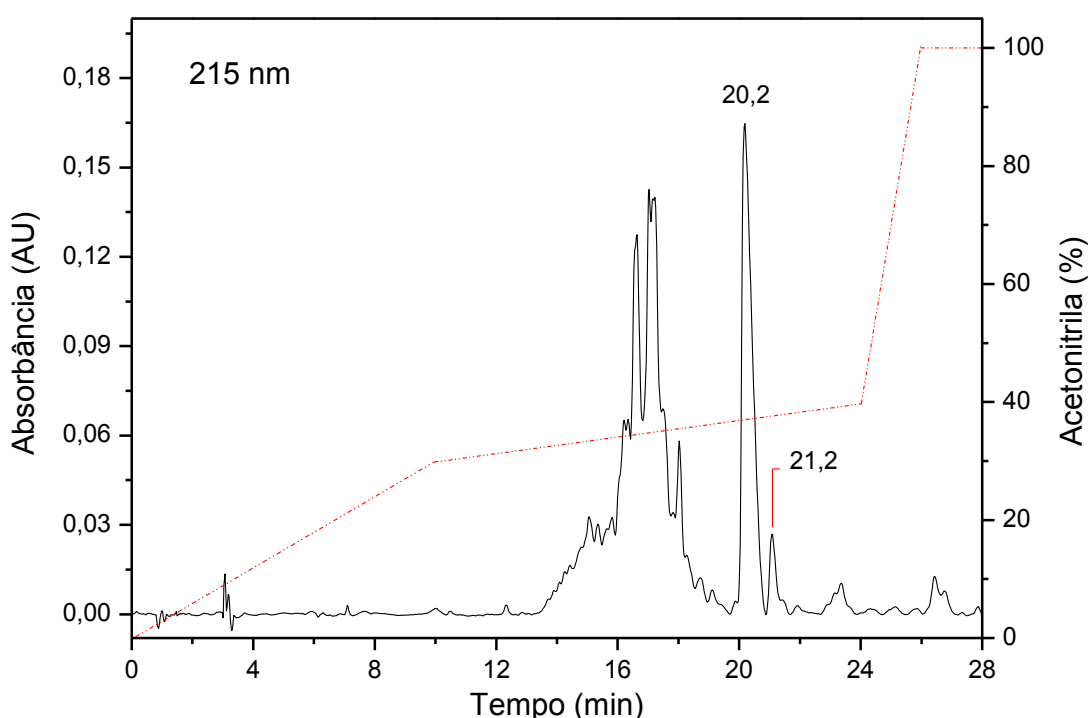
**Figura 25:** Espectro de massas (MALDI ToF/ToF) da amostra bruta de Htr-M.

Após as análises dos íons com razões  $m/z$  menores do que Htr-M, foi possível caracterizá-los como subprodutos da síntese, que correspondem a peptídeos análogos a Htr-M com a ausência de alguns dos resíduos de aminoácidos da sequência peptídica do monômero, o que indica falhas em determinadas etapas de acoplamento e consequente diminuição no rendimento final da síntese (picos com  $m/z$  indicados na Figura 25).

Foram coletadas amostras durante as análises de CLAE-FR referentes aos picos de  $t_r$  28,0 e 31,4 min para análises de massas separadamente. Os resultados obtidos por espectrometria de massas dessas frações mostraram a presença de subprodutos da síntese na

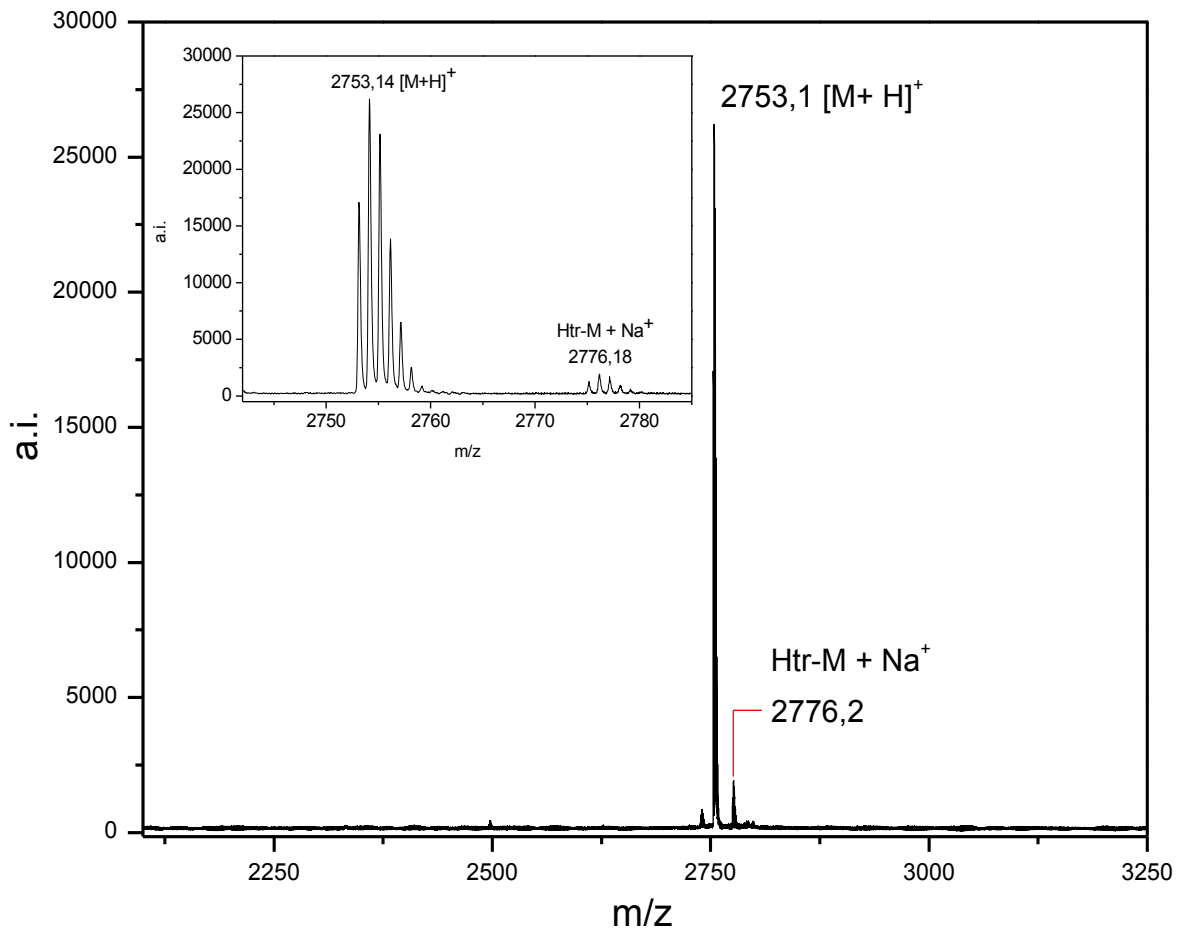
fração da amostra do pico com  $t_r$  de 28,0 min e confirmaram que o pico com  $t_r$  de 31,4 min correspondia ao peptídeo Htr-M, caracterizando-o como produto principal da síntese. Após a integração das áreas sob os picos do cromatograma, determinou-se o rendimento da síntese, que foi de aproximadamente 70%.

Para a realização da reação de dimerização foi necessária a purificação do peptídeo Htr-M na amostra bruta da síntese, a qual foi conduzida em condições semi-preparativas. O perfil cromatográfico utilizado para purificação nestas condições está ilustrado na Figura 26.



**Figura 26: Perfil cromatográfico em condições semi-preparativas para purificação de Htr-M.** Amostra injetada (150  $\mu\text{L}$ ) em coluna semi-preparativa *Varian Pursuit 5 C18* (250 mm x 10 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 2,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A linha tracejada retrata a variação da concentração de ACN.

Como pode ser observado, os picos com os  $t_r$  entre 14 e 18 min se sobrepuseram, não permitindo a coleta dessas frações de forma efetiva, enquanto que frações dos picos com  $t_r$  20,2 e 21,2 min foram coletadas e submetidas à análise por espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF) no modo MS. A Figura 27 (p. 52) corresponde ao espectro de massas da fração relativa ao pico com  $t_r$  20,2 min. O espectro revela que a substância com esse  $t_r$  equivale ao monômero Htr-M, devido ao pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  2753,1 Da. O espectro revela ainda a presença do aduto de sódio de  $m/z$  2776,18 Da, não sendo detectado nenhuma outra espécie de massa diferente da cadeia monomérica de Htr-M.



**Figura 27:** Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) para amostra purificada de Htr-M.

A análise de massas da fração referente ao pico com  $t_r$  de 21,20 min revela a presença de análogos do peptídeo Htr-M. Estes análogos foram formados devido à falhas em determinadas etapas de acoplamentos e as massas de seus íons são mostradas na Figura 28 (p.53). Neste espectro pode ainda ser observada a presença de Htr-M ( $m/z$  2753,2 Da), devido à proximidade dos picos, o que dificulta a coleta de uma fração completamente isenta de Htr-M e, também, a presença de dois análogos principais: um devido ao pico  $[M+H]^+$  de  $m/z$  2625,1 Da que equivale à massa de Htr-M sem um resíduo de Lys, e outro devido ao pico  $[M+H]^+$  de  $m/z$  2616,1 Da equivalente à massa de Htr-M sem um resíduo de His.

O íon precursor do monômero Htr-M equivalente ao íon  $[M+H]^+$  de  $m/z$  2753,14 Da, obtido na espectrometria de massas no modo MS (Figura 27, p. 53), foi fragmentado no modo MS/MS e os espectros foram manualmente interpretados por sequenciamento *de novo*. Em uma análise de sequenciamento por espectrometria de massas são identificados fragmentos do peptídeo devido a quebras de ligações da cadeia principal (Figura 29, p. 53), os quais resultam em uma série de íons característicos para cada tipo de ligação quebrada.

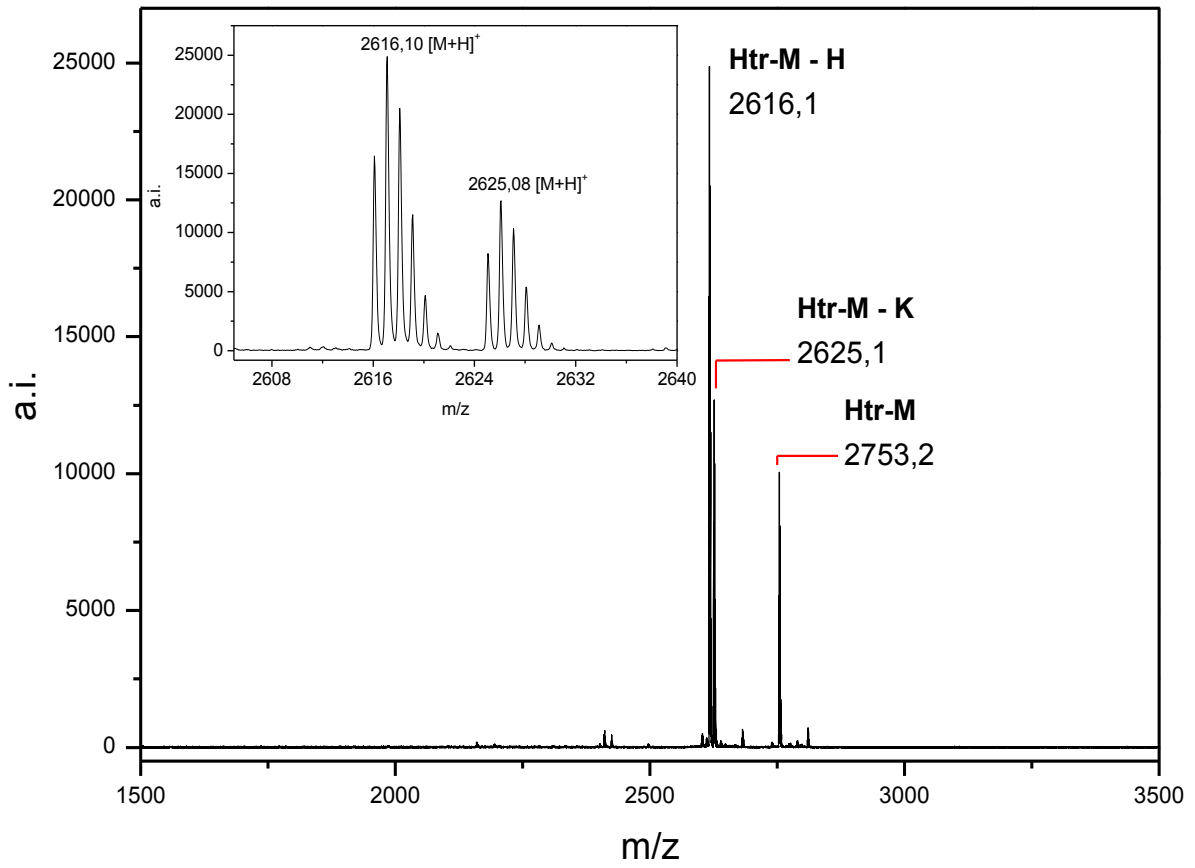


Figura 28: Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) da fração do pico com  $t_r$  21,3 min.

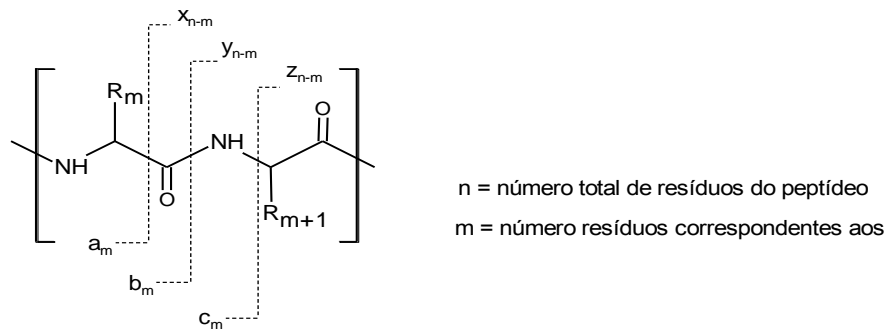
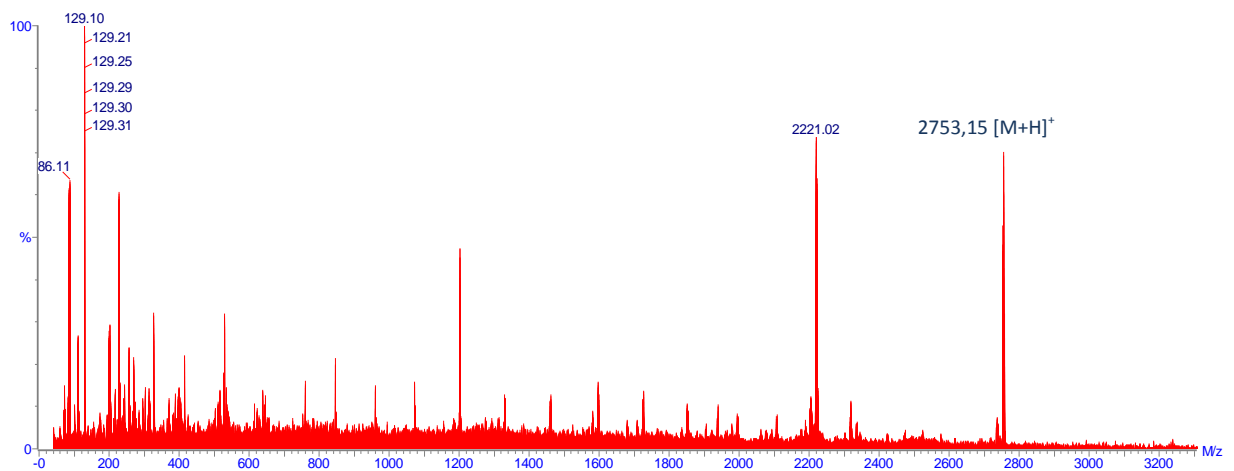


Figura 29: Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann-Biemann dos fragmentos formados.

A análise normalmente se baseia nos íons das séries  $-b$  e  $-y$ , pois a quebra ocorre nas ligações peptídicas. O espectro de MS/MS de Htr-M está mostrado na Figura 30 (p.54).





**Figura 30: Espectro de massas MS/MS do peptídeo Htr-M. Espectro geral de MS/MS mostrando os fragmentos obtidos de Htr-M.**

O sequenciamento dos fragmentos foi iniciado através da identificação dos íons imônio referentes a cada resíduo de aminoácido da sequência peptídica de Htr-M. Os íons imônio são característicos para determinados resíduos de aminoácidos e indicam a presença destes na sequência peptídica. No exemplo mostrado na Figura 31 (p. 55), é possível verificar a presença de íons imônio de  $m/z$  86,1 Da, valores característicos de resíduos de Leu e Ile,  $m/z$  129,1 Da que é característico do resíduo de Arg,  $m/z$  72,0 Da para Val,  $m/z$  101,2 Da para Lys,  $m/z$  103,9 Da para Met e  $m/z$  110,1 Da para His. Foram encontrados os íons imônio referentes a todos os resíduos do peptídeo Htr-M, com exceção da Gly, que apresenta valor  $m/z$  abaixo do limite de detecção utilizado para obtenção do espectro.

Depois de localizado os íons imônio, verificou-se primeiramente, devido sua elevada intensidade, a presença do pico de  $m/z$  228,31 Da referente ao fragmento  $-b_2$  constituído pelos resíduos da região amino terminal Asn-1 e Leu-2. Fragmentos da série  $-b$  são acompanhados de íons com  $m/z$  inferior em 28 Da que correspondem a uma carbonila (C=O, 28 u), caracterizando a série  $-a_2$ . Para o pico de  $m/z$  228,31 foi localizado outro de  $m/z$  200,37 Da pertencente à série  $-a_2$  conforme apresentado na Figura 32 (p. 55).

