



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Labaditina e seus Análogos Modificados: Estudos Estruturais, Conformacionais e Interações com Membranas

Simone Cristina Barbosa

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Química

**RIBEIRÃO PRETO - SP
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Labaditina e seus Análogos Modificados: Estudos Estruturais, Conformacionais e Interações com Membranas

Simone Cristina Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa, Simone Cristina

Labaditina e seus Análogos Modificados: Estudos Estruturais, Conformacionais e Interações com Membranas. Ribeirão Preto, 2009
p. 119

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1. Labaditina. 2. Síntese de peptídeos. 3. Purificação. 4. Lipossomos. 5. Conformação

Dedicatória

FAMÍLIA

Ao meu querido pai Francisco Antônio Barbosa que não está mais presente, mas que lutou pra me proporcionar esse dia.

À minha querida mãe Isabel Felipe Barbosa pela coragem, garra e amor, não hesitou em educar. Essa vitória é nossa mãe!

Aos meus irmãos pelo companheirismo, pelas críticas, pela compreensão e amor.

À JESUS por estar presente em todos os momentos da minha vida.

E não posso esquecer do meu querido Átila, pelo companheirismo, pelas babadas, pelas lambidas, pelas alegrias e amor incondicional.

Enfim, Muito obrigada a todos vocês.

Agradecimentos

Ao Profº Dr. Pietro Ciancaglini pela confiança, carinho e em especial pela compreensão nos momentos difíceis. É com muito carinho que agradeço-lhe pela disposição e principalmente pela verdade, em todos os momentos.

Ao Profº Dr. Eduardo Maffud Cilli pela colaboração na realização deste projeto, pelo carinho e dedicação. Reconheço sua importância nesta conquista e é com muito carinho que o agradeço.

Aos amigos e colegas do laboratório Dudu, Maytê, Carol, Bruno, Fernanda, Rosângela, Juliana, Marcelle, Imaculada, Andréia, Taís, Raissa e Torrone pelas alegrias, auxílios e principalmente pela amizade.

Aos meus queridos amigos Crusca, Lentilha, Saulo, Camila Cotrim e Wanessa pelos queridos e inesquecíveis anos de amizade e doação. Muito obrigada meus queridos.

Ao Niltinho, Ivana e Mércia pela disposição e profissionalismo.

À Priscila Cerviglieri Ciancaglini pela correção dos textos em inglês.

Em especial aos meus amigos Elvis e Danilo pelo profundo carinho e cumplicidade nesses anos.

À Leila, sua Família e Marie por estarem presentes num momento tão difícil da minha vida.

À Rotinha, em especial, pelas noites mal dormidas. Foi um ano difícil e poder contar contigo foi muito bom. Muito obrigada.

Ao querido “apto 2” pelas alegrias, bagunças e anos de tantos sustos e risos.

À “Black Out” por me proporcionar em tão pouco tempo momentos tão preciosos.

Aos professores Dr. Luis Gustavo Dias, Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes e Dr. Léo Degreève, da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, pela colaboração, disposição, equipamentos e atenção.

Ao Carlos Fuzo pela colaboração nas simulações por Dinâmica Molecular.

À todos os amigos e colegas que de alguma forma me proporcionaram um momento de alegria, um ombro amigo, esperança, fortalecimento, auxílio ou apenas um sorriso. Muito obrigada.

À FAPESP (Processo Nº 2006/05186-1) pela bolsa de Mestrado concedida.

À FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio técnico e financeiro ao laboratório.

“Em tudo dai graça”

I Tessalonissenses 5:18

Sumário

Índice de Abreviaturas.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	VI
1. Introdução.....	1
1.1 Labaditina.....	1
1.2 Síntese de peptídeos.....	4
1.3 Estrutura Primária e Secundária.....	8
1.4 Dicroísmo Circular.....	10
1.5 Fluorescência.....	16
2. Objetivos.....	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1 Síntese dos peptídeos.....	22
3.2 Clivagem dos peptídeos.....	24
3.3 Ciclização do peptídeo.....	24
3.4 Purificação dos peptídeos.....	25
3.5 Espectrometria de Massas.....	26
3.6 Preparação de lipossomos.....	26
3.7 Determinação do diâmetro dos Lipossomos.....	27
3.8 Determinação da concentração dos peptídeos.....	27
3.9 Ensaios de Fluorescência de Triptofano.....	28
3.10 Supressão de Fluorescência.....	29
3.11 Ensaios de Dicroísmo circular (CD).....	29
3.11.1 Efeito de solventes.....	30
3.11.2 Efeito de Concentração do peptídeo.....	30
3.11.3 Efeito de pH.....	30
3.11.4 Efeito de Temperatura.....	30
3.11.5 Efeito de Variação da TFE.....	30
3.11.6 Efeito da Guanidina.....	31
3.11.7 Efeito da Interação com Lipossomos.....	31
3.12 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	31
3.13 Efeito Hemolítico dos peptídeos.....	32
3.14 Efeito Citotóxico dos peptídeos	33
3.15 Simulação de Dinâmica Molecular (DM).....	33
3.16 Diagrama de Ramachandran.....	34