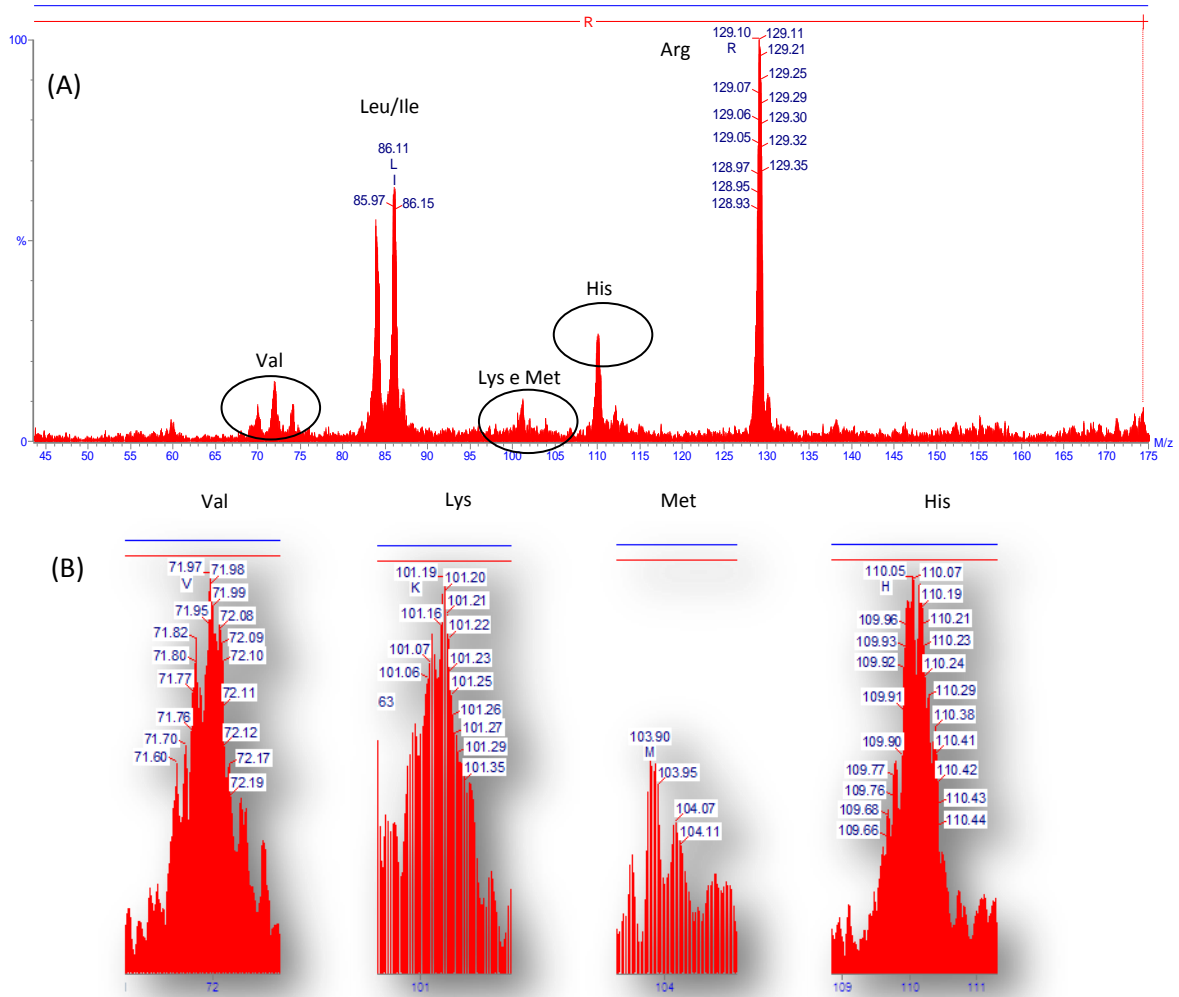


Figura 31: Região ampliada do espectro MS/MS comum para alguns íons imônio de Htr-M (A). Ampliação dos sinais de íons imônio para os resíduos de Val, Lys, Met e His destacados (B).

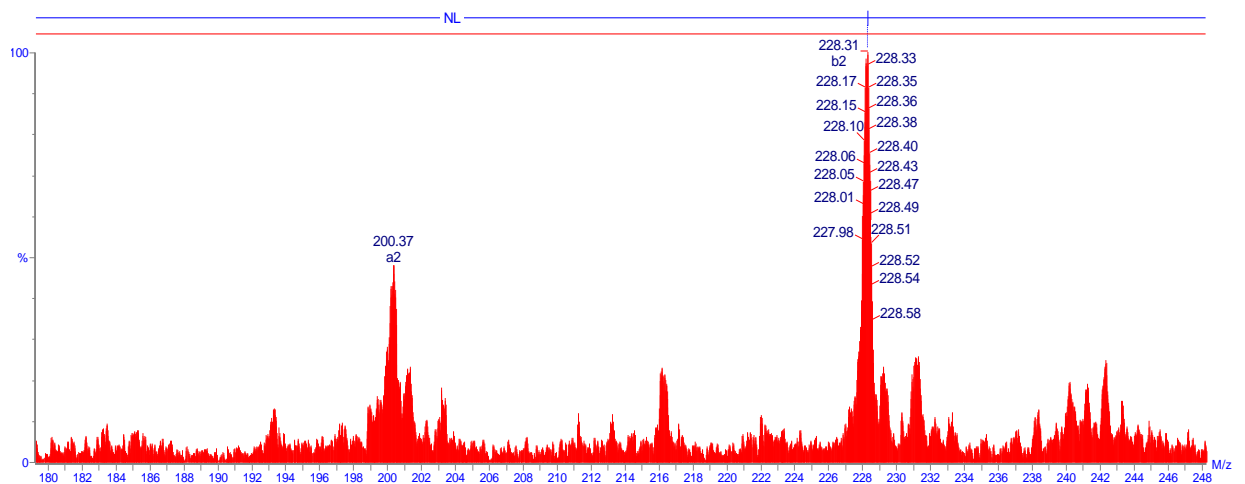
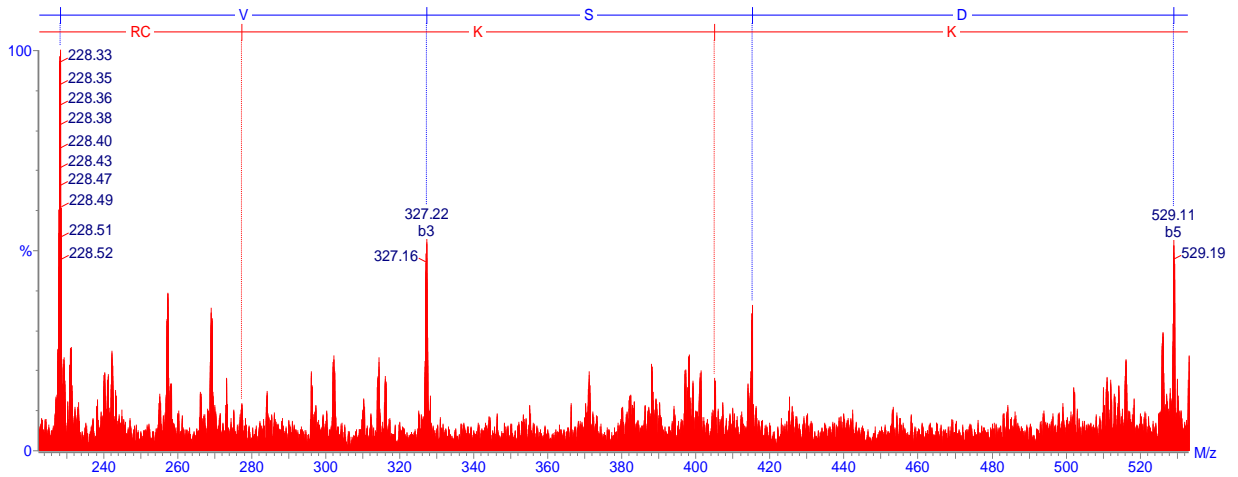


Figura 32: Região ampliada do espectro mostrando o fragmento da série  $b_2$  e o fragmento da série  $a_2$  correspondente de Htr-M.

A partir da localização do fragmento  $-b_2$ , seguiu-se o sequenciamento localizando-se o fragmento  $-b_3$ , referente ao tripeptídeo amino terminal Asn-Leu-Val. Dessa forma, foi possível realizar todo o sequenciamento da série  $-b$  sempre encontrando o pico de  $m/z$  relativo ao resíduo de aminoácido seguinte (Figura 33) e confirmado pela presença de íons da série  $-a$ .



**Figura 33:** Região do espectro ampliada mostrando o assinalamento dos fragmentos  $-b_3$ ,  $-b_4$  e  $-b_5$  (em azul) de Htr-M.

Para o sequenciamento dos fragmentos da série  $-y$ , o primeiro fragmento foi encontrado, subtraindo-se o valor da relação  $m/z$  do íon molecular  $[M+H]^+$  do valor da relação  $m/z$  do fragmento da série  $-b$  correspondente e somando-se ao valor da massa de um próton (+1) (Cantú *et al.*, 2008) conforme equação abaixo:

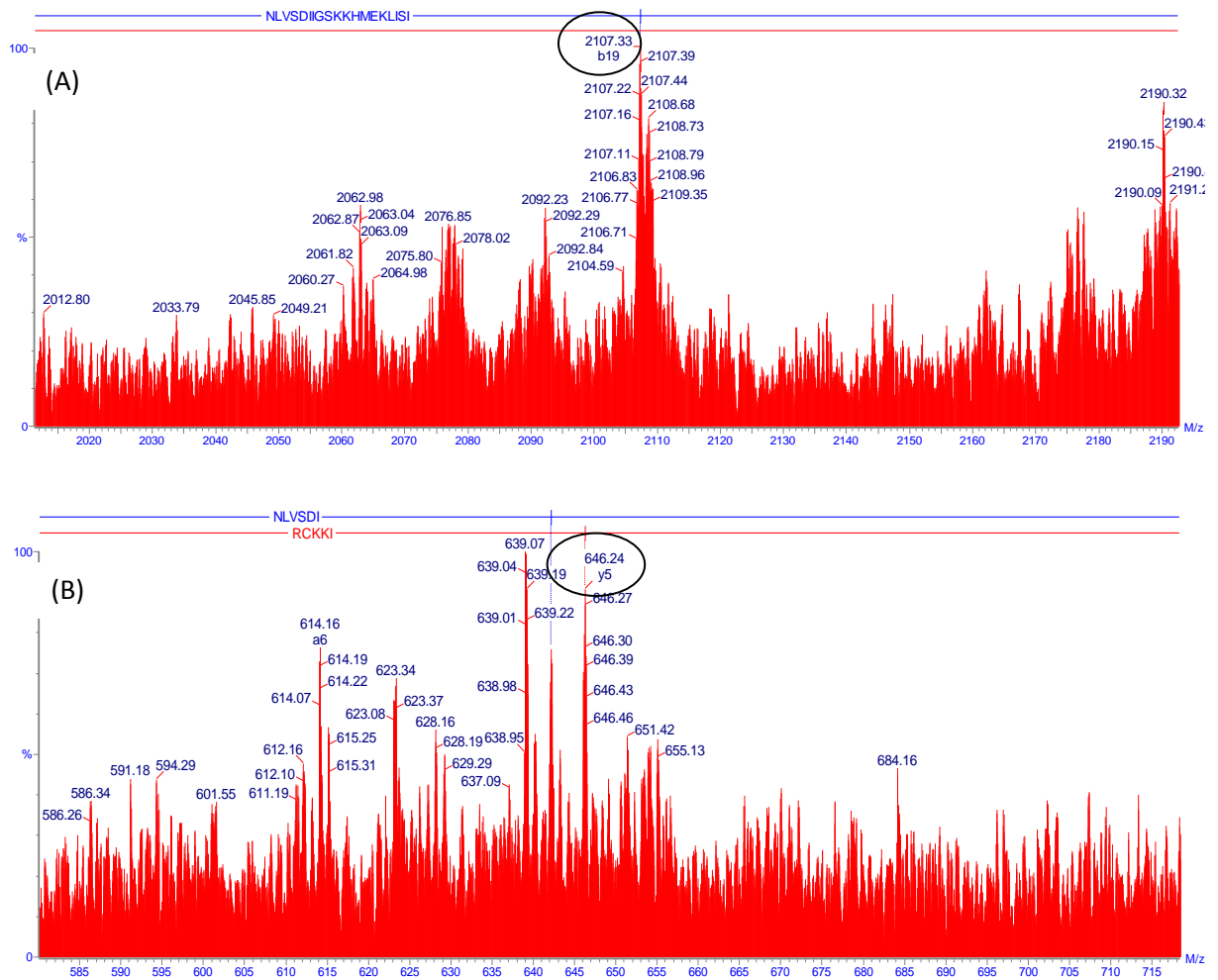
$$y_{m-n} = [M+H]^+ - b_n + 1$$

onde 'm' é o número total de fragmentos da série  $-y$  do peptídeo Htr-M e 'n' o fragmento da série  $-b$  já sequenciado. Dessa forma, utilizando-se o fragmento  $-b_{19}$ , por exemplo, foi encontrado o fragmento equivalente ao  $-y_5$  conforme descrito a seguir:

$$y_{24-19} = [M+H]^+ - b_{19} + 1$$

$$y_5 = 2753,15 - 2107,33 + 1$$

$$y_5 = \mathbf{646,82}$$



**Figura 34: Região ampliada do espectro destacando o pico de m/z equivalente ao fragmento  $-b_{19}$  de Htr-M (A). Região ampliada do espectro destacando o fragmento  $-y_5$  para Htr-M (B).**

Considerando que o *software* apresenta uma tolerância m/z de 0,5, o valor para o fragmento  $-y_5$  fica próximo do valor encontrado no espectro (Figura 34b). Seguindo essa metodologia, foram identificados todos os fragmentos da série  $-y$ .

A interpretação final do espectro MS/MS de Htr-M permitiu o reconhecimento completo dos fragmentos gerados das séries de íons  $-y$  e  $-b$ , devido à quebra das ligações amídicas do esqueleto peptídico e os resultados são mostrados na Figura 35 (p.58).

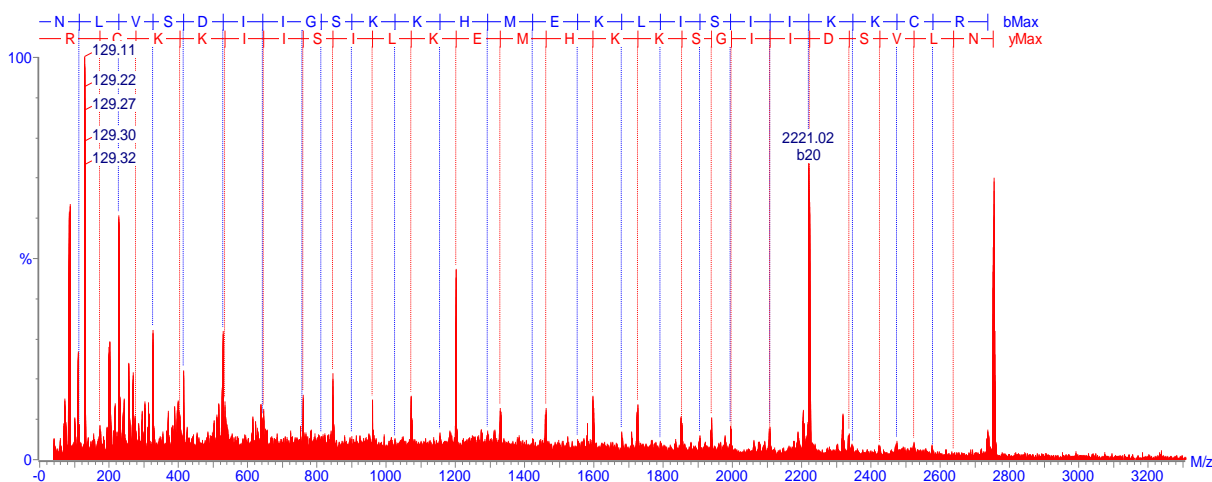


Figura 35: Espectro de massas MS/MS do peptídeo Htr-M assinalado. Os fragmentos da série  $-y$  estão em vermelho e da série  $-b$  em azul.

#### 4.1.1 Peptídeo Monomérico $[S^{23}]$ Htr-M

A síntese do análogo monomérico  $[S^{23}]$ Htr-M foi realizada utilizando a mesma metodologia para Htr-M. No entanto, um resíduo de Ser foi acoplado em substituição ao resíduo Cys-23, conforme a sequência mostrada abaixo:



Na Tabela 7 (p. 59) são apresentados dados do acompanhamento da síntese de  $[S^{23}]$ Htr-M pela SPFS.

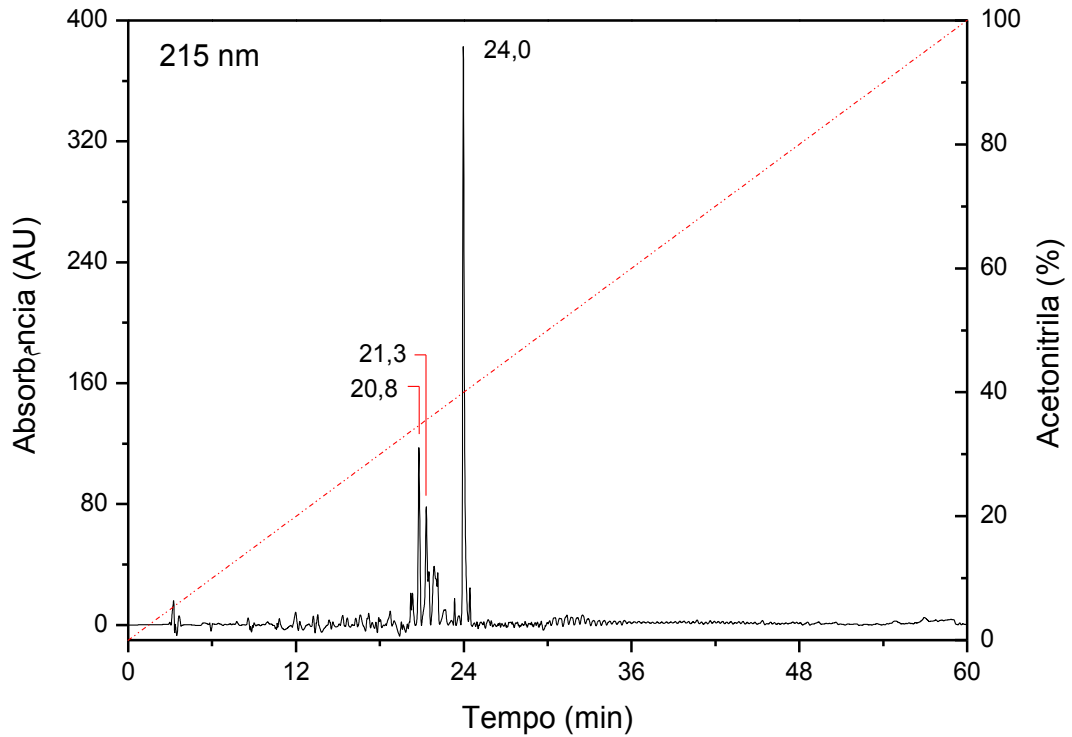
Nenhuma dificuldade, em especial, foi apresentada durante a síntese. Apenas nos resíduos 5° e 19° de Fmoc-Ile-OH foi conduzida uma segunda desproteção. Após a síntese, foi feita a clivagem e a amostra bruta foi submetida à análise por CLAE-FR, para verificar a qualidade da síntese, e à espectrometria de massas para confirmação da presença do produto desejado. As Figuras 36 e 37 (p. 60) apresentam, respectivamente, o perfil cromatográfico analítico de fase reversa e o espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) do produto bruto da síntese de  $[S^{23}]$ Htr-M.

Tabela 7: Dados do acompanhamento da síntese de  $[S^{23}]Htr-M$ 

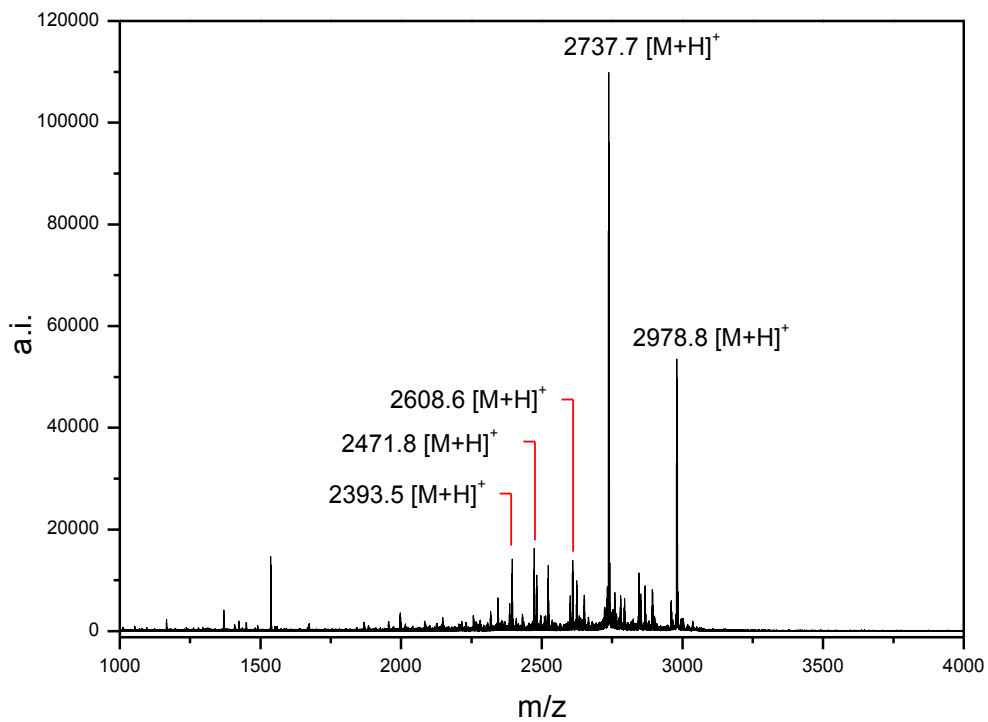
Ordem de acoplamento	Derivado Aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	4	2,5	-	+
2°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
3°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
4°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
5°	Fmoc-Ile-OH*	3	2,5	-	+
6°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
7°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
8°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	2,5	-	+
10°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
11°	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	3	2,5	-	+
12°	Fmoc-Met-OH	3	2,5	-	+
13°	Fmoc-His(Trt)-OH	3	2,5	-	+
14°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
15°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2,5	-	+
16°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
17°	Fmoc-Gly-OH	3	2,5	-	+
18°	Fmoc-Ile-OH	3	2,5	-	+
19°	Fmoc-Ile-OH*	3	2,5	-	+
20°	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	2,5	-	+
21°	Fmoc-Ser(tBu)-OH	3	2,5	-	+
22°	Fmoc-Val-OH	3	2,5	-	+
23°	Fmoc-Leu-OH	3	2,5	-	+
24°	Fmoc-Asn(Trt)-OH	3	2,5	-	+

# Etapas de reacoplamento; \* Repetição do teste; + Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre; - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre; ~ Teste não realizado.

No perfil cromatográfico de  $[S^{23}]Htr-M$  mostrado na Figura 36 (p.60), pode ser observado a presença de três picos principais, com  $t_r$  de 20,8, 21,3 e 24,0 min. No espectro de massas da Figura 37 (p.60) é possível verificar o pico devido ao íon  $[M+H]^+$  de  $m/z$  2737,7 Da que corresponde à massa do peptídeo  $[S^{23}]Htr-M$ ,  $2736,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  somada a um próton, além de outros análogos. O espectro indica a presença de alguns subprodutos análogos à  $[S^{23}]Htr-M$ , que são resultados de falhas em determinadas etapas de acoplamento durante a síntese. Entretanto, não foi objetivo deste trabalho investigar a identidade desses subprodutos.

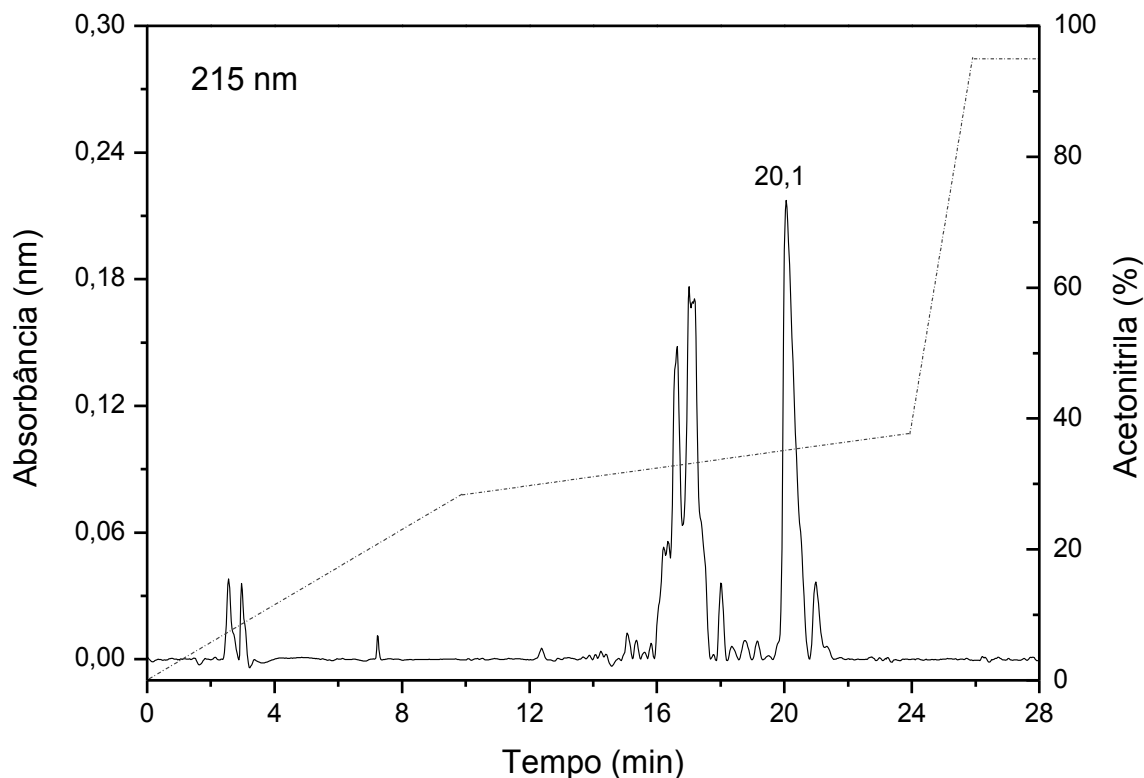


**Figura 36:** Perfil cromatográfico da amostra bruta de  $[S^{23}]Htr-M$ . Amostra injetada ( $20\mu L$ ) em coluna  $C_{18}$  Vydac 218TP510 ( $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$ ) equilibrada com TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A linha tracejada retrata a variação da concentração de ACN.



**Figura 37:** Espectro de massas (MALDI ToF/ToF) da amostra bruta de  $[S^{23}]Htr-M$ .

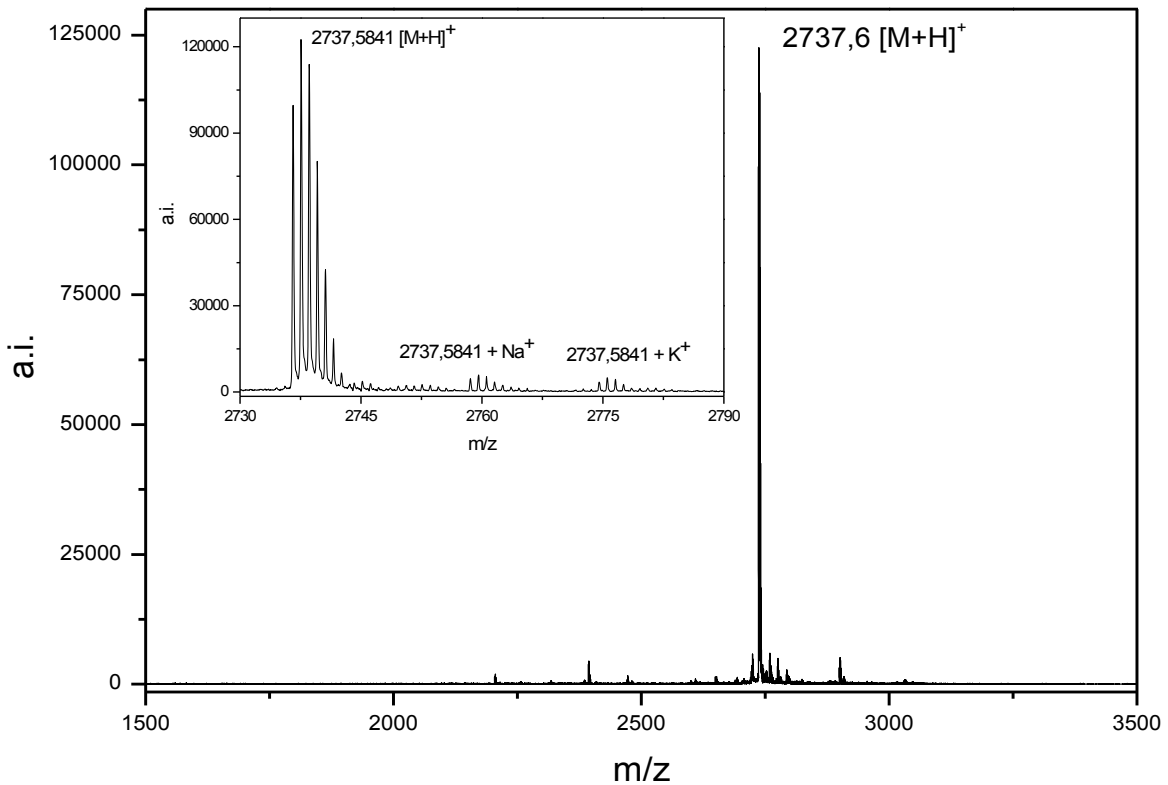
A purificação da amostra bruta da síntese do peptídeo  $[S^{23}]Htr-M$  foi necessária para realização dos estudos conformacionais em CD. O perfil cromatográfico utilizado para purificação em condições semi-preparativas está ilustrado na Figura 38.



**Figura 38: Perfil cromatográfico em condições semi-preparativas para purificação de  $[S^{23}]Htr-M$ .** Amostra injetada (150  $\mu L$ ) em coluna semi-preparativa *Varian Pursuit 5 C18* (250 mm x 10 mm, 5 $\mu m$ ) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 2,5  $mL \cdot min^{-1}$ . A linha tracejada retrata a variação da concentração de ACN.

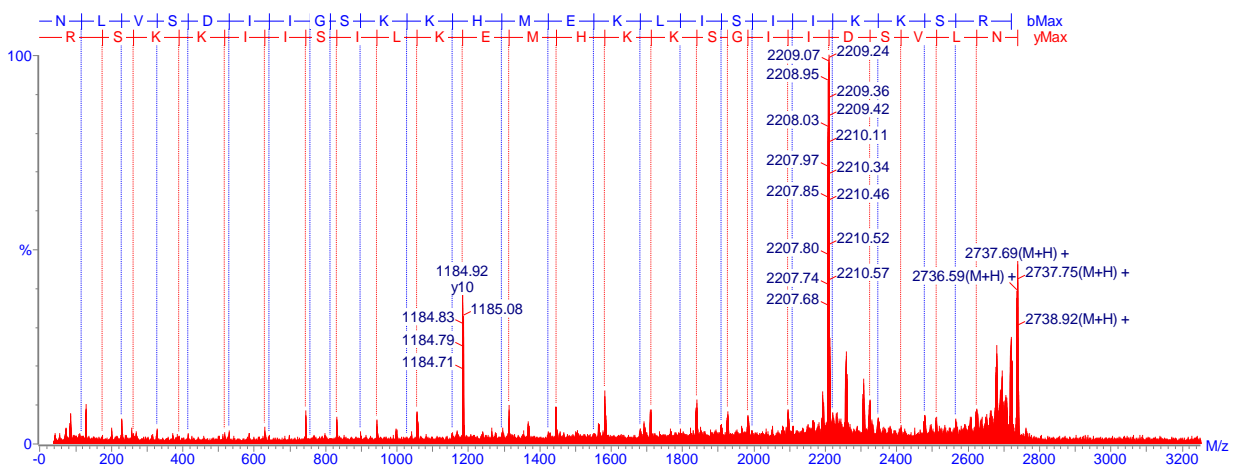
A Figura 39 (p. 62) equivale ao espectro de massa da fração coletada por CLAE-FR equivalente ao pico em  $t_r$  20,1 min (Figura 38), confirmando a presença do íon correspondente ao  $[S^{23}]Htr-M$ .





**Figura 39:** Espectro de massas (MALDI-ToF-ToF) da amostra purificada de  $[S^{23}]Htr-M$ . No canto superior esquerdo do espectro, uma ampliação mostrando os adutos  $[S^{23}]Htr-M + Na^+$  e  $[S^{23}]Htr-M + K^+$ .

O íon precursor do monômero  $[S^{23}]Htr-M$  purificado, obtido na espectrometria de massas no modo MS (Figura 39), foi também fragmentado no modo MS/MS e os espectros foram manualmente interpretados por sequenciamento *de novo*. A metodologia para o sequenciamento foi a mesma utilizada para Htr-M e a análise do espectro de MS/MS permitiu o reconhecimento completo dos fragmentos gerados das séries de íons *-y* e *-b* (Figura 40).



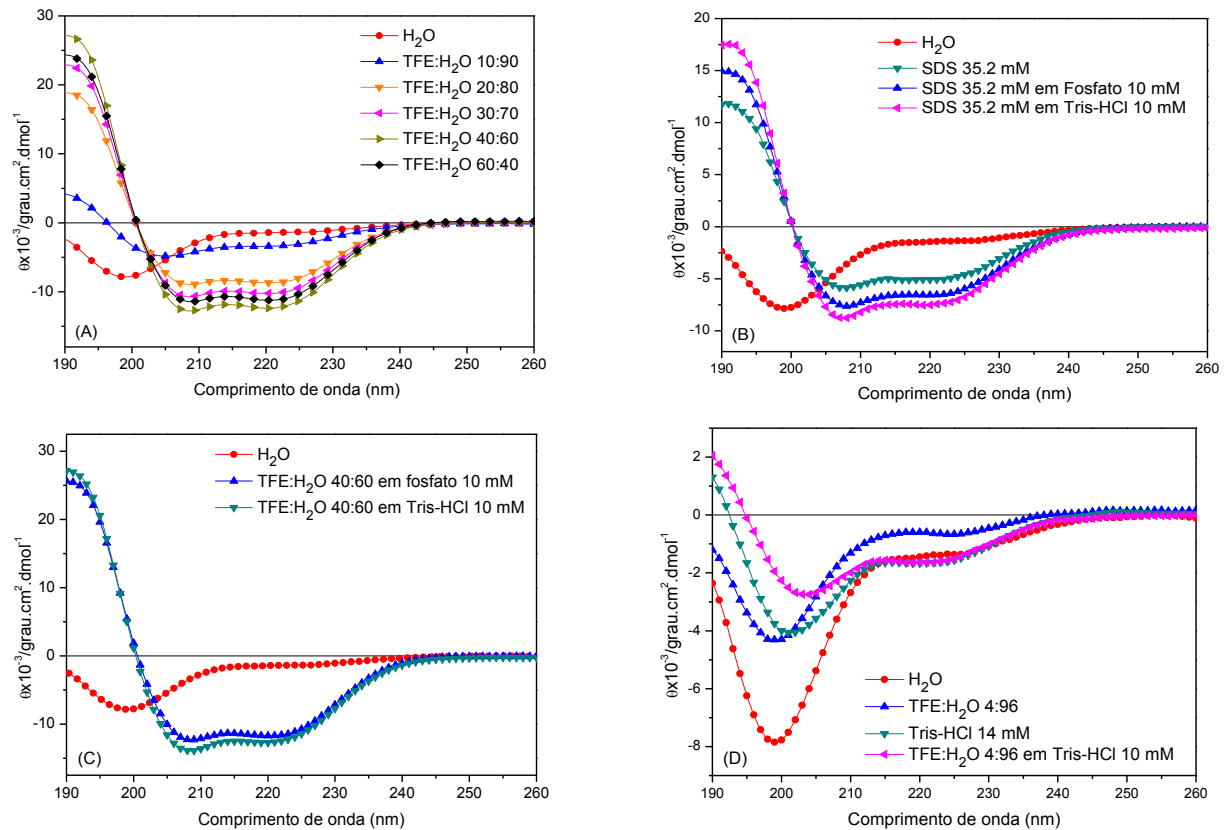
**Figura 40:** Espectro de massas MS/MS para o peptídeo  $[S^{23}]Htr-M$ . (A) Espectro geral de MS/MS mostrando o assinalamento para os fragmentos das séries *-y* (vermelho) e *-b* (azul) de  $[S^{23}]Htr-M$ .