4. Resultados e Discussão.....	36
4.1 Obtenção e purificação dos peptídeos.....	36
4.1.1 Síntese de peptídeos.....	36
4.1.2 Clivagem.....	39
4.1.3 Ciclização.....	42
4.1.4 Purificação.....	43
4.1.5 Espectrometria de Massas.....	48
4.2 Estudo de interação do peptídeo com interface lipídica.....	52
4.2.1 Avaliação da mudança do diâmetro dos lipossomos por espalhamento.....	52
4.2.2 Atividade hemolítica	56
4.2.3 Avaliação da mudança de fluorescência de triptofano, presente na cadeia peptídica, pela interação com lipossomo.....	58
4.2.4 Supressão de Fluorescência.....	63
4.2.5 Ensaios de Dicroísmo circular (CD).....	69
4.2.5.1 Efeito de solventes.....	69
4.2.5.2 Efeito de Concentração do peptídeo.....	72
4.2.5.3 Efeito de pH.....	75
4.2.5.4 Efeito de Temperatura.....	77
4.2.5.5 Efeito de Variação da TFE.....	78
4.2.5.6 Efeito da Guanidina.....	80
4.2.5.7 Interação com Lipossomos.....	83
4.2.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	86
4.2.7 Efeito Citotóxico dos peptídeos.....	90
4.2.8 Simulação de Dinâmica Molecular (DM).....	90
5. Conclusões.....	95
6. Referências Bibliográficas.....	98

Índice de Abreviaturas

$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima emissão
ϵ	Coeficiente de Extinção Molar
Θ	Elipticidade
Φ	Phi
Ψ	Psi
ΔH	Variação da Entropia
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
Boc	<i>t</i> -Butiloxicarbonila
Bzl	Benzil
CD	Dicroísmo Circular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C _p	Capacidade calorífica a pressão constante
CSC	Calorimetry Sciences Corporation
DCM	Diclorometano
Dic	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N</i> -Etildiisopropilamina
DM	Dinâmica Molecular
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N'</i> – Dimetilformamida
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EDT	1, 2-Etanoditiol
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxcarbonil
F ₀ /F	Intensidade de fluorescência inicial/ intensidade atual
GROMACS	GROnigen MACHine for Simulation
HOBt	<i>N</i> -Hidroxibenzotriazol
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IP	Índice de Polidispersão
K _{sv}	Constante de Stern-Volmer
LPO	Lactoperoxidase bovina
M1-M5	Receptores Muscarínicos

MeOH	Metanol
nAChR	Receptor Nicotínico da Acetilcolina
ODS	Octadecilsilano
P/L	Peptídeo/Lipídeo
PBS	Tampão Fosfato Salino
pI	Ponto Isoelétrico
RNase T1	Ribonuclease T1
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SPFK	Peptídeo Seminalplasmin
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
tBu	<i>t</i> -Butil
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoretanol
Tc	Temperatura de transição
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta

ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS PRESENTES NA LABADITINA E SEUS ANÁLOGOS

A	Alanina
G	Glicina
I	Isoleucina
L	Leucina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano

Resumo

Labaditina é um decapeptídeo cíclico, encontrado em uma planta superior, com elevado caráter hidrofóbico e tem em sua estrutura dois resíduos de triptofano. Este peptídeo tem ganhado grande interesse biológico e farmacológico diante de algumas propriedades, tais como a inibição sobre a ativação da via clássica do sistema complementar humano e poder inibitório da acetilcolinesterase. Entretanto, até o presente momento não é conhecido o alvo nem seu mecanismo de ação. Assim, através da técnica síntese em fase sólida, o peptídeo Labaditina (Lo) e cinco análogos lineares foram obtidos com o objetivo de avaliar tanto a importância da estrutura cíclica bem como o grau de interação do peptídeo com membrana sintética e natural. Assim, o peptídeo L₁ foi planejado como análogo linear da Labaditina (Lo), aberta na posição de uma glicina. Os demais peptídeos (L₂ a L₅) foram planejados trocando um dos triptofanos por leucina, alternadamente. O peptídeo L₁ (análogo linear da Labaditina) foi ciclizado para obtenção do Lo. Os peptídeos foram purificados por CLAE e analisados por espectrometria de massas com pureza acima de 95%.

Inicialmente foi analisada a atividade hemolítica dos diferentes peptídeos empregando-se hemácias como modelo de membrana natural e observou-se que os peptídeos obtiveram baixo índice de hemólise, com valores menores que 8% de liberação de hemoglobina, exceto para o peptídeo L₄ que liberou cerca de 18% na concentração de 10 µg/mL. Com relação a efeitos citotóxicos, apenas o peptídeo Lo apresentou redução da viabilidade para *Streptococcus mutans* (redução de 25% na presença de 5 µM e 56% com 100 µM). Já para bactéria Gram negativa não foi observada citotoxicidade nem para Lo ou L₁ na faixa de concentração de até 100 µM.

Em seguida foi avaliada a interação dos peptídeos com sistemas de lipossomos constituídos de DPPC através de diferentes técnicas, tais como espalhamento de luz, fluorescência, dicroísmo circular (CD). Na primeira abordagem foi avaliada a mudança do diâmetro dos lipossomos e foi observado que os peptídeos Lo e L₁ causaram maior perturbação no sistema, aumentando o diâmetro médio dos lipossomos em cerca de 2 vezes quando comparados aos outros peptídeos. Este efeito pode ser correlacionado à agregação e/ou fusão dos sistemas vesiculares conforme o aumento da concentração do peptídeo em solução. Estes estudos de hemólise e monitoramento do diâmetro dos lipossomos sugeriram que os peptídeos Lo e L₁ tem efeito de interface com sistemas de lipídeos, não causando hemólise, por isso os demais estudos foram realizados comparativamente apenas com a forma linear (L₁) e a cíclica (Lo). Estudos de

fluorescência revelaram que Lo ou L₁ interagem com lipossomos. Conforme o aumento da concentração do peptídeo é observado um decaimento da intensidade de fluorescência do triptofano. Também foi observado um deslocamento para menores valores de λ_{max} de emissão, embora tenha sido maior para Lo. Essa redução do λ_{max} é atribuída à migração do triptofano para um ambiente mais apolar. Assim, através da supressão de fluorescência foram determinadas as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}): para Lo= 13,72 e L₁= 8,48 M⁻¹ na ausência e 2,02 e 4,76 M⁻¹ na presença de lipossomos, respectivamente. Assim, o Lo apresentou menor supressão (valores menores de K_{sv}) resultando em uma maior interação com os lipossomos.