## 4.2 Estudos das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular

Os estudos das preferências conformacionais do peptídeo por dicroísmo circular (CD) foram realizados com o objetivo de conhecer o comportamento conformacional adotado pelo peptídeo Htr-M nos diferentes meios biomiméticos e, então, definir as condições reacionais para a cinética da dimerização do peptídeo.

Conforme mencionado anteriormente, Htr-M possui um resíduo de Cys que, quando em meio biomimético e em presença de  $O_2$ , reage facilmente com o resíduo de Cys de outra cadeia, tornando os resultados dos estudos conformacionais em CD pouco confiáveis. Assim, foi utilizado para esses estudos o análogo  $[S^{23}]Htr-M$ , que apresentou nos meios propostos, um comportamento semelhante ao Htr-M, que foi anteriormente estudado por Verly (2010).

Os espectros de CD foram obtidos em soluções contendo TFE:H<sub>2</sub>O, micelas de SDS e tampão Tris-HCl aquoso em diversas condições estão agrupados na Figura 41.



**Figura 41: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo  $[S^{23}]Htr-M$ .** (A) Solução de TFE:H<sub>2</sub>O em diversas proporções (v/v); (B) Soluções de SDS em H<sub>2</sub>O, tampão fosfato 10 mmol·L<sup>-1</sup> e em tampão Tris-HCl 10 mmol·L<sup>-1</sup>; (C) TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v) em tampão fosfato 10 mmol·L<sup>-1</sup> e em tampão Tris-HCl 10 mmol·L<sup>-1</sup>; e (D) TFE:H<sub>2</sub>O 4:96 (v/v), Tris-HCl 10 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5 e TFE:H<sub>2</sub>O 4:94 (v/v) em Tris-HCl 10 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5.

A Figura 41.A (p.63), mostra que o espectro do peptídeo  $[S^{23}]Htr-M$  em água apresentou estrutura predominantemente randômica (espectro em vermelho), caracterizada pela presença de valores negativos de elipçidades molares ( $\theta$ ) em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) inferiores a 192 nm e a um mínimo de  $\theta$  em  $\lambda$  próximo a 198 nm. O cálculo de porcentagem de hélice ou teor de helicidade ( $H$ ), obtido por deconvolução a partir da concentração de peptídeo e das elipçidades molares em cada meio, confirmam o baixo conteúdo de estrutura  $\alpha$  helicoidal de  $[S^{23}]Htr-M$  em meio aquoso ( $\leq 5\%$  de  $H$ ). À medida que foi aumentada a proporção de TFE em relação à água, foi observado o aparecimento de valores positivos de intensidades de  $\theta$  em  $\lambda_{max}$  próximos a 190 nm e mínimos próximos à 208 nm (transição  $\pi-\pi^*$ ) e 222 nm (transição  $n-\pi^*$ ) caracterizando o predomínio da conformação  $\alpha$  helicoidal (Chen *et al.*, 1972; Kelly *et al.*, 2005). Na prporção de TFE:H<sub>2</sub>O 10:90 (v:v) o peptídeo ainda apresenta um conteúdo de hélice baixo, próximo a 10%, porém em solução de 20%, ocorre um aumento significativo no conteúdo de hélice (36%) alcançando-se um máximo de estruturação helicoidal em solução de 40% (51%) (Figura 42). Entretanto, em solução contendo 60% de TFE observa-se uma ligeira diminuição na helicidade do peptídeo (46%). Este tipo de comportamento já foi observado em outros estudos (Gast *et al.*, 2001; Kuprin *et al.*, 1995; Othon *et al.*, 2009) no qual foi revelada maior capacidade de formação de agregados entre moléculas de peptídeos em soluções contendo 40% de TFE, o que resulta na estabilização das estruturas helicoidais.

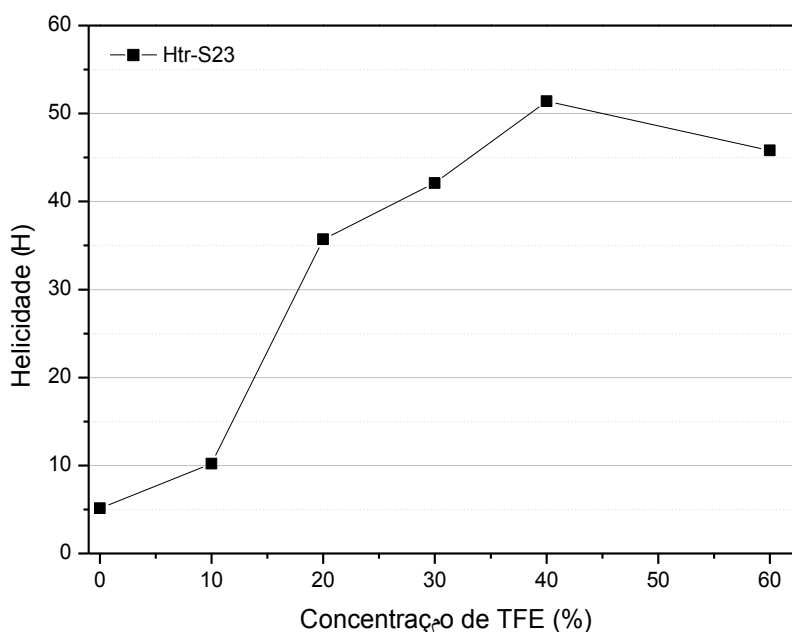


Figura 42: Conteúdo de hélice de  $[S^{23}]Htr-M$  em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O de diferentes proporções.

Assim como em TFE, os estudos realizados na presença de micelas de SDS também mostraram que o peptídeo se estrutura preferencialmente em uma conformação  $\alpha$  helicoidal (Figura 41.B, p. 63). O peptídeo foi analisado em SDS  $35,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e o conteúdo de hélice calculado foi de 22%, o que demonstra um menor grau de estruturação de  $[\text{S}^{23}]\text{Htr-M}$  em micelas quando comparado com TFE. Na Figura 41.B e C (p. 63), os espectros de SDS e TFE são apresentados na presença e na ausência de tampão fosfato  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 5,8 e tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5. Como pode ser observado, há um aumento na estruturação do peptídeo em tampão Tris-HCl, enquanto que em tampão fosfato a helicidade permanece praticamente constante. Os valores de  $H$  foram calculados e correspondem a 22% em SDS  $35,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  na presença de tampão fosfato  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 5,8 e 34% na presença de tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5. O conteúdo máximo de hélice alcançado em solução de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v) na presença de tampão fosfato  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,8 (Figura 41.C, p. 63) foi de 48 e 53% na presença de tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5. Estes valores deixam claro que o tampão Tris-HCl  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 8,5 aumenta ligeiramente o grau de estruturação, estabilizando ainda mais a conformação helicoidal do peptídeo.

Para confirmar o efeito de estabilização do tampão Tris-HCl na conformação helicoidal de  $[\text{S}^{23}]\text{Htr-M}$ , foram realizadas análises em diferentes condições que proporcionam ao peptídeo  $[\text{S}^{23}]\text{Htr-M}$  um baixo grau de estruturação. Para isto foram obtidos espectros de CD em solução de TFE:H<sub>2</sub>O 4:96 (v:v), solução aquosa de tampão Tris-HCl  $14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5 e em solução contendo ambos os meios, TFE:H<sub>2</sub>O 4:96 (v:v) na presença de tampão Tris-HCl (Figura 41.D, p. 63). Estes resultados, comparados ao espectro em água, mostram que há estruturação em todos os meios, mesmo que em baixo grau, como é o caso do que acontece em solução Tris-HCl  $14 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , onde ocorre a diminuição e deslocamento dos mínimos. É importante enfatizar que, normalmente, os PAMs apresentam estrutura randômica quando em meios aquosos tamponados ou mesmo em baixas proporções de TFE:H<sub>2</sub>O, como as utilizadas neste estudo (Ladokhin *et al.*, 1999; Resende *et al.*, 2009; Rozek *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2010). Dessa forma, estes resultados revelam um comportamento peculiar do  $[\text{S}^{23}]\text{Htr-M}$  que, em solução aquosa de tampão Tris-HCl, mostrou-se estruturado em hélice  $\alpha$ , mesmo em baixo grau ( $H = 5\%$ ) (Figura 41.D, p. 63).

### 4.3 Obtenção do Peptídeo dimérico Htr

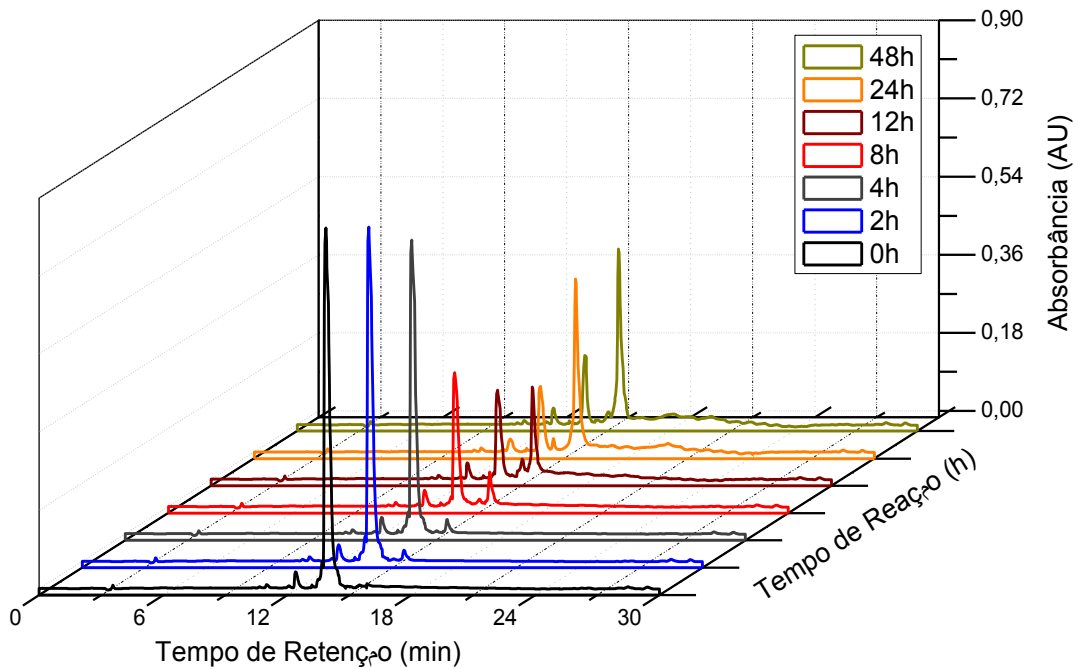
De acordo com os resultados de CD obtidos para  $[S^{23}]Htr-M$ , houve estruturação do peptídeo nos meios biomiméticos propostos para as reações de dimerização. Como faz parte do objetivo do trabalho verificar efeitos estruturais nestas reações, dentre os dois tampões utilizados durante os estudos de CD, o tampão Tris-HCl foi escolhido devido ao maior efeito estabilizador da hélice. Além disso, estudos prévios mostraram que em tampão fosfato, onde não se atingem valores de pH superiores a 7,5, a reação de dimerização não apresenta rendimentos apreciáveis, sendo fundamental o emprego do tampão Tris-HCl para dimerização de Htr-M. Dessa forma, mantendo-se as proporções dos experimentos de CD, as reações de dimerização foram realizadas nas condições a seguir: : (i) solução tampão Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5, (ii) solução de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v) em solução tampão Tris-HCl a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5 e (iii) em solução de  $350 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de SDS em  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de Tris-HCl, pH 8,5. A concentração de Htr-M para todos os meios foi de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $36 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A obtenção do peptídeo homodimérico Htr ocorreu pela formação de ligação de dissulfeto intermolecular entre os resíduos de cisteínas de dois monômeros Htr-M, através da oxidação por O<sub>2</sub> atmosférico em temperatura ambiente. Em todos os meios, a reação foi acompanhada por cromatografia em fase reversa para verificar o tempo mínimo necessário para dimerização da Htr-M. Esse acompanhamento foi realizado com injeções sucessivas em diferentes intervalos de tempo, mantendo-se sempre o mesmo gradiente.

#### 4.3.1 Reação de dimerização em tampão Tris-HCl, pH 8,5

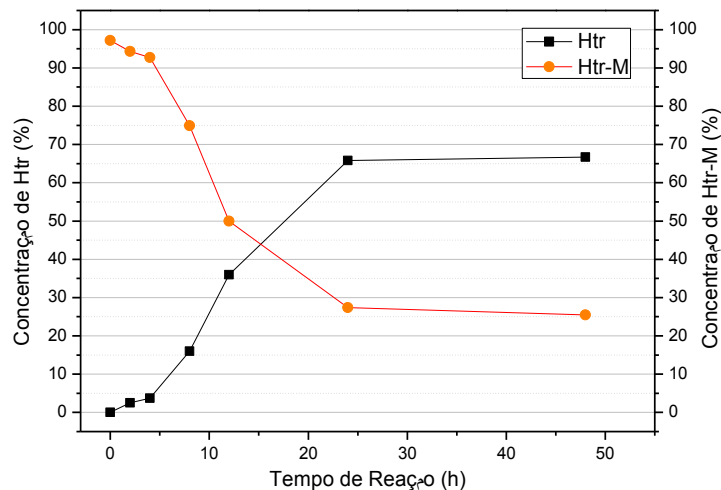
A Figura 43 (p.67) mostra o resultado do acompanhamento da dimerização em tampão Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5, em que cada cromatograma é referente a injeções de  $20 \text{ }\mu\text{L}$  de amostras da reação em diferentes intervalos de tempos.

Na Figura 43, o pico com o  $t_r$  de 14,1 min corresponde ao monômero Htr-M e o pico com  $t_r$  de 15,0 min corresponde ao homodímero Htr, conforme análises feitas em espectrometria de massas. É possível observar a diminuição na intensidade de absorção no pico correspondente ao monômero ( $t_r = 14,1 \text{ min}$ ) e a intensificação da absorção do pico relativo ao peptídeo Htr ( $t_r = 15,0 \text{ min}$ ), confirmando a progressiva formação do dímero. Conforme mostrado na Figura 44 (p.67), até um tempo de reação de 4h, é possível observar uma pequena formação do homodímero, apresentando um rendimento inferior a 5%. Após um

tempo reacional de 8h, quando o rendimento é de 16%, a formação de Htr aumenta significativamente até às 24h, atingindo um patamar a partir do qual não se observam mudanças consideráveis nas proporções de monômero e homodímero, indicando o término da reação. Após 48h o rendimento chega a 66,7% de Htr formado, enquanto 25,5% de Htr-M permanecem sem dimerizar.



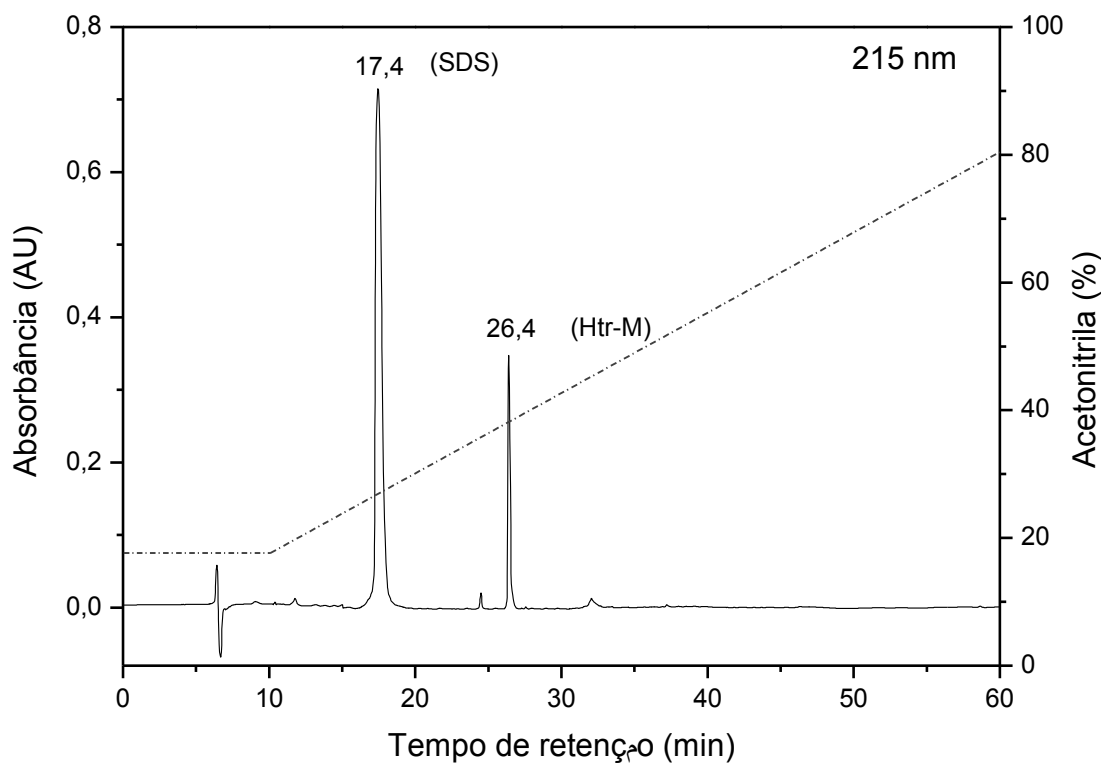
**Figura 43: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em tampão Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5.** Aliquotas injetadas (20µL) em coluna C18 Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (v/v). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Gradiente: 25% de ACN em 1 min, aumentando-se até 58% em 30 min. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  de 215 nm. (Preto) 0h de reação, (azul) 2h de reação, (cinza escuro) 4h de reação, (vermelho) 8h de reação, (vinho) 12h de reação, (alaranjado) 24h de reação e (bege) 48h de reação.



**Figura 44: Variação das concentrações de Htr-M (laranja) e Htr (preto) na reação de dimerização em Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> pH 8,5.**

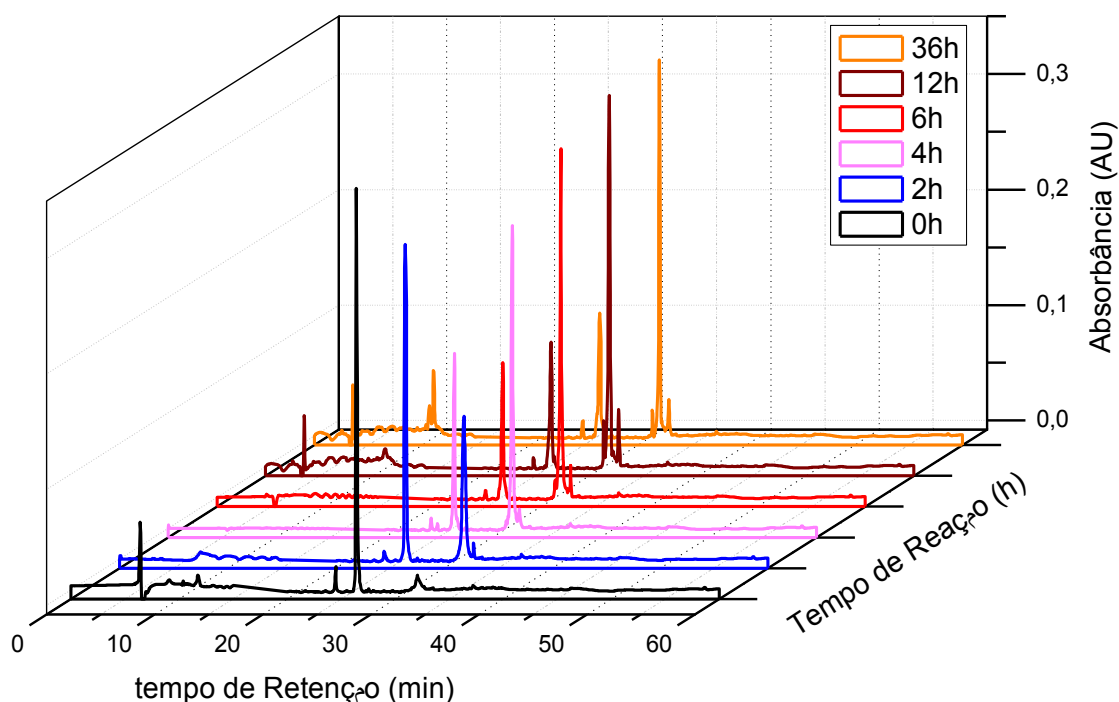
### 4.3.2 Reação de dimerização na presença de micelas SDS

Outro meio utilizado para a reação de dimerização de Htr-M foi uma solução micelar aquosa de SDS. O SDS é um detergente aniônico que, quando acima da CMC  $9,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  e pH entre 5 e 10, é frequentemente utilizado para caracterização, solubilização e estudos de conformação de peptídeos e proteínas (Creighton *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 1983; Xu *et al.*, 2004). Para a reação de dimerização de Htr-M em SDS, foi utilizada uma solução de  $350 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de SDS em Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5. Primeiramente, o gradiente dessa reação teve de ser alterado para que o pico correspondente ao SDS não interferisse no pico correspondente ao monômero. A Figura 45 mostra o cromatograma da injeção de  $20 \mu\text{L}$  de amostra da reação imediatamente após seu início, onde o pico com  $t_r$  de 17,4 min corresponde ao SDS e o pico com  $t_r$  de 26,4 min ao peptídeo Htr-M. Para a construção do gráfico de acompanhamento da reação, foi realizada a subtração do pico correspondente ao SDS devido à sua intensidade elevada, consequência da alta concentração de SDS no meio em relação ao peptídeo, o que melhora a visualização do acompanhamento da reação.



**Figura 45: Perfil cromatográfico mostrando a reação de dimerização no tempo 0 h.** O pico em 17,4 min corresponde ao  $t_r$  do SDS e o pico em 26,4 min, corresponde ao monômero. As condições são as mesmas da Figura 46 (p. 69). A linha tracejada retrata o gradiente utilizado na dimerização.

O resultado do acompanhamento da dimerização, conduzido por cromatografia em fase reversa, é mostrado na Figura 46. Devido à alteração do gradiente, os tempos de retenção do monômero e do homodímero mudaram para 26,4 min e 32,0 min, respectivamente (Figura 46). Novamente, observa-se a formação contínua de Htr e diminuição de Htr-M. Porém, uma análise mais detalhada desse acompanhamento mostra que a dimerização ocorre com uma velocidade superior nas primeiras horas de reação, quando comparada àquela em solução tampão. A Figura 47 (p. 70) mostra a variação das concentrações de monômero e homodímero de acordo com o tempo reacional. É possível observar que, nas duas primeiras horas, o rendimento da reação atinge cerca de 40% e a quantidade de Htr-M sem dimerizar chega a 54,5%. Após 4h não há mais alterações significativas e a quantidade de Htr-M sem dimerizar praticamente manteve-se constante em torno de 30% até às 36h. O rendimento final da reação também se manteve constante após 4h de reação, atingindo rendimentos próximos a 60% até às 36h (Figura 47, p. 70).



**Figura 46: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr na presença de micelas de SDS 350 mmol·L<sup>-1</sup>.** Aliquotas injetadas (20µL) em coluna C18 Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. O gradiente é mostrado na Figura 45 (p. 68). A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  215nm. (Preto) 0h de reação, (azul) 2h de reação, (magenta clara) 4h de reação, (vermelho) 6h de reação, (vinho) 12h de reação e (alaranjado) 36h de reação.



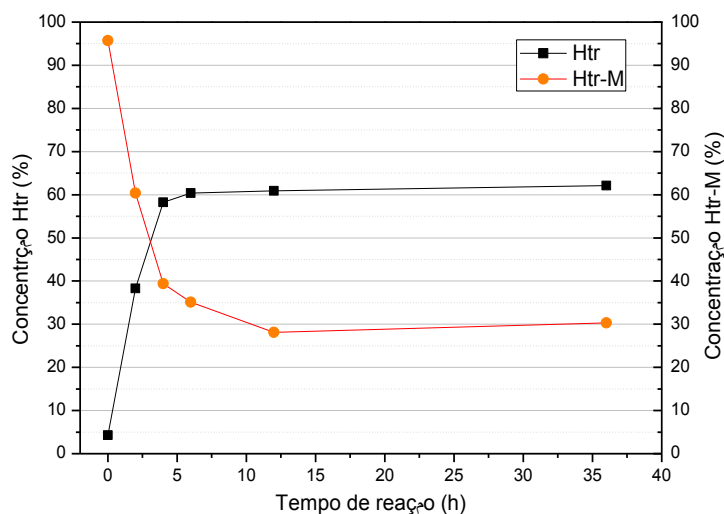


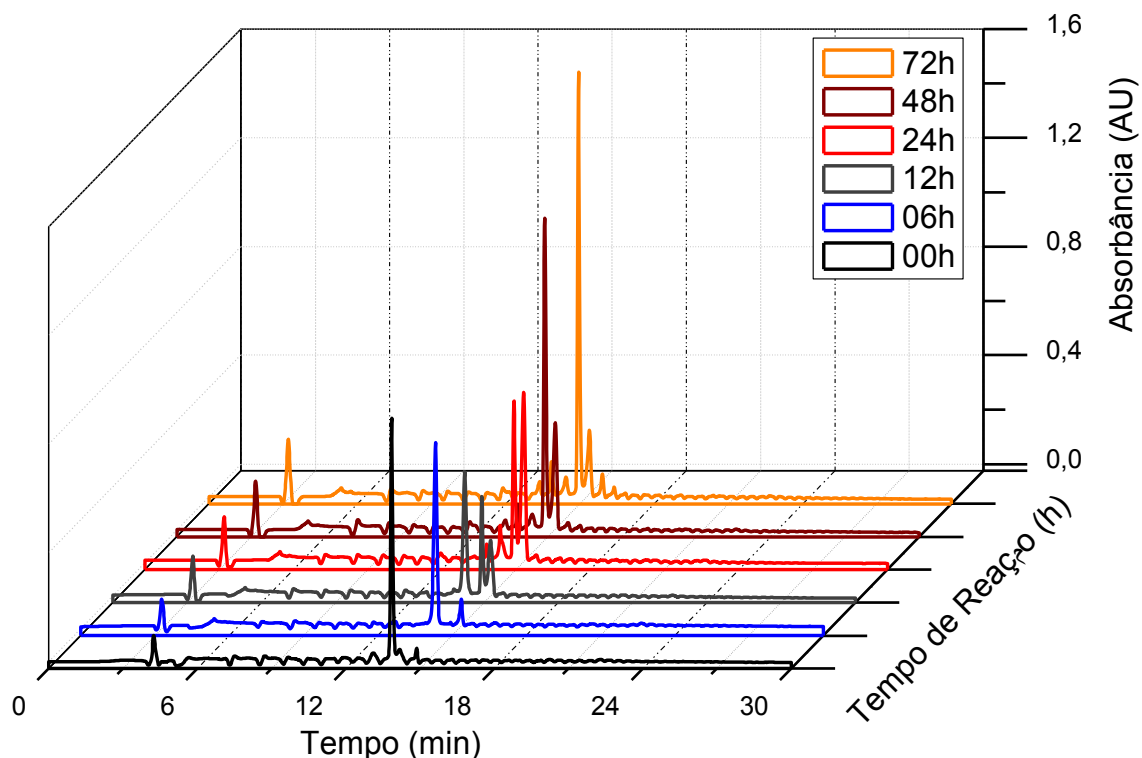
Figura 47: Variação das concentrações de Htr-M (laranja) e Htr (preto) na reação de dimerização em solução contendo micelas de SDS  $350 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4.3.3 Reação de dimerização em TFE:H<sub>2</sub>O

A Figura 48 (p. 71) mostra o acompanhamento da dimerização por cromatografia de fase reversa do monômero Htr-M em solução de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v), na presença de tampão Tris-HCl  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,5.

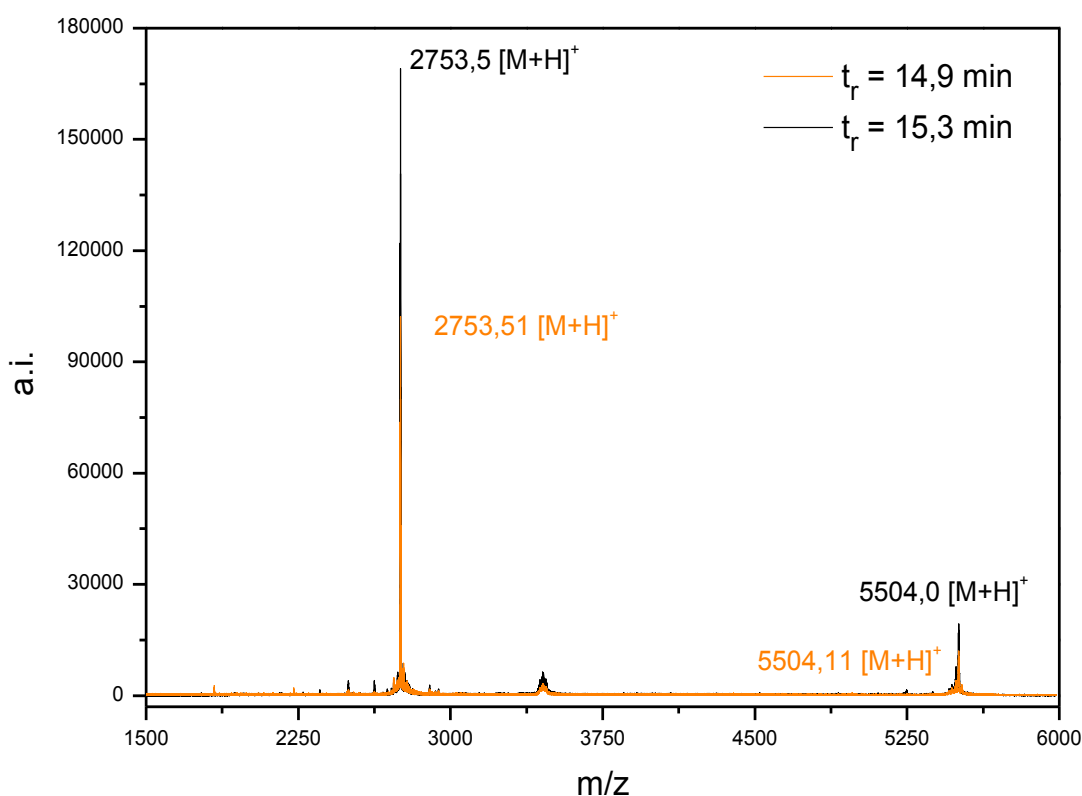
Assim como observado para os demais meios reacionais, em solução de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v), verifica-se a formação do homodímero ( $t_r = 14,9 \text{ min}$ ) e consequente diminuição da concentração da cadeia monomérica ( $t_r = 13,9 \text{ min}$ ). Analisando-se o resultado final da dimerização, observam-se picos bem definidos de Htr-M e Htr nas primeiras 6h e em 72h, quando a reação se completa. O rendimento final, após as 72h, revela um resultado bastante superior àqueles obtidos tanto em solução tampão quanto em micelas de SDS. Entretanto, ao longo da reação, no intervalo de 12 à 48h, nota-se a presença de um terceiro pico com  $t_r$  igual a 15,3 min de intensidade variável. Neste intervalo de tempo as concentrações do monômero e do homodímero são comparáveis, de forma que a quantidade de Htr-M ainda é significativa e grande quantidade de Htr já está formado. Esta análise sugere a formação de oligômeros devido à agregação entre moléculas do monômero e do homodímero, uma vez que a síntese foi conduzida com amostra purificada e apenas as duas espécies estão presentes no meio. Estudos de efeitos de agregação foram encontrados para o peptídeo melitina (Othon *et al.*, 2009), formado por 26 resíduos, o qual apresentou maior grau de agregação em solução de TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v), proporção na qual a helicidade do peptídeo também foi maior. Em

proporções de TFE superiores a 50%, o tamanho dos agregados de melitina foram relativamente menores devido a proporção maior de TFE no meio, o que resulta em um aumento das interações peptídeo-TFE em relação às interações hidrofóbicas peptídeo-peptídeo.



**Figura 48: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v).** Alíquotas injetadas (20  $\mu$ L) em coluna C18 *Vydac* 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. O gradiente foi o mesmo empregado na purificação de Htr-M. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  de 215 nm. (Preto) 0h de reação, (azul) 6h de reação, (cinza escuro) 12h de reação, (vermelho) 24h de reação, (vinho) 48h de reação, (alaranjado) 72h de reação.

Para a verificação desta suposição, os dois produtos referentes aos picos com  $t_r$  de 14,9 min e 15,3 min foram coletados e analisados por espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF). Os espectros obtidos para ambos os produtos foram muito semelhantes em relação aos valores de  $m/z$  e o resultado é apresentado na Figura 49 (p. 72).

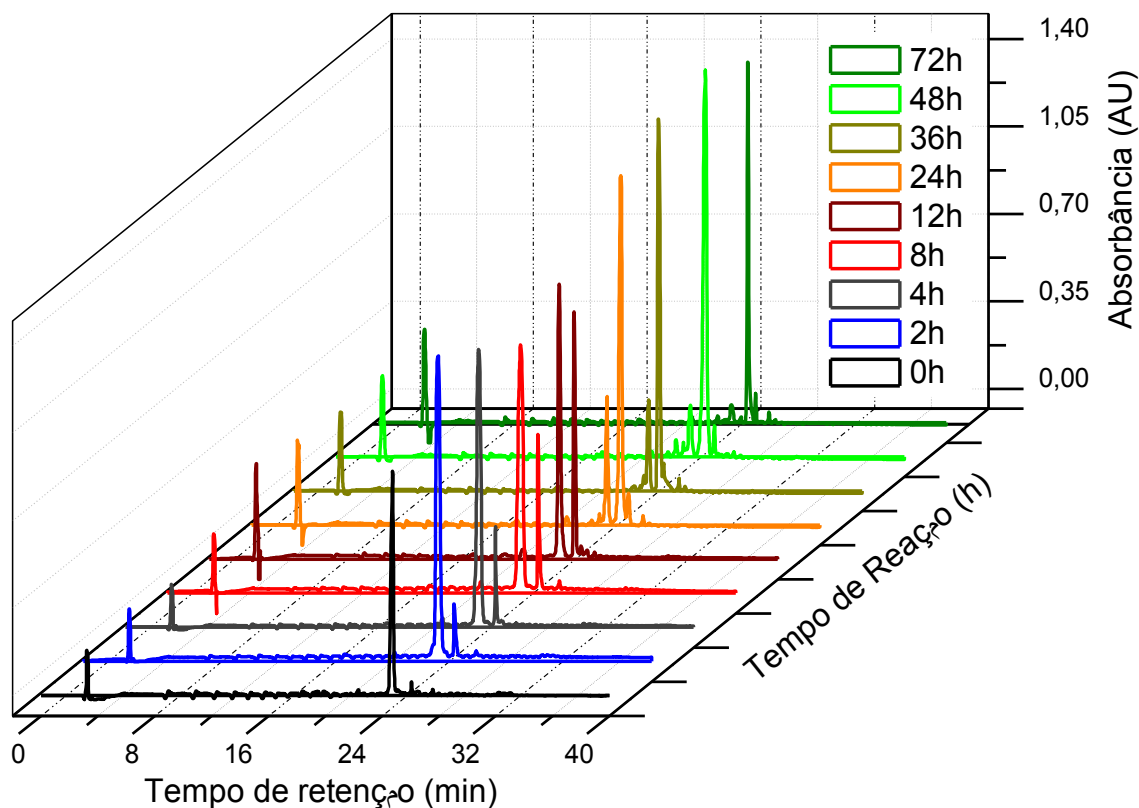


**Figura 49:** Espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) para os picos relativos ao  $t_r$  de 14,9 e 15,3 min. Os dois espectros foram sobrepostos para mostrar a semelhança entre eles. Em laranja, o espectro equivalente à fração do pico de  $t_r = 14,9$  min e em preto o espectro equivalente à fração do pico de  $t_r = 15,3$  min.