As mudanças conformacionais dos peptídeos foram estudadas por CD e, também, foram feitas simulações por dinâmica molecular (DM). Além disso, foi feito um estudo termodinâmico por calorimetria diferencial (DSC). Os estudos de CD foram realizados em diferentes ambientais, tais como: solventes; pH; temperatura; diferentes concentrações de peptídeo, de guanidina ou de TFE; ou ainda na presença de lipossomos. O peptídeo Lo em meio aquoso ou na presença de lipossomos apresenta uma banda negativa (207 nm) e outra positiva (190 nm) sugerindo que o peptídeo está predominantemente desestruturado nestas condições. Também foi observado um aumento da elipticidade conforme o aumento da concentração do peptídeo, possivelmente devido à saturação dos peptídeos na camada lipídica. Já o espectro de CD do peptídeo L₁ em meio aquoso, é característico de estrutura ao acaso (random coil), uma banda negativa (197 nm) e outra positiva (224 nm). Quando ocorre a interação dos peptídeos com lipossomos é observado um pequeno deslocamento da banda negativa, passando de 197 para 195 nm, e também o desaparecimento da banda positiva 224 nm. Isso se deve, provavelmente, a interação do peptídeo com a camada lipídica, o que resultou no distanciamento dos triptofanos.

Pela técnica de DSC foi observado que a adição de quantidades crescentes de peptídeo Lo nos lipossomos não induz novas transições de fase. No entanto foi observado um deslocamento da temperatura de pré-transição (31,7 para 33,8°C) e da de transição principal (41,0 para 41,4°C), embora isso não tenha sido tão expressivo na transição principal, quando se compara na ausência e presença de 50 µM do peptídeo. Já para o peptídeo L₁ também foi observado um deslocamento da pré-transição (31,7 para 33,1°C) e da temperatura de transição principal (41,0 para 41,3°C), quando se compara na ausência e presença de 50 µM do peptídeo. Observou-se uma maior variação da entalpia (ΔH) para o peptídeo Lo do que para o peptídeo L₁, variando de 50,8 para Lo e

18,2 Kcal/mol para L_1 , sugerindo uma maior inserção de Lo do que L_1 . Assim, pode ser sugerido que tanto Lo quanto L_1 induzem, primeiramente, um efeito de empacotamento do DPPC na superfície dos lipossomos, que é um resultado da inserção do peptídeo na membrana que ocorre com o aumento das concentrações dos peptídeos.

Na estrutura do peptídeo Lo obtido por DM observa-se que os resíduos de triptofano estão distantes, não sofrem interação, já para o peptídeo L_1 , é possível visualizar uma grande aproximação destes resíduos. E este comportamento pode ser confirmado pelos espectros de CD.

Assim, um provável mecanismo de interação da Labaditina, é baseado inicialmente na interação hidrofóbica do peptídeo com a membrana lipídica. Em seguida ocorre a adsorção do peptídeo na superfície lipídica onde os peptídeos estão diretamente em contato. Em seguida, no terceiro passo, ocorre o processo de internalização com conseqüente mudança conformacional do peptídeo. Esse mecanismo pode ser confirmado através de fluorescência onde observamos, inicialmente, uma discreta redução do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão seguida por um patamar constante, conforme o aumento da relação peptídeo/lipídeo, onde ocorre a adsorção na membrana. Após este patamar é observada uma nova redução nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão, atingindo um novo patamar em 339 nm, período de inserção.

Abstract

Labaditin is a cyclic decapeptide found in a superior plant with high hydrophobic character and has two tryptophan residues in its structure. This peptide has attracted a lot of biological and pharmacological interest due to some of its properties, such as the inhibition over the human complementary system classic pathway activation and an inhibitory power over acetylcholinesterase. However, up to now its action mechanism or target is not known. Using the solid phase synthesis technique, the Labaditin peptide (Lo) and five linear analogous were obtained to evaluate the importance of the cyclic structure as well as the peptide's interaction with the synthetic and natural membrane. Hence, L₁ peptide was planed as Labaditin's (Lo) linear analogous open in the position of a glycine. The other peptides (L₂ to L₅) were planed exchanging one of the tryptophan for leucin, alternatively. The peptides were purified by HPLC and analyzed by mass spectroscopy with purity over 95%. The L₁ peptide (Labaditin linear analogous) was cycled to obtain Lo.

Initially, the hemolytic activity of the different peptides was analyzed using Blood cell as a natural membrane model and it was observed that the peptides had a low rate of hemolysis, with values lower than 8% of hemoglobin release, except for L₄ peptide, which released 18% at the 10 µg/mL concentration.

Regarding the cytotoxic effects, only the Lo peptide showed viability reduction for *Streptococcus mutans* (25% reduction in the presence of 55 µM and 56% with 100 µM). Now, for the Gram negative bacterium, no cytotoxicity was observed, neither for Lo or for L₁ in the concentration range up to 100 µM.

Next, the peptide interaction with DPPC constituted liposomes was evaluated through different techniques, such as light scattering, fluorescence, circular dichroism (CD). On the first approach the hydrodynamic diameter change of the liposomes was evaluated and it was observed that Lo and L₁ peptides had caused the most disturbances in the system increasing the average diameter of the liposomes about two fold when compared to the other peptides.