A Figura 49 mostra a presença de picos devido aos íons  $[M+H]^+$  de Htr-M e Htr em ambos os espectros, indicando a presença das duas espécies em ambos os picos coletados na CLAE-FR, certificando o efeito de agregação entre as duas moléculas.

A fim de minimizar a formação dos oligômeros durante as análises por CLAE-FR, a reação de dimerização foi repetida nas mesmas condições, porém as alíquotas retiradas da reação e injetadas no cromatógrafo para o acompanhamento cinético foram diluídas vinte vezes e os resultados estão apresentados na Figura 50 (p. 73).

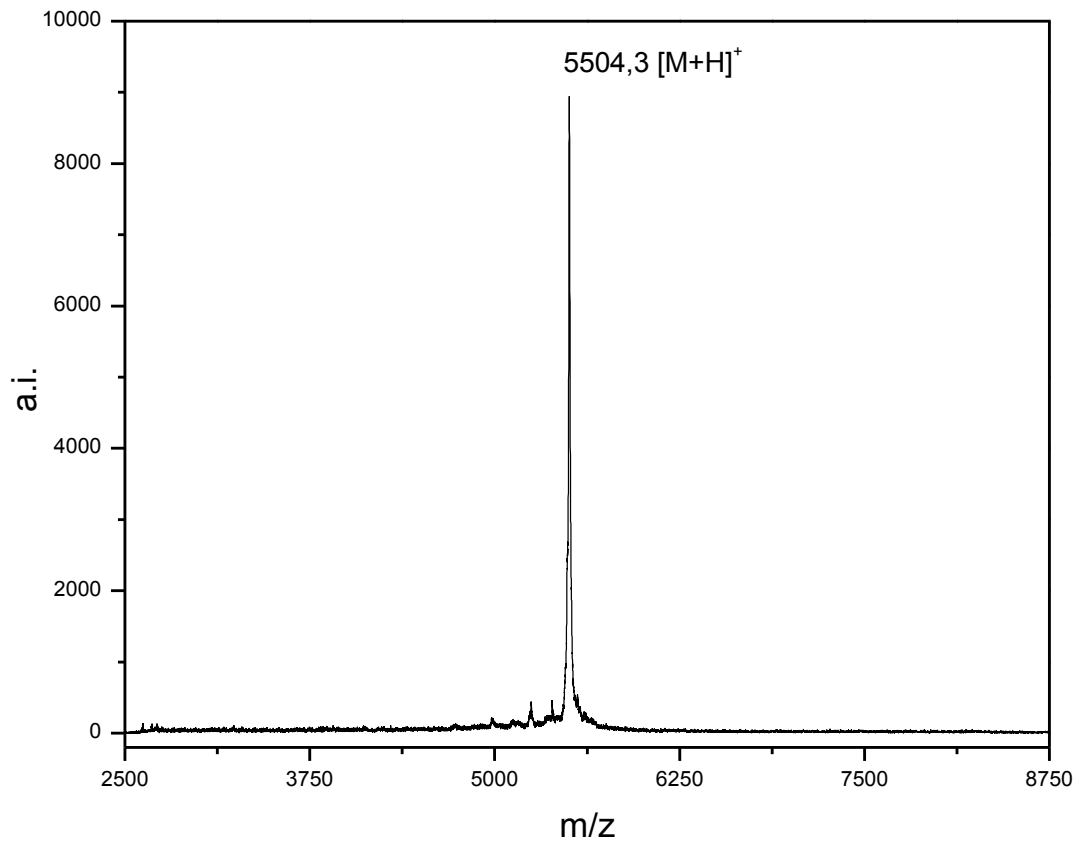
Os resultados da Figura 50 mostram que, após 8h de reação, estavam presentes apenas picos relativos aos peptídeos Htr-M e Htr, não sendo detectados outros picos de intensidade comparável, indicando ausência de agregados entre os peptídeos. O pico correspondente ao monômero apresentou  $t_r$  igual a 22,8 min e o pico relativo ao peptídeo homodímero  $t_r$  igual a 24,0 min. A análise por espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF) do pico referente ao peptídeo Htr (Figura 51, p. 74) revela a presença de apenas um íon  $[M+H]^+$  de  $m/z$  5504,3 Da correspondente ao homodímero.



**Figura 50: Resultados do acompanhamento por cromatografia em fase reversa da obtenção do peptídeo Htr em solução TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v:v) com alíquotas diluídas.** Aliquotas injetadas (20  $\mu$ L) em coluna C18 Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de ACN/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. O gradiente foi o mesmo empregado na purificação de Htr-M. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  de 215 nm. (Preto) 0h de reação, (azul) 2 h de reação, (cinza escuro) 4h de reação, (vermelho) 8h de reação, (vinho) 12h de reação, (alaranjado) 24h de reação, (bege) 36h de reação, (verde) 48h de reação e (verde oliva) 72h de reação.

Durante as primeiras 8 horas de reação, a formação de Htr é gradativa e praticamente constante, porém a quantidade de monômero continua superior a do homodímero. Após 12h é possível verificar uma maior concentração de Htr no meio reacional em relação à Htr-M. A partir desse tempo, o pico referente ao Htr-M se torna cada vez menor e a reação praticamente se completa em 48h, quando a formação do homodímero fica em torno de 85% (Figura 52, p. 75). Após 72h, apenas uma pequena quantidade do monômero permanece sem dimerizar (9%), revelando um rendimento muito superior aos demais meios reacionais estudados. Este rendimento pode ter relação direta com o efeito de agregação, comum para peptídeos anfifílicos, o que há algum tempo vem sendo reportado por diversos trabalhos na literatura (Chaudhary *et al.*, 2011; Ebanks, 2011; MacPhee *et al.*, 1997; Munishkina *et al.*, 2003). Diferentes condições favorecem a formação desses agregados e estes efeitos podem estar

relacionados com a concentração do peptídeo, pH, força iônica, temperatura e presença de solventes orgânicos (Burdick *et al.*, 1992; Chaudhary *et al.*, 2008, 2009; Goux *et al.*, 2004; Harper *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2000).



**Figura 51:** Espectro de massas (MALDI-ToF/ToF) da Htr, obtida para amostra da reação de dimerização em TFE utilizando as alíquotas diluídas.

Estudos recentes mostram ainda que hélices  $\alpha$ , induzidas em soluções aquosas contendo TFE, podem formar diferentes estados de oligomerização (Barnham *et al.*, 1999; Othon *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011), o que também ocorre com Htr-M em solução TFE:H<sub>2</sub>O 40% (v/v). A Figura 53 (p. 75) mostra a estrutura mais estável de Htr-M em solução aquosa contendo TFE (Verly, 2010). Nesse meio, a cadeia monomérica de Htr-M se encontra altamente estruturada em hélice  $\alpha$  e apresenta caráter anfipático com duas faces definidas, uma hidrofílica (azul) e outra hidrofóbica (vermelho), na qual está situado o resíduo Cys-23. A adição de TFE em meio aquoso promove a estabilização da estrutura helicoidal e, na proporção de 40% de TFE:H<sub>2</sub>O, as interações hidrofóbicas entre as faces apolares das hélices dos monômeros predominam em relação às interações peptídeo-solvente, resultando na formação de agregados de Htr-M. Como consequência desta oligomerização, ocorre uma aproximação adequada entre os dois resíduos de Cys de duas cadeias monoméricas diferentes,

favorecendo a formação da ligação de dissulfeto. Esses agregados podem se formar mesmo em pequenas concentrações do monômero, o que explica o maior rendimento da dimerização em TFE.

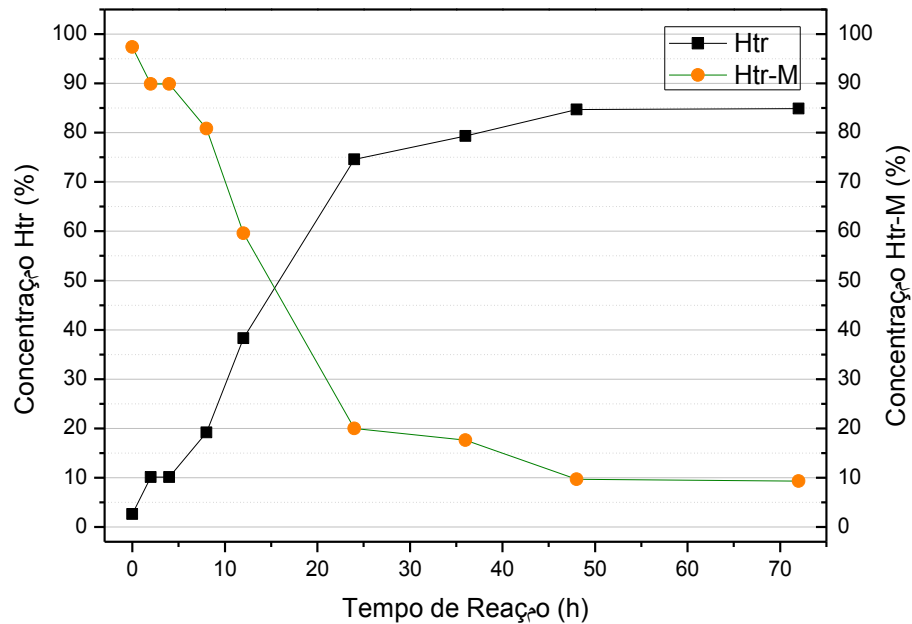


Figura 52: Variação das concentrações de Htr-M e Htr na reação de dimerização em solução TFE:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v).

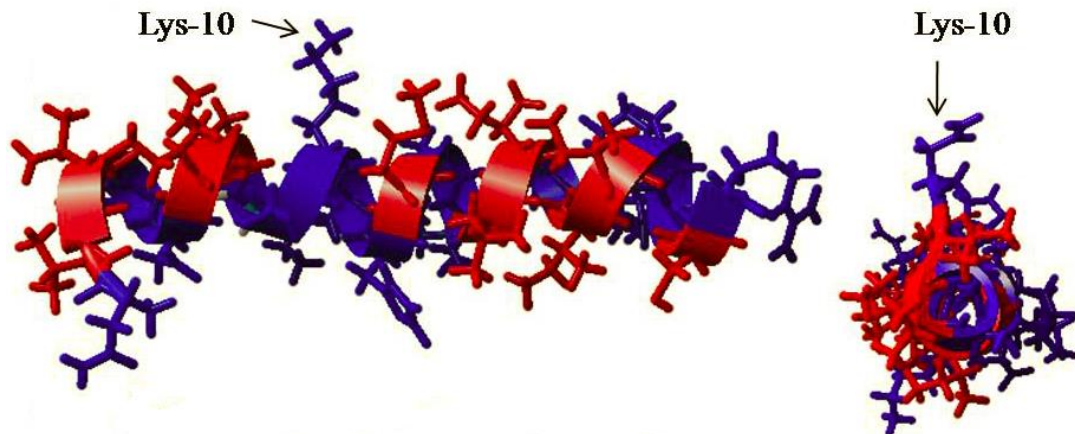


Figura 53: Estrutura calculada de Htr-M em solução TFE:H<sub>2</sub>O 30:70 (v/v) a partir de dados de RMN. (A) Estrutura hélice  $\alpha$  mostrando a face hidrofóbica saindo do plano, com resíduos de aminoácidos apolares em vermelho e os polares em azul. (B) Demonstração frontal da hélice. Figura extraída e modificada de Verly, 2010.

Diferentemente do que ocorre em solução aquosa de TFE, não há indícios de agregação, pelo menos na mesma proporção, em tampão Tris-HCl 100 mmol·L<sup>-1</sup> ou em micelas de SDS 350 mmol·L<sup>-1</sup>. Apesar de proporcionarem ambientes químicos bem diferentes, as reações de dimerização em ambos os meios apresenta rendimentos parecidos

(66 e 62%, respectivamente). Em tampão Tris-HCl Htr-M possui um baixo grau de estruturação com a predominância de estrutura randômica, não havendo a formação de uma região hidrofóbica definida. Conseqüentemente não ocorre a formação de oligômeros, não propiciando uma aproximação entre moléculas de Htr-M de forma adequada para a formação da ligação de dissulfeto. Diferentemente do que acontece em tampão Tris-HCl, em micelas de SDS a cadeia monomérica Apresenta estrutura helicoidal, conforme observado nos resultados obtidos por CD (Figura 41.B, p. 63). Nesse ambiente, formado por micelas de aproximadamente 1,75 nm de raio (Duplâtre *et al.*, 1996), cuja superfície é predominantemente aniônica, Htr-M interage através de sua face hidrofílica carregada positivamente, devido à presença de resíduos de lisina (Lys-10, Lys-11, Lys-15, Lys-21 e Lys-22) e arginina (Arg-24). Por esse motivo a face hidrofóbica do monômero fica exposta no meio, forçando uma interação entre as cadeias monoméricas por essas faces. Entretanto, quando a quantidade de homodímero passa a ser considerável e a concentração de monômeros diminui no meio reacional, poucas moléculas de Htr-M ficam livres em solução devido à interação com as micelas de SDS. Como consequência, o rendimento da reação neste meio é o menor em relação aos demais meios estudados e a formação do homodímero não é mais significativa após 6h de reação. Outro fator que influencia esse baixo rendimento é uma perturbação promovida pelo homodímero às micelas de SDS. As moléculas de Htr interagem fortemente com superfícies aniônicas e, à medida em que são formadas, perturbam a estrutura das micelas alterando seus diâmetros, ou mesmo, causando a destruição parcial destas. Como consequência, moléculas de SDS são liberadas no meio e desfavorecem a interação entre as cadeias monoméricas disponíveis em solução. A maior interação do dímero com superfície aniônica foi comprovado por estudos de espalhamento de luz dinâmico, onde foi possível observar que, à medida que a razão peptídeo/lipídeo é elevada, as vesículas de POPC/POPG (3:1 m/m) sofrem aumento de aproximadamente 10 nm, e após uma razão peptídeo/lipídeo de 0,1 ocorre a destruição das vesículas (Verly, 2010).

#### **4.4 Ensaios de Citotoxicidade de Htr-M e Htr**

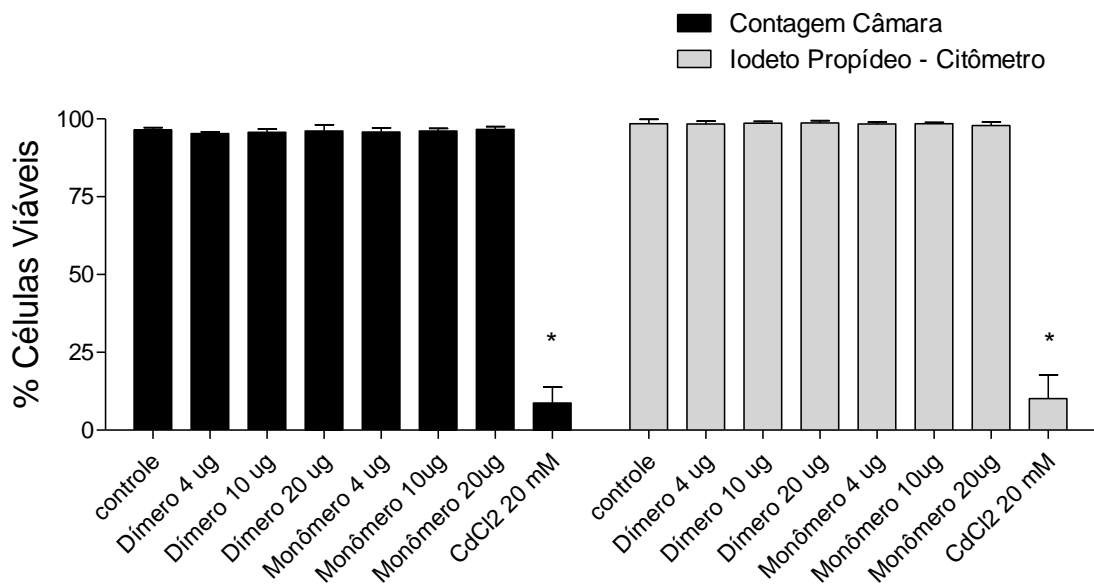
Os peptídeos Htr-M e Htr também tiveram algumas das suas propriedades biológicas investigadas neste trabalho. Foram realizados testes de viabilidade celular através da análise de toxicidade do monômero e do homodímero às células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e também foram feitos estudos para a avaliação da atividade hemolítica desses

peptídeos, ambos utilizando sangue humano de cinco indivíduos ( $n = 5$ ). Esses ensaios de toxicidade foram realizados em concentrações próximas aos ensaios antimicrobianos realizados anteriormente para a Htr e a Htr-M e que revelaram o elevado potencial antimicrobiano da homotarsinina (Verly, 2010). Essas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde da UFVJM e são descritas a seguir.