This effect can be correlated with the vesicular systems aggregation and/or fusion with the increase of the concentration of peptide in solution. These hemolysis' studies and liposome diameter monitoring have suggested that the Lo and L₁ peptides have interface effect with lipid systems, not causing hemolysis and, because of that the following studies were done comparatively only with the linear form (L₁) and the cyclic form (Lo).

Fluorescence studies have revealed that Lo or L₁ interact with liposomes. As the peptide concentration increases, a decline in tryptophan fluorescence intensity was observed. It was also observed that a shift to lower values of λ_{max} emission, although it was higher for Lo. This λ_{max} reduction is attributed to tryptophan migration to a more apolar environment. Then, through fluorescence suppression, Stern-Volmer (K_{sv}) constants were determined: for Lo= 13.72 and L₁= 8.48 M⁻¹ in the absence and 2.02 and 4.76 M⁻¹ in the presence of liposomes, respectively. Lo has shown smaller suppression (smaller values of K_{sv}) resulting in a bigger interaction with the liposomes.

The peptide's conformational changes were studied by CD and molecular dynamic simulations (DM) were done. Besides that, a thermodynamic study by differential calorimetry was done (DSC). The CD studies were done with different environments, such as: solvents, pH, and temperature, different concentrations of peptide, of guanidine or of TFE; or yet, in the presence of liposomes. The Lo peptide in aqueous medium or in the presence of liposomes shows a negative spectroscopic band (207 nm) and another, positive (190 nm), suggesting that the peptide is predominantly unstructured in these conditions. It was also observed that an ellipticity increase as the peptide concentration increases, possibly due to the peptides' saturation in the lipidic layer. The CD spectra for the L₁ peptide in aqueous medium is characteristic of random coil, a negative band (197 nm) and a positive one (224 nm). When the peptide's interaction with liposomes occurs, a small shift in the negative band is observed, going from 197 to 195 nm and the disappearance of the positive 224 nm band was observed. This is, probably, due to the peptide interaction with the lipidic layer that resulted in the tryptophanes distancing.

By the DSC technique, it was observed that the addition of increasing quantities of the Lo peptide in the liposomes does not induce new phase transitions. However, a pre-transition shift (31.7 to 33.8°C) and of the main transition temperature was observed, although this has not been as expressive it the mains transition, when it is compared in the absence and presence of 50 μM of peptide. For the L₁ peptide, a pre-transition (31.7 to 33.1°C) and a main transition temperature (41.0 to 41.3°C) shift were also observed when compared in the absence and presence of 50 μM of peptide. A higher enthalpy variation (ΔH) was observed for Lo peptide than for L₁ peptide, varying from 50.8 for Lo and 18.2 Kcal/mol, suggesting a bigger Lo insertion than for the L₁ peptide. Hence, it can be suggested that Lo as much as L₁ induce, first, a packing DPPC effect on the liposome surface, which is a result of the peptide insertion in the

membrane that occurs with the increase of peptides' concentrations. In the Lo peptide structure obtained by DM, it is observed that the tryptophan residues are distant, do not suffer interaction. As for L₁ peptide, it is possible to visualize a big approximation of these residues. And this behavior can be confirmed by the CD spectra as much as by the Ramachandran diagrams.

Then, a probable interaction mechanism of Labaditin is initially based in the hydrophobic interaction of the peptide with the lipidic membrane. Next, the peptide adsorption on the lipidic surface occurs, where the peptides are directly in contact with the lipids. Then, in a third step, the internalization process occurs with the consequent conformational change of the peptide. This mechanism can be confirmed through fluorescence, where we observed, initially, a discrete reduction of the emission λ_{max} followed by a constant plateau, as the peptide/lipid ratio is increased, where the membrane adsorption occurs. After this plateau, a new reduction in the emission λ_{max} values is observed, reaching a new plateau at 339 nm, insertion period.

1. Introdução

1.1 Labaditina

A Labaditina é uma macromolécula, peptídica, encontrada em plantas superiores do gênero *Jatropha*, da família *Euphorbiaceae*, sendo também conhecida popularmente por *Jarak gurita* (Indonésia) e *Mana* (Filipinas). Fitoquimicamente, esse gênero é reconhecido por possuir numerosas classes de metabólitos secundários como alcalóides, terpenos, lignanas e mais recentemente os peptídeos cíclicos. Estas moléculas isoladas da biomassa vegetal apresentam atividade antimicrobiana (MENEZES e JARED, 2002; REDDY et al., 2004), antitumoral (JOHANSSON, 2001), citotóxica (AKÉ et al., 2004), anti-HIV (DALY et al., 1999; CRAIK et al., 1999).

Os peptídeos cíclicos pertencem ao grupo *Caryophyllaceae* (ZHOU et al., 1999). Uma das características dessas biomoléculas é a presença de 7 a 10 resíduos com alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos (AUVIN et al., 1997). Bioboleína (9 resíduos) e Labaditina (10 resíduos), isolados de *Jatropha Multifida*, foram os primeiros peptídeos cíclicos desse grupo a serem descritos na literatura (KOSASI et al., 1999).

Estudos demonstraram que a Labaditina apresentou poder inibitório sobre a ativação da via clássica do sistema complementar humano explicando a utilização da planta como antiinflamatório na medicina popular (BARAGUEY et al., 1998). Adicionalmente, em estudo recente (BARBOSA et al., 2006) a Labaditina revelou expressivo poder inibitório da acetilcolinesterase (MARSTON et al., 2002). A descoberta de compostos com atividade anticolinesterásica é de grande importância, pois eles aumentam a função colinérgica central, e podem ser utilizados no tratamento da doença de Alzheimer e também em crianças com retardamento mental, buscando

aumentar a sua capacidade cognitiva (TREVISAN e MACEDO, 2002).

Algumas drogas anticolinesterásicas empregadas para o tratamento da doença de Alzheimer têm em comum a habilidade de inibir a degradação da acetilcolina, estas são denominadas drogas colinérgicas indiretas (GIACOBINI et al., 2000). Tal ação aumenta a concentração sináptica de acetilcolina (neurotransmissor), prolongando a ação de acetilcolina nos receptores.

Alternativamente estudos demonstraram que anticolinesterásicos, incluindo organofosforados e carbamatos, também agem diretamente no receptor nicotínico da acetilcolina (nAChR), mecanismo de ação neurotóxica direta (STORCH et al., 1995; NAGATA et al., 1997). Estudos demonstraram que a Galantamina, fármaco anticolinesterásico, não altera a atividade dos receptores M1-M5, confirmando que ela modula seletivamente a atividade de nAChRs (SAMOCHOCKI et al., 2003).

Tais mecanismos de ação podem fazer que estas drogas aumentem a neurotransmissão colinérgica nicotínica, ou seja, são drogas de terapia sintomática da doença de Alzheimer e de outras formas de demência que estão associadas com o déficit nicotínico (SAMOCHOCKI et al., 2003). Os receptores nicotínicos são canais de íons, o que torna a resposta mais rápida quando comparados ao receptor muscarínico, que trabalha em cascata até um mensageiro secundário.

Outra importante característica do peptídeo Labaditina é a composição de aminoácidos, uma vez que possui dois resíduos de triptofano na sua estrutura. De acordo com RIDDER et al. (2005) o triptofano tem papel fundamental na interação da biomolécula com membranas biológicas. Segundo estes autores, a substituição do resíduo por outro, também hidrofóbico, diminui significativamente a interação do peptídeo com a membrana.

Assim, devido a grande capacidade de interação com membrana (XIAO e PEI,

2008), estes peptídeos têm ganhado um grande interesse biológico e farmacológico. Embora sua aplicação terapêutica possa se associar a problemas como a baixa solubilidade em água levando a uma baixa absorção, biodisponibilidade e alta agregação da amostra. Para superar a baixa solubilidade de algumas drogas, certos solventes orgânicos são usados na formulação desses compostos, tal como etanol, ou ainda compostos derivados de óleo de rícino polietoxilado (TORCHILIN, 2004).

Os peptídeos cíclicos são também mais resistentes a degradação proteolítica que seu análogo linear, falta de grupos N ou C-terminal e reduzida liberdade conformacional (XIAO e PEI, 2007). Além disso, a menor entropia associada com essa maior rigidez faz estas biomoléculas terem maior afinidade e especificidade com receptores (REZAI et al., 2006; XIAO e PEI, 2007).

Com base nas atividades biológicas exibidas, a Labaditina pode ser considerada como um interessante protótipo no desenvolvimento de novos fármacos. Aliado às técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida, o estudo de pequenos peptídeos cíclicos mostra-se uma poderosa vertente devido, principalmente, à facilidade de obtenção e às diversas modificações estruturais possíveis na cadeia original do peptídeo, possibilitando o desenvolvimento de moléculas mais bioativas. Uma das estratégias viáveis para o conhecimento mais detalhado dos mecanismos de ação e interação dos compostos peptídicos é o estudo com sistemas de membranas naturais (hemácias) e artificiais (lipossomos) (NAKAMURA et al., 1998; ANDERLUH et al., 1999). O conhecimento da relação estrutura-atividade da Labaditina e seus análogos é um fator importante para desvendar a forma mais comum que a molécula assume enquanto exerce sua atividade (AUVIN-GUETTE et al., 1999), pois seu modo de ação ainda não foi elucidado.

Uma das ferramentas utilizadas é espectroscopia de fluorescência do

triptofano, sendo útil para identificar mudanças estruturais dessas biomoléculas e sua interação com membranas. Isto é possível devido à alta sensibilidade do fluoróforo indol ao ambiente que o cerca (CHATTOPADHYAY e LONDON, 1987; CHEN e BARKLEY, 1998; POWL et al., 2003).

1.2 Síntese de peptídeos

A química de peptídeos tem demonstrado grande utilidade para a pesquisa básica, pois esses compostos podem ser usados para estudos das propriedades estruturais e das funções biológicas de proteínas e peptídeos.

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi desenvolvida por MERRIFIELD (1963), mas somente em 1984 ele foi agraciado com o Prêmio Nobel em Química (MARQUARDT e EIFLER-LIMA, 2001). Essa técnica baseia-se no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir da região amino-terminal. A região carboxi-terminal, por sua vez, encontra-se presa covalentemente a uma resina. Este tipo de síntese de peptídeos foi publicada em diversas revisões (BARANY e MERRIFIELD, 1980; STEWART e YOUNG, 1984; ATHERTON e SHEPPARD, 1989; ALBERICIO, 2000).

Existem dois protocolos básicos principais para a síntese *in vitro* de peptídeos em fase sólida: a química Boc e a química Fmoc.

No protocolo da química Boc, a região N-terminal do aminoácido é protegida pelo grupo ácido lábil *t*-butiloxicarbonila (Boc), enquanto as cadeias laterais dos aminoácidos são protegidas por grupamentos do tipo benzil e hexil. A síntese se baseia em passos cíclicos de acoplamento, desproteção. Cada passo de desproteção resulta da clivagem do grupo Boc do aminoácido ligado à resina pela ação do ácido trifluoroacético (TFA), liberando o grupo α -amino livre para o próximo passo de

acoplamento. A clivagem final do peptídeo da resina é realizada por meio da reação da peptidil-resina com ácido fluorídrico (HF) anidro e supressores de reação colateral. A necessidade de manipulação de ácidos fortes, principalmente o HF e possibilidade da degradação de aminoácidos sensíveis como o triptofano, são as principais desvantagens desta técnica.