#### 4.4.1 Ensaios de Toxicidade a Leucócitos Mononucleares

A viabilidade celular foi analisada por exclusão com azul de Tripán e pela técnica de incorporação pelo iodeto de propídeo. A penetração destes corantes na célula indica a perda da integridade de sua membrana citoplasmática. Dessa forma, células viáveis são impermeáveis a estes corantes e permanecem sem coloração.

Após incubação das células com o monômero Htr-M e o homodímero Htr, ambos nas concentrações de 4, 10 e 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , foi feita a análise do percentual de leucócitos mononucleares viáveis e os resultados são mostrados na Figura 54.



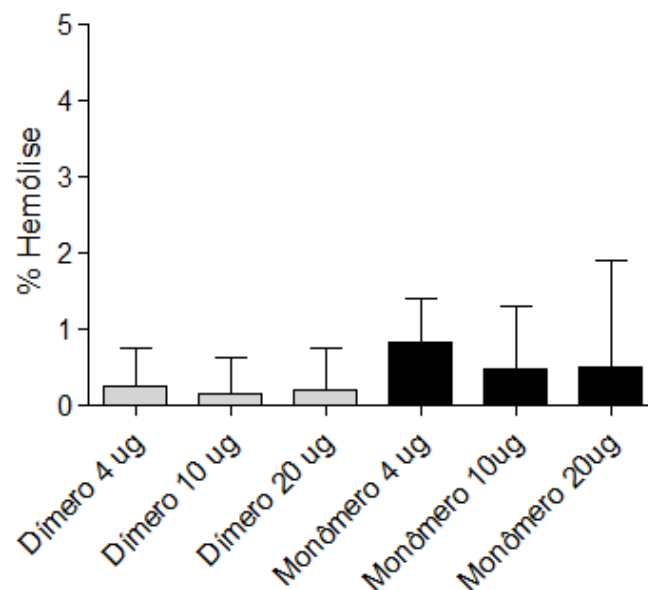
**Figura 54:** Gráfico de viabilidade celular do monômero Htr-M e do homodímero Htr no teste de toxicidade avaliado pela técnica de exclusão de azul de Tripán (em preto) e pela incorporação de iodeto de protídeo (em cinza). A avaliação com o azul de Tripán foi realizada por microscopia óptica pela contagem na câmara de Neubauer e, com iodeto de protídeo, foi realizada por citometria de fluxo.



Como observado, os resultados indicaram que, nas concentrações avaliadas, o monômero Htr-M e o homodímero Htr não alteram a viabilidade da cultura celular quando comparado à cultura controle, mantendo a viabilidade da cultura superior a 96%. Isso indica que nestas concentrações os compostos não são tóxicos aos leucócitos mononucleares. Como controle de morte celular, foi utilizado o cloreto de cádmio que reduziu a viabilidade da cultura para cerca de 10%. Os resultados foram similares nas duas metodologias utilizadas, tanto na exclusão com azul de Tripán quanto na técnica de incorporação com iodeto de propídeo.

#### 4.4.2 Avaliação da Atividade Hemolítica

Também foram feitos ensaios para avaliar se os peptídeos são capazes de causar lise em hemácias. Os resultados da atividade hemolítica para Htr-M e Htr são mostrados na Figura 55.



**Figura 55:** Percentual de hemácias que foram lisadas na presença de Htr-M (em preto) e Htr (em cinza).

Como observado, a média do percentual de hemólise do monômero Htr-M foi ligeiramente maior que a de Htr. Contudo, em todos os casos, essa média foi inferior a 1%, o que indica que os compostos não possuem um potencial hemolítico.

## 5. CONCLUSÃO

---

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência estrutural na cinética de formação da Htr e, ainda, verificar a atividade hemolítica e toxicidade do homodímero em células humanas.

Os resultados de CD mostraram que em todos os meios o análogo do monômero Htr-M apresentou estruturação  $\alpha$  helicoidal, mesmo que em baixo grau. O fato de a estruturação ocorrer em baixo grau em tampão Tris-HCl resultou em um menor rendimento da reação de dimerização neste meio em relação a solução de TFE em água, mostrando que a conformação randômica apresentada pelo monômero não permite uma adequada aproximação entre as cadeias para a formação da ligação de dissulfeto. Por outro lado, mesmo a cadeia monomérica apresentando elevado grau de estruturação em micelas de SDS, a grande interação dos monômeros com a superfície aniônica, juntamente com o tamanho destas micelas, não influenciou, significativamente, no rendimento, porém aumentaram a velocidade da reação. Apesar de a dimerização ocorrer com uma taxa menor em solução de TFE em água, pôde-se observar que a estruturação  $\alpha$  helicoidal, que eleva efeitos de agregação entre cadeias do monômero ao longo da reação, favorece um maior rendimento nesse meio. Dessa forma, os três meios estudados para a dimerização da Htr-M proporcionaram comportamentos conformacionais distintos e, conseqüentemente, uma nova forma de compreender a formação de ligação de dissulfeto em moléculas que apresentam características anfipáticas, como é o caso do monômero Htr-M.

Os ensaios de viabilidade celular através da análise de toxicidade às PBMC e a avaliação da atividade hemolítica revelaram um excelente comportamento do monômero e do homodímero. As concentrações utilizadas foram próximas às dos ensaios antimicrobianos realizados anteriormente para Htr e Htr-M e que revelaram o elevado potencial antimicrobiano da homotarsinina (Verly, 2010). Tanto Htr-M quanto Htr não apresentaram toxicidade e nem atividade hemolítica e, estes dois resultados somados à atividade antimicrobiana, colocam Htr como uma molécula em potencial para atuar como agente antibiótico, merecendo, portanto, ser mais profundamente estudada.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABEDINI, A. & RALEIGH, D. P. Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide. **Organic letters**, 7, 693-696, 2005.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J. & SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Peptide synthesis and applications**, 3-24, 2005.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J. & SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular biotechnology**, 33, 239-254, 2006.

AUVYNET, C. & ROSENSTEIN, Y. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **FEBS Journal**, 276, 6497-6508, 2009.

BACHERE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J.; GARNIER, J. & ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological reviews**, 198, 149-168, 2004.

BARANY, G.; KNEIB, C.; NANCY, M. & DANIEL, G. Solid phase peptide synthesis: a silver anniversary report\*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 30, 705-739, 1987.

BARNHAM, K. J.; CATALFAMO, F.; PALLAGHY, P. K.; HOWLETT, G. J. & NORTON, R. S. Helical structure and self-association in a 13 residue neuropeptide Y Y2 receptor agonist: relationship to biological activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1435, 127-137, 1999.

BARRETT, G. C. & ELMORE, D. T. **Amino acids and peptides**, Cambridge University Press, 2004.

BATISTA, C. V. F.; SCALONI, A.; RIGDEN, D. J.; SILVA, L. R.; RODRIGUES ROMERO, A.; DUKOR, R.; SEBEN, A.; TALAMO, F. & BLOCH, C. A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. **FEBS letters**, 494, 85-89, 2001.

BEDFORD, J.; HYDE, C.; JOHNSON, T.; JUN, W.; OWEN, D.; QUIBELL, M. & SHEPPARD, R. Amino acid structure and “difficult sequences” in solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 40, 300-307, 1992.

BENOITON, N. L. **Chemistry of peptide synthesis**, Taylor & Francis Boca Raton, FL, 2006.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. **Biochemistry: international edition**, WH Freeman & Co. New York, 2006.

BÜCHEL, K. H. & GOODMAN, M. **Synthesis of peptides and peptidomimetics**, G. Thieme, 2003.

BURDICK, D.; SOREGHAN, B.; KWON, M.; KOSMOSKI, J.; KNAUER, M.; HENSCHEN, A.; YATES, J.; COTMAN, C. & GLABE, C. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. **Journal of Biological Chemistry**, 267, 546-554, 1992.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. & PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, 31, 669-675, 2008.

CARDONA, V.; EBERLE, I.; BARTHELEMY, S.; BEYTHIEN, J.; DOERNER, B.; SCHNEEBERGER, P.; KEYTE, J. & WHITE, P. Application of Dmb-dipeptides in the Fmoc spps of difficult and aspartimide-prone sequences. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 14, 285-292, 2008.

CARPINO, L. A. & HAN, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **The Journal of Organic Chemistry**, 37, 3404-3409, 1972.

CASTRO, V.; RODRIGUEZ, H. & ALBERICIO, F. Wang Linker Free of Side Reactions. **Organic letters**, 15, 246-249, 2012.

CHAN, W. C. & WHITE, P. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**, Oxford University Press on Demand, 2000.

CHAUDHARY, N.; SINGH, S. & NAGARAJ, R. Organic solvent mediated self-association of an amyloid forming peptide from  $\beta$ 2-microglobulin: An atomic force microscopy study. **Peptide Science**, 90, 783-791, 2008.

CHAUDHARY, N.; SINGH, S. & NAGARAJ, R. Morphology of self-assembled structures formed by short peptides from the amyloidogenic protein tau depends on the solvent in which the peptides are dissolved. **Journal of Peptide Science**, 15, 675-684, 2009.

CHAUDHARY, N.; SINGH, S. & NAGARAJ, R. Aggregation properties of a short peptide that mediates amyloid fibril formation in model proteins unrelated to disease. **Journal of Biosciences**, 36, 679-689, 2011.

CHEN, Y.-H.; YANG, J. T. & MARTINEZ, H. M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. **Biochemistry**, 11, 4120-4131, 1972.

COIN, I.; BEYERMANN, M. & BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nature protocols**, 2, 3247-3256, 2007.

COLOMBO, R.; COLOMBO, F. & JONES, J. H. Acid-labile histidine side-chain protection: the N( $\pi$ )-t-butoxymethyl group. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 0, 292-293, 1984.

CONLAN, B. F.; GILLON, A. D.; CRAIK, D. J. & ANDERSON, M. A. Circular proteins and mechanisms of cyclization. **Peptide Science**, 94, 573-583, 2010.

CREIGHTON, T. E. & CHASMAN, D. I. **Protein structure: a practical approach**, IRL press Oxford, 1997.

DALLA SERRA, M.; CIRIONI, O.; VITALE, R. M.; RENZONE, G.; CORAIOLA, M.; GIACOMETTI, A.; POTRICH, C.; BARONI, E.; GUELLA, G. & SANSEVERINO, M. Structural Features of Distinctin Affecting Peptide Biological and Biochemical Properties†. **Biochemistry**, 47, 7888-7899, 2008.

DALY, N. L.; ROSENGREN, K. J. & CRAIK, D. J. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 61, 918-930, 2009.

DE AGUIAR AMARAL, P.; NEVES, G.; FARIAS, F. & EIFLER-LIMA, V. L. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 39, 2003.

DENNISON, S. R.; HARRIS, F.; BHATT, T.; SINGH, J. & PHOENIX, D. A. The effect of C-terminal amidation on the efficacy and selectivity of antimicrobial and anticancer peptides. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 332, 43-50, 2009.

DIAS, R. L. A. & CORRÊA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, 24, 236-242, 2001.

DUMY, P.; KELLER, M.; RYAN, D. E.; ROHWEDDER, B.; WÖHR, T. & MUTTER, M. Pseudo-prolines as a molecular hinge: reversible induction of cis amide bonds into peptide backbones. **Journal of the American Chemical Society**, 119, 918-925, 1997.

DUPLÂTRE, G.; FERREIRA MARQUES, M. & DA GRAÇA MIGUEL, M. Size of sodium dodecyl sulfate micelles in aqueous solutions as studied by positron annihilation lifetime spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, 100, 16608-16612, 1996.

EBANKS, K. C. Kinetics of Peptide Aggregation. Dissertation (Magister of Science), Biological Systems Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2011.

EVARISTO, G.; PINKSE, M.; WANG, L.; ZHOU, M.; WU, Y.; WANG, H.; CHEN, T.; SHAW, C. & VERHAERT, P. The chains of the heterodimeric amphibian skin antimicrobial peptide, distinctin, are encoded by separate messenger RNAs. **Journal of Proteomics**, 2012.

FINDLAY, B.; ZHANEL, G. G. & SCHWEIZER, F. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, 4049-4058, 2010.

GARRETT, R. H. & GRISHAM, C. M. **Molecular Aspects of Cell Biology**, Saunders College Pub., 1995.

GAST, K.; SIEMER, A.; ZIRWER, D. & DAMASCHUN, G. Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. **European Biophysics Journal**, 30, 273-283, 2001.

GERLACH, S. L.; BURMAN, R.; BOHLIN, L.; MONDAL, D. & GÖRANSSON, U. Isolation, characterization, and bioactivity of cyclotides from the Micronesian plant *Psychotria leptothyrsa*. **Journal of Natural Products**, 73, 1207-1213, 2010.

GOODMAN, M. & LEVINE, L. Peptide Synthesis via Active Esters. IV. Racemization and Ring-Opening Reactions of Optically Active Oxazolones. **Journal of the American Chemical Society**, 86, 2918-2922, 1964.

GOUX, W. J.; KOPPLIN, L.; NGUYEN, A. D.; LEAK, K.; RUTKOFKY, M.; SHANMUGANANDAM, V. D.; SHARMA, D.; INOUE, H. & KIRSCHNER, D. A. The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. **Journal of Biological Chemistry**, 279, 26868-26875, 2004.

GRANT, G. A. **Synthetic peptides: a user's guide**, Oxford University Press on Demand, 2002.

GUZMÁN, F.; BARBERIS, S. & ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. **Electronic Journal of Biotechnology**, 10, 279-314, 2007.

HARPER, J. D.; WONG, S. S.; LIEBER, C. M. & LANSBURY, P. T. Assembly of A $\beta$  amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. **Biochemistry**, 38, 8972-8980, 1999.

HERMKENS, P. H.; OTTENHEIJM, H. C. & REES, D. Solid-phase organic reactions: a review of the recent literature. **Tetrahedron**, 52, 4527-4554, 1996.

HORTON, H. R.; MORAN, L. A.; OCHS, R. S.; RAWN, J. D. & SCRIMGEOUR, K. G. **Principles of Biochemistry**, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 2006.

HOWL, J. **Peptides Synthesis and Applications**, Humana Press Inc., Totowa, 2005.

HUANG, Y.; HUANG, J. & CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. **Protein & cell**, 1, 143-152, 2010.

HYDE, C.; JOHNSON, T. & SHEPPARD, R. Internal aggregation during solid phase peptide synthesis. Dimethyl sulfoxide as a powerful dissociating solvent. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 1573-1575, 1992.

HYDE, C.; JOHNSON, T.; OWEN, D.; QUIBELL, M. & SHEPPARD, R. Some 'difficult sequences' made easy. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 43, 431-440, 1994.

JANDA, K. Liquid-phase chemistry: recent advances in soluble polymer-supported catalysts, reagents and synthesis. **Chemical Communications**, 1917-1924, 1999.

JENSSEN, H.; HAMILL, P. & HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 19, 491-511, 2006.

JULIANO, L. Química de Peptídeos: Uma Breve Revisão dos Processos de Síntese. **Química Nova**, 13, 3, 1990.

JUNG, S.; DINGLEY, A. J.; AUGUSTIN, R.; ANTON-ERXLEBEN, F.; STANISAK, M.; GELHAUS, C.; GUTSMANN, T.; HAMMER, M. U.; PODSCHUN, R. & BONVIN, A. M. Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra. **Journal of Biological Chemistry**, 284, 1896-1905, 2009.

KAPPE, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, 43, 6250-6284, 2004.

KASSEM, T.; SABATINO, D.; JIA, X.; ZHU, X. & LUBELL, W. D. To rink or not to rink amide link, that is the question to address for more economical and environmentally sound solid-phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 15, 211-218, 2009.

KELLY, S. M.; JESS, T. J. & PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 1751, 119-139, 2005.

KENT, S. B. Chemical synthesis of peptides and proteins. **Annual Review of Biochemistry**, 57, 957-989, 1988.

KIM, K.-H. & SEONG, B. L. Peptide amidation: Production of peptide hormones in vivo and in vitro. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 6, 244-251, 2001.

KIM, J. S.; NAM, M. H.; AN, S. S. A.; LIM, C. S.; HUR, D. S.; CHUNG, C. & CHANG, J. K. Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 25, 90-94, 2011.

KIMMERLIN, T. & SEEBACH, D. '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to  $\beta$ -peptide assemblies\*. **The Journal of Peptide Research**, 65, 229-260, 2005.

KINDRACHUK, J. & NAPPER, S. Structure-activity relationships of multifunctional host defence peptides. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 10, 596-614, 2010.

KING, D. S.; FIELDS, C. G. & FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 36, 255-266, 1990.

KIRSCHNING, A.; MONENSCHEN, H. & WITTENBERG, R. Functionalized polymers—emerging versatile tools for solution-phase chemistry and automated parallel synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, 40, 650-679, 2001.

KNORR, R.; TRZECIAK, A.; BANNWARTH, W. & GILLESSEN, D. New coupling reagents in peptide chemistry. **Tetrahedron Letters**, 30, 1927-1930, 1989.

KOKRYAKOV, V. N.; HARWIG, S. S.; PANYUTICH, E. A.; SHEVCHENKO, A. A.; ALESHINA, G. M.; SHAMOVA, O. V.; KORNEVA, H. A. & LEHRER, R. I. Protegrins:

leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. **FEBS letters**, 327, 231-236, 1993.

KRCHŇÁK, V.; FLEGELOVÁ, Z. & VÁGNER, J. Aggregation of resin-bound peptides during solid-phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 42, 450-454, 1993.

KULLMANN, W. **Enzymatic peptide synthesis**, CRC press Boca Raton, Florida, 1987.