Na química Fmoc, a proteção do grupo amino é feita pelo 9-fluorenilmetiloxcarbonil (Fmoc) e as cadeias laterais dos resíduos são protegidas por grupos *terc*-butil, tritil e *terc*-butiloxicarbonila, entre outros. O grupo Fmoc tem a vantagem de ser base-lábil, ou seja, para a desproteção do grupo amino a resina ligada ao peptídeo protegido é colocado em contato com uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF (Figura 1), uma mistura de fácil manipulação. Além disso, a clivagem da ligação peptídeo-resina é realizada pelo TFA, fato que não é possível na química Boc, devido aos passos de desproteção. Desta forma, se evita a utilização do HF. O funcionamento de ambos os protocolos pode ser resumidamente descrito na Figura 2.

O acoplamento é realizado pela ativação dos grupos carboxila do aminoácido que será acoplado com *N,N'*-diisopropilcarbodiimida/*N*-Hidroxibenzotriazol (DIC/HOBt), tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio/*N*-Hidroxibenzotriazol/ *N*-etil-diisopropilamina (TBTU/HOBt/DIEA). A desproteção do grupo Fmoc base - lábil é efetivada pela lavagem em solução 20% piperidina/DMF, durante 20 minutos. Entre cada passo são efetuadas lavagens subsequentes com os solventes *N,N* - Dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM).

Após cada etapa de acoplamento é efetuado teste de ninidrina (Figura 3) que, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres liberando um composto de cor azul (STEWART e YOUNG, 1984). Este teste é adequado para indicar a presença de

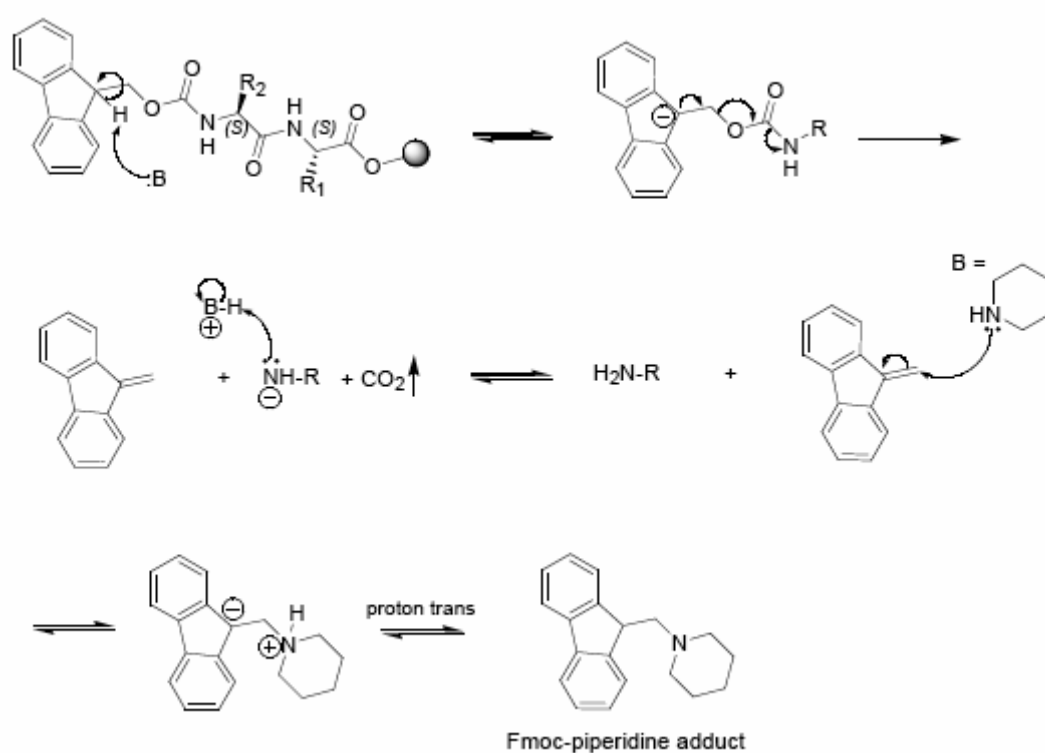


Figura 1: Mecanismo de desproteção do grupo amino-terminal do peptídeo protegido com o grupo base-lábil Fmoc. Desproteção realizada com solução de piperidina 20% (v/v) em DMF (esquema retirado de: www.chempep.com/ChemPep-peptide-synthesis.htm).