KUPRIN, S.; GRASLUND, A.; EHRENBERG, A. & KOCH, M. H. Nonideality of water-hexafluoropropanol mixtures as studied by X-ray small angle scattering. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 217, 1151-1156, 1995.

LADOKHIN, A. S.; SELSTED, M. E. & WHITE, S. H. CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. **Biochemistry**, 38, 12313-12319, 1999.

LEITE, J. R. S.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, M. I. S.; PRATES, M. V.; BRAND, G. D.; LACAVALA, B. M.; AZEVEDO, R. B.; BOCCA, A. L.; ALBUQUERQUE, S. & BLOCH, C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, 26, 565-573, 2005.

LI, Y.; QU, H.; XIANG, Q.; SU, Z. & HUANG, Y. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, 37 (2), 207-215, 2012.

LORENZÓN, E.; CESPEDES, G.; VICENTE, E.; NOGUEIRA, L.; BAUAB, T.; CASTRO, M. & CILLI, E. Effects of Dimerization on the Structure and Biological Activity of Antimicrobial Peptide Ctx-Ha. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 56, 3004-3010, 2012.

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

MACPHEE, C. E.; PERUGINI, M. A.; H SAWYER, W. & HOWLETT, G. J. Trifluoroethanol induces the self-association of specific amphipathic peptides. **FEBS Letters**, 416, 265-268, 1997.

MAEGAWA, T.; FUJIWARA, Y.; IKAWA, T.; HISASHI, H.; MONGUCHI, Y. & SAJIKI, H. Novel deprotection method of Fmoc group under neutral hydrogenation conditions. **Amino acids**, 36, 493-499, 2009.

MALIK, L.; TOFTENG, A. P.; PEDERSEN, S. L.; SØRENSEN, K. K. & JENSEN, K. J. Automated 'X-Y' robot for peptide synthesis with microwave heating: application to difficult peptide sequences and protein domains. **Journal of Peptide Science**, 16, 506-512, 2010.

MANDAL, S. M.; DEY, S.; MANDAL, M.; SARKAR, S.; MARIA-NETO, S. & FRANCO, O. L. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, 30, 633-637, 2009.



- MARQUARDT, M. & EIFLER-LIMA, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, 24, 846-855, 2001.
- MARTÍNEZ, A. & TRESTON, A. M. Where does amidation take place? **Molecular and cellular endocrinology**, 123, 113, 1996.
- MAXAM, A. M. & GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 74, 560-564, 1977.
- MENDE, F. & SEITZ, O. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Based Solid-Phase Synthesis of Peptide  $\alpha$ -Thioesters. **Angewandte Chemie International Edition**, 50, 1232-1240, 2011.
- MENDE, F.; BEISSWENGER, M. & SEITZ, O. Automated Fmoc-Based solid-phase synthesis of peptide thioesters with self-purification effect and application in the construction of immobilized SH3 domains. **Journal of the American Chemical Society**, 132, 11110-11118, 2010.
- MERGLER, M. & DICK, F. The aspartimide problem in Fmoc based SPPS. Part III. **Journal of Peptide Science**, 11, 650-657, 2005.
- MERGLER, M.; DICK, F.; SAX, B.; WEILER, P. & VORHERR, T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part I. **Journal of Peptide Science**, 9, 36-46, 2003a.
- MERGLER, M.; DICK, F.; SAX, B.; STÄHELIN, C. & VORHERR, T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. **Journal of Peptide Science**, 9, 518-526, 2003b.
- MERKLER, D. J. C-Terminal amidated peptides: Production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity. **Enzyme and Microbial Technology**, 16, 450-456, 1994.
- MERRIFIELD, R. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin\*. **Biochemistry**, 3, 1385-1390, 1964.
- MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85, 2149-2154, 1963.
- METZLER, D. **Biochemistry**, Academic Press, San Diego, USA, 2000.
- MILTON, R. D. L.; MILTON, S. C. & ADAMS, P. A. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, 112, 6039-6046, 1990a.
- MILTON, S. C. & MILTON, R. D. L. An improved solid-phase synthesis of a difficult-sequence peptide using hexafluoro-2-propanol. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 36, 193-196, 1990b.
- MONBALIU, J.-C. M. & KATRITZKY, A. R. Recent trends in Cys-and Ser/Thr-based synthetic strategies for the elaboration of peptide constructs. **Chemical Communications**, 48, 11601-11622, 2012.

MONTAGNER, C., Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas. **Dissertação (Mestrado)**, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFSC, Florianópolis, 2005.

MULLEN, D. G.; VERARDI, R.; PORCELLI, F.; SCALONI, A.; BARANY, G. & VEGLIA, G. Synthesis and characterization of the 47-residue heterodimeric antimicrobial peptide distinctin, featuring directed disulfide bridge formation. **Peptide Science**, 98, 479-484, 2012.

MUNISHKINA, L. A.; PHELAN, C.; UVERSKY, V. N. & FINK, A. L. Conformational behavior and aggregation of  $\alpha$ -synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. **Biochemistry**, 42, 2720-2730, 2003.

MURAKAMI, M.; LOPEZ-GARCIA, B.; BRAFF, M.; DORSCHNER, R. A. & GALLO, R. L. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. **The Journal of Immunology**, 172, 3070-3077, 2004.

MUTTER, M.; NEFZI, A.; SATO, T.; SUN, X.; WAHL, F. & WÖHR, T. Pseudo-prolines (psi Pro) for accessing "inaccessible" peptides. **Peptide Research**, 8, 145, 1995.

NGUYEN, G. K. T.; LIM, W. H.; NGUYEN, P. Q. T. & TAM, J. P. Novel cyclotides and uncyclotides with highly shortened precursors from *Chassalia chartacea* and effects of methionine oxidation on bioactivities. **Journal of Biological Chemistry**, 287, 17598-17607, 2012.

NI, S.; ZHANG, H.; HUANG, W.; ZHOU, J.; QIAN, H. & CHEN, W. The application of an aryl hydrazine linker prevents  $\beta$ -elimination side products in the SPPS of C-terminal cysteine peptides. **Journal of Peptide Science**, 16, 309-313, 2010.

NISSEN, F.; KRAFT, T. E.; RUPPERT, T.; EISENHUT, M.; HABERKORN, U. & MIER, W. Hot or not—the influence of elevated temperature and microwave irradiation on the solid phase synthesis of an affibody. **Tetrahedron Letters**, 51, 6216-6219, 2010.

OTHON, C. M.; KWON, O.-H.; LIN, M. M. & ZEWAİL, A. H. Solvation in protein (un) folding of melittin tetramer–monomer transition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, 12593-12598, 2009.

PALLADINO, P. & STETSENKO, D. A. New TFA-Free Cleavage and Final Deprotection in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: Dilute HCl in Fluoro Alcohol. **Organic letters**, 14, 6346-6349, 2012.

PEARSON, D. A.; BLANCHETTE, M.; BAKER, M. L. & GUINDON, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. **Tetrahedron Letters**, 30, 2739-2742, 1989.

PEDERSEN, S. L.; SØRENSEN, K. K. & JENSEN, K. J. Semi-automated microwave-assisted SPPS: Optimization of protocols and synthesis of difficult sequences. **Peptide Science**, 94, 206-212, 2010.

PEDERSEN, S. L.; TOFTENG, A. P.; MALIK, L. & JENSEN, K. J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. **Chemical Society Reviews**, 41, 1826-1844, 2012.

PLAN, M. R. R.; GÖRANSSON, U.; CLARK, R. J.; DALY, N. L.; COLGRAVE, M. L. & CRAIK, D. J. The cyclotide fingerprint in *Oldenlandia affinis*: elucidation of chemically modified, linear and novel macrocyclic peptides. **ChemBioChem**, 8, 1001-1011, 2007.

PRATES, M. V. Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa Tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica. **Dissertação (Mestrado)**, Departamento de Biologia Molecular, UNB, Brasília, 1999.

RAHMAN, A. & BROWN, C. Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate. **Journal of Applied Polymer Science**, 28, 1331-1334, 1983.

RAIMONDO, D.; ANDREOTTI, G.; SAINT, N.; AMODEO, P.; RENZONE, G.; SANSEVERINO, M.; ZOCCHI, I.; MOLLE, G.; MOTTA, A. & SCALONI, A. A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102, 6309-6314, 2005.

RESENDE, J. M.; MORAES, C. M.; MUNHOZ, V. H. O.; AISENBREY, C.; VERLY, R. M.; BERTANI, P.; CESAR, A.; PILÓ-VELOSO, D. & BECHINGER, B. Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106, 16639-16644, 2009.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L. & HANCOCK, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. **Biochemistry**, 39, 15765-15774, 2000.

RUCZYŃSKI, J.; LEWANDOWSKA, B.; MUCHA, P. & REKOWSKI, P. Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid. **Journal of Peptide Science**, 14, 335-341, 2008.

SAKAKIBARA, S. Chemical synthesis of proteins in solution. **Peptide Science**, 51, 279-296, 1999.

SANTOS, D.; VERLY, R.; PILÓ-VELOSO, D.; DE MARIA, M.; DE CARVALHO, M.; CISALPINO, P.; SOARES, B.; DINIZ, C.; FARIAS, L. & MOREIRA, D. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino acids**, 39, 135-144, 2010.

SCHMIDT, F. **Biochemistry I**, IDG Books Worldwide, Inc., Foster City, USA, 2000.

SELSTED, M. E.; HARWIG, S.; GANZ, T.; SCHILLING, J. W. & LEHRER, R. Primary structures of three human neutrophil defensins. **Journal of Clinical Investigation**, 76, 1436, 1985.

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. **Journal of Biological Chemistry**, 267, 4292-4295, 1992.

SEO, M. D.; WON, H. S.; KIM, J. H.; MISHIG-OCHIR, T. & LEE, B. J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. **Molecules**, 17 (10), 12276-12286, 2012.

SEWALD, N. & JAKUBKE, H. D. **Peptides: chemistry and biology**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.

SIMONETTI, O.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; GOTERI, G.; ORLANDO, F.; MONFREGOLA, L.; DE LUCA, S.; ZIZZI, A.; SILVESTRI, C. & VEGLIA, G. Antimicrobial properties of distinctin in an experimental model of MRSA-infected wounds. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 31, 3047-3055, 2012.

SRIVASTAVA, K. & DAVIS, M. A Comparative Examination of two Fmoc Removal Reagents for Process Improvement to Produce Peptide Drugs, **Peptides for Youth**, Springer, 2009

STEWART, J. M. & YOUNG, J. D. **Solid Phase Peptide Synthesis**, Pierce Chemical Company Rockford, IL, 1984.

SUBIRÓS-FUNOSAS, R.; PROHENS, R.; BARBAS, R.; EL-FAHAM, A. & ALBERICIO, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion . **Chemistry-A European Journal**, 15, 9394-9403, 2009.

TABERA, S.; PÉREZ-SIMÓN, J. A.; DÍEZ-CAMPELO, M.; SÁNCHEZ-ABARCA, L. I.; BLANCO, B.; LÓPEZ, A.; BENITO, A.; OCIO, E.; SÁNCHEZ-GUIJO, F. M. & CAÑIZO, C. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. **Haematologica**, 93, 1301-1309, 2008.

TAM, J. P.; WU, C. R.; LIU, W. & ZHANG, J. W. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. **Journal of the American Chemical Society**, 113, 6657-6662, 1991.

TENCZA, S. B.; CREIGHTON, D. J.; YUAN, T.; VOGEL, H. J.; MONTELARO, R. C. & MIETZNER, T. A. Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 44, 33-41, 1999.

THOMPSON, A.; WHITE, A. R.; MCLEAN, C.; MASTERS, C. L.; CAPPAL, R. & BARROW, C. J. Amyloidogenicity and neurotoxicity of peptides corresponding to the helical regions of PrPC. **Journal of neuroscience research**, 62, 293-301, 2000.

TIERNEY, J. & LIDSTRÖM, P. **Microwave Assisted Organic Synthesis**, Wiley-Blackwell, 2009.

TOFTENG, A. P.; MEHROTRA, A.; LEVI, M. & JENSEN, K. J. Microwave Heating in Solid-Phase Peptide Synthesis: Three Degrees of Automation. **Biopolymers**, 96, 247, 2011.

TROLL, W. & CANNAN, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. **Journal of Biological Chemistry**, 200, 803-811, 1953.

URBAN, J.; VAISAR, T.; SHEN, R. & LEE, M. S. Lability of N-alkylated peptides towards TFA cleavage. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 47, 182-189, 1996.

VERLY, R. M. Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos. **Tese (Doutorado em Química Orgânica)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

WANG, G. **Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies**, CAB International, 2011.

WANG, G.; LI, X. & WANG, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, 37, D933-D937, 2009.

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. **Journal of the American Chemical Society**, 118, 9218-9227, 1996.

XI, X.; LI, R.; JIANG, Y.; LIN, Y.; WU, Y.; ZHOU, M.; XU, J.; WANG, L.; CHEN, T. & SHAW, C. Medusins: A new class of antimicrobial peptides from the skin secretions of phyllomedusine frogs. **Biochimie**, 2013.

XIAO, S.; WANG, C.; LI, J. & LI, F. Folding and assembly of TMD 6-related segments of DMT 1 in trifluoroethanol aqueous solution. **Journal of Peptide Science**, 17, 505-511, 2011.

XU, Q. & KEIDERLING, T. A. Effect of sodium dodecyl sulfate on folding and thermal stability of acid-denatured cytochrome c: A spectroscopic approach. **Protein Science**, 13, 2949-2959, 2004.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 84, 5449-5453, 1987.

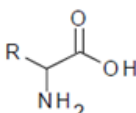
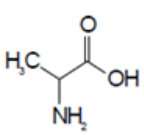
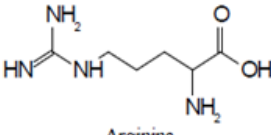
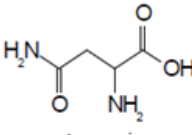
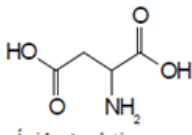
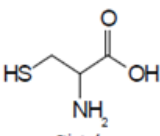
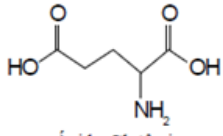
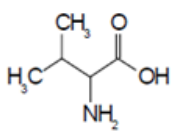
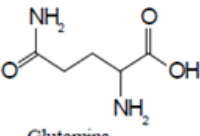
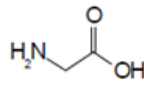
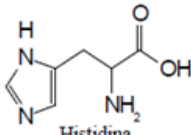
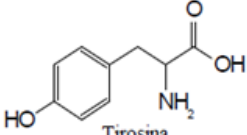
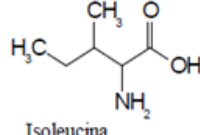
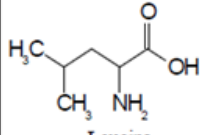
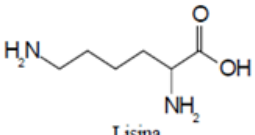
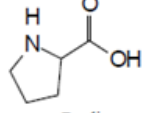
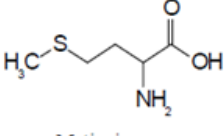
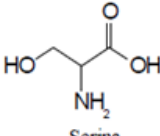
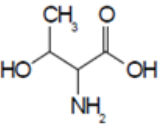
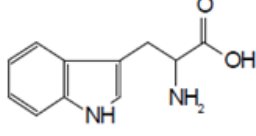
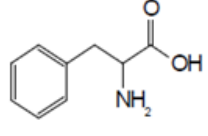
ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, 415, 389-395, 2002.

ZIKOS, C.; LIVANIOU, E.; LEONDIADIS, L.; FERDERIGOS, N.; ITHAKISSIOS, D. S. & EVANGELATOS, G. P. Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, 9, 419-429, 2003.

ZUBAY, G. L.; PARSON, W. W. & VANCE, D. E. **Principles of Biochemistry**, Wm. C. Brown, 1995.

## 7. ANEXOS

## Representação Dos Vinte Aminoácidos Essenciais

<p style="text-align: center;">   <b>Nome</b>  <b>(Abreviação)</b>  <b>Símbolo</b> </p>	 Alanina (Ala) A	 Arginina (Arg) R	 Asparagina (Asn) N	 Ácido Aspártico (Asp) D
	 Cisteína (Cys) C	 Ácido Glutâmico (Glu) E	 Valina (Val) V	 Glutamina (Gln) Q
	 Glicina (Gly) G	 Histidina (His) H	 Tirosina (Tyr) Y	 Isoleucina (Ile) I
	 Leucina (Leu) L	 Lisina (Lys) K	 Prolina (Pro) P	 Metionina (Met) M
	 Serina (Ser) S	 Treonina (Thr) T	 Triptofano (Trp) W	 Fenilalanina (Phe) F

**Tabela de Símbolos e Massas Monoisotópicas de Resíduos de Aminoácidos**

Aminoácidos			Massa média	Massa monoisotópica	Íon Imônio
Glicina	Gly	G	57,052	57,02146	30
Alanina	Ala	A	71,079	71,03711	44
Serina	Ser	S	87,078	87,03203	60
Prolina	Pro	P	97,117	97,05276	70
Valina	Val	V	99,133	99,06841	72
Treonina	Thr	T	101,105	101,04768	74
Cisteína	Cys	C	103,145	103,00919	76
Leucina	Leu	L	113,160	113,08406	86
Isoleucina	Ile	I	113,160	113,08406	86
Asparagina	Asn	N	114,104	114,04293	87
Ácido aspártico	Asp	D	115,089	115,02694	88
Glutamina	Gln	Q	128,131	128,05858	101
Lisina	Lys	K	128,174	128,09496	101
Ácido glutâmico	Glu	E	129,116	129,04259	102
Metionina	Met	M	131,199	131,04048	104
Histidina	His	H	137,141	137,05891	110
Fenilalanina	Phe	F	147,177	147,06841	120
Arginina	Arg	R	156,188	156,10111	129
Tirosina	Tyr	Y	163,176	163,06333	136
Triptofano	Trp	W	186,213	186,07931	159