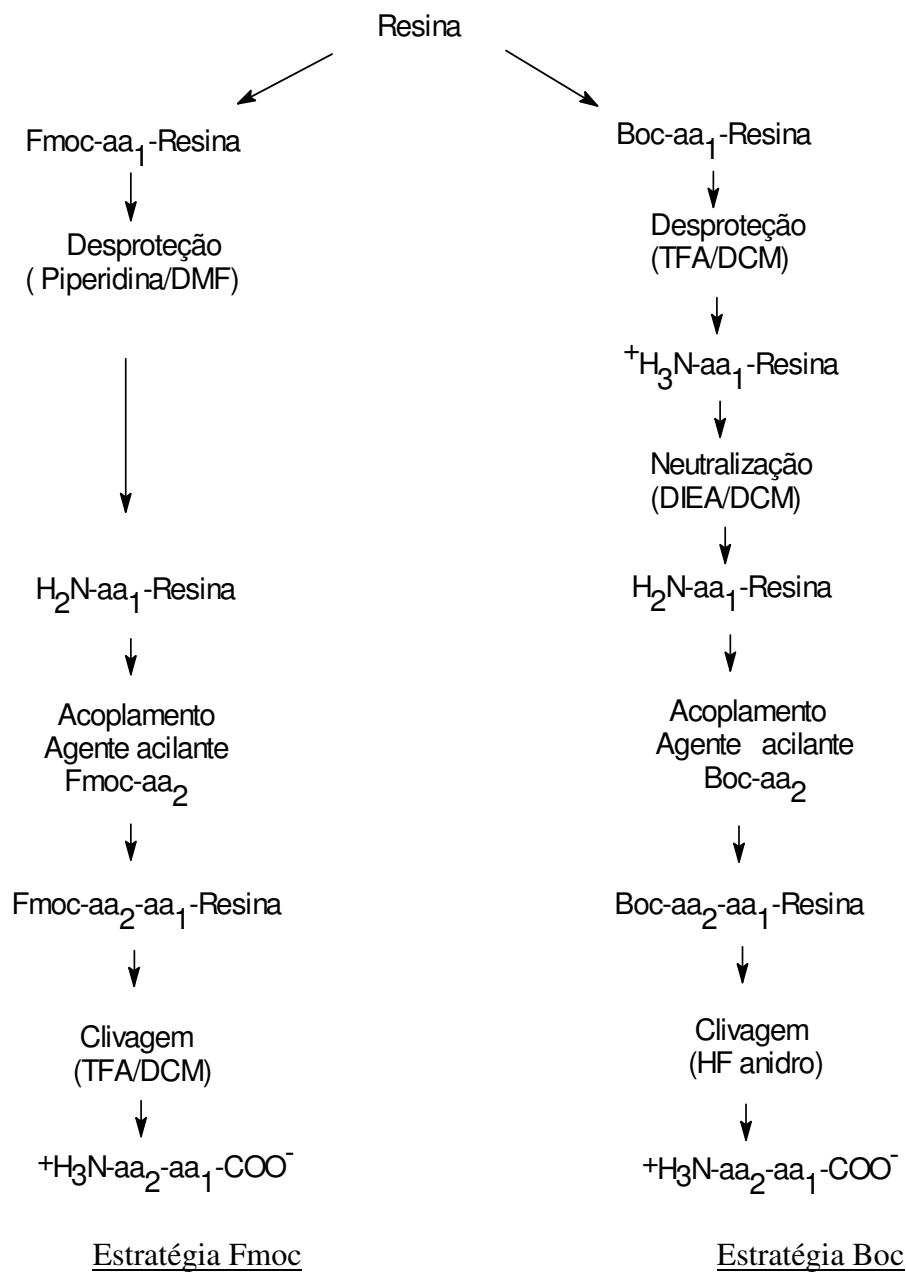


Figura 2: Esquema de síntese de peptídeos em fase sólida utilizando os protocolos Boc/Bzl e Fmoc/tBu (BARANY e MERRIFIELD, 1980; ATHERTON e SHEPPARD, 1989; ALBERICIO, 2000).

grupos amino livres e, portanto, indicativo da eficiência das etapas de acoplamento. Este procedimento aumenta significativamente o rendimento final da síntese peptídica.

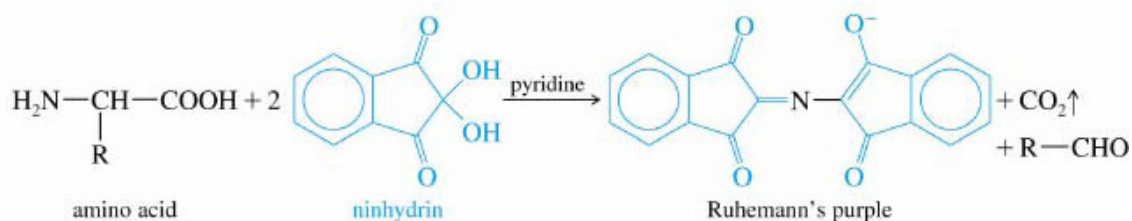


Figura 3: Reação do grupo α -amino de aminoácido e peptídeos com ninidrina, usada para monitorar acoplamento dos aminoácidos (STEWART e YOUNG, 1979).

A clivagem do peptídeo ao final da síntese é realizada com o ácido trifluoracético na presença de compostos que minimizam reações colaterais, como por exemplo o coquetel contendo água 5%; fenol 5%; 1,2-Etanoditiol (EDT) 2,5%; tioanisol 5%; TFA 82,5% (KING et al., 1990).

1.3 Estrutura Primária e Secundária

Peptídeos são formados por subunidades chamadas aminoácidos. A ordem dessas subunidades em uma cadeia peptídica (do grupo N-terminal para o grupo C-terminal) é denominada estrutura primária. A estrutura primária distingue os diferentes peptídeos, afetando todas as propriedades químicas e biológicas destas moléculas.

A ligação peptídica é formada entre um grupo α -carboxila de um resíduo e um grupo α -amino de outro resíduo. A ligação C-N apresenta caráter parcial de dupla ligação resultante do efeito de ressonância presente entre os átomos O-C-N

(BRANDEN e TOOZE, 1991). O esqueleto peptídico resultante é uma série de planos, o que impõem restrições importantes no número de conformações que uma proteína pode adotar. Assim, a estrutura principal da cadeia peptídica pode ser descrita em termos dos ângulos de rotação ou diedrais (Figura 5). Rotação da ligação C_{α} -N é indicada pelo ângulo Φ e a rotação do C_{α} -C pelo Ψ .

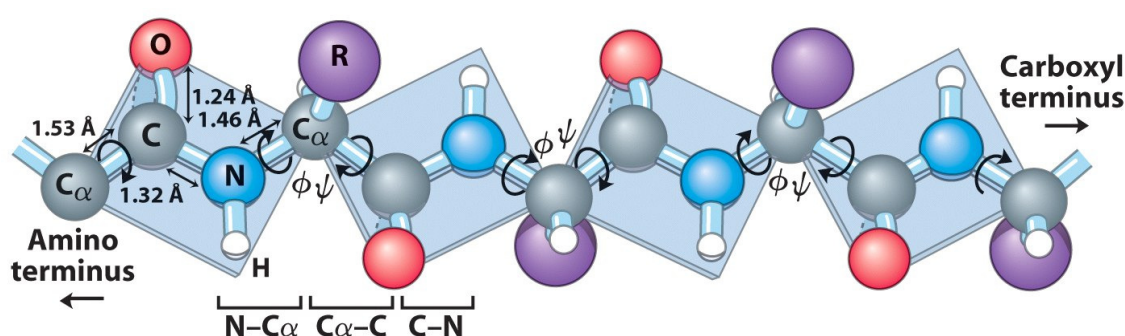


Figura 5: Representação dos ângulos de rotação ψ e Φ da cadeia principal peptídica (NELSON e COX, 2002).

Há alguns diferentes tipos de forças não covalentes envolvidas na estabilização da conformação peptídica. A força primária é a ligação de hidrogênio. As outras são a interação hidrofóbica, a ligação eletrostática e as forças de van der Waals. A ligação de hidrogênio pode ocorrer entre os resíduos de aminoácidos e, também, devido a isso a cadeia peptídica pode arranjar-se conforme determinados padrões de estruturas características, o que denominamos estrutura secundária. Os três tipos principais de estrutura secundária são a α -hélice, a folha- β e a dobra- β , (Tabela 1), onde cada conformação apresenta seus ângulos diedrais característicos (CEIGHTON, 1993). Esses valores dos ângulos diedrais Φ e Ψ , quando distribuídos em diagrama, constitui uma ferramenta de caracterização quantitativa importante no estudo conformacional

de proteínas e peptídeos, denominada diagrama de Ramachandran.

Tabela 1: Ângulos de rotação típicos para comuns estruturas secundárias (STRYER, 1996).

Conformação	Ângulos diedrais	
	Φ	Ψ
α -Hélice-mão direita	57	-47
α -Hélice-mão esquerda	-49	-26
Folha- β antiparalela	-139	+135
Folha- β paralela	-119	+113
Curva- β tipo I	-60 (-90)	-30 (0)
Curva- β tipo II	-60 (+90)	+120 (0)

A simulação da estrutura de peptídeo por Dinâmica Molecular (DM) complementa as informações sobre o comportamento da molécula nos diferentes meios. Ela permite através dos ângulos diedrais, a obtenção do diagrama de Ramachandran e assim comparar os valores dos ângulos ψ e Φ . Nas simulações de DM podemos obter, também, as coordenadas dos átomos dos sistemas no decorrer das simulações, assim como outras informações, tais como as energias de interação entre os átomos dos sistemas em função do tempo da ordem de nanosegundos. A partir das coordenadas atômicas presentes nas trajetórias pode-se fazer, por exemplo, cálculos de distância entre átomos ou grupos de átomos (MAZZÉ et al., 2008).

1.4 Dicroísmo Circular

A espectropolarimetria baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (ou assimétricos). Ela nos fornece a informação sobre a absorção desigual da luz, esquerda e direita, circularmente polarizada por moléculas

ativas. Isto ocorre quando um grupo cromóforo é parte de uma estrutura assimétrica, ou quando é imobilizado dentro de um ambiente assimétrico (SCHMID, 1990; NAKANISH et al., 1994; FASMAN, 1996).

Um feixe de luz plano polarizada pode ser decomposta em duas componentes circularmente polarizadas, uma à esquerda (L) e outra à direita (R), Figura 4. Quando a luz passa pela amostra e as componentes R e L não são absorvidos ou são absorvidos em igual proporção, nenhum sinal de CD é registrado (Figura 4-I). Quando essas componentes são absorvidas diferentemente, uma mais que a outra, a radiação resultante (combinação das componentes) é elipticamente polarizada (Figura 4-II).

Assim, o CD é definido como a diferença entre a absorção das componentes polarizadas à esquerda e à direita (ΔA). Baseado nisso, CD é a técnica ideal para estudos de moléculas quirais em solução. Ela permite monitorar perturbações na estrutura dos peptídeos e proteínas quando estes interagem com outras moléculas ou ainda em função de mudanças de pH ou adição de agentes desnaturantes através de mudanças conformacionais, cujos espectros de CD entre a estrutura enovelada e desenovelada são, usualmente, muito diferentes (RODGER e ISMAIL, 2000).

O espectro de dicroísmo de proteínas apresentam duas regiões espectrais relacionada a luz UV, a região próxima e região distante. A região distante (185-250 nm) é relacionado à estrutura secundária de um peptídeo ou proteína. A região próxima (250-300 nm) é relacionada com contribuições aromáticas, através principalmente das interações dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, embora transições de ligações dissulfeto (cistinas) também contribuam para a total intensidade de absorção, e podem ser correlacionadas com a conformação terciária de um peptídeo ou proteína. (ADLER et al., 1973; CANTOR e TIMASHEFF, 1982; SREERAMA et al., 1999).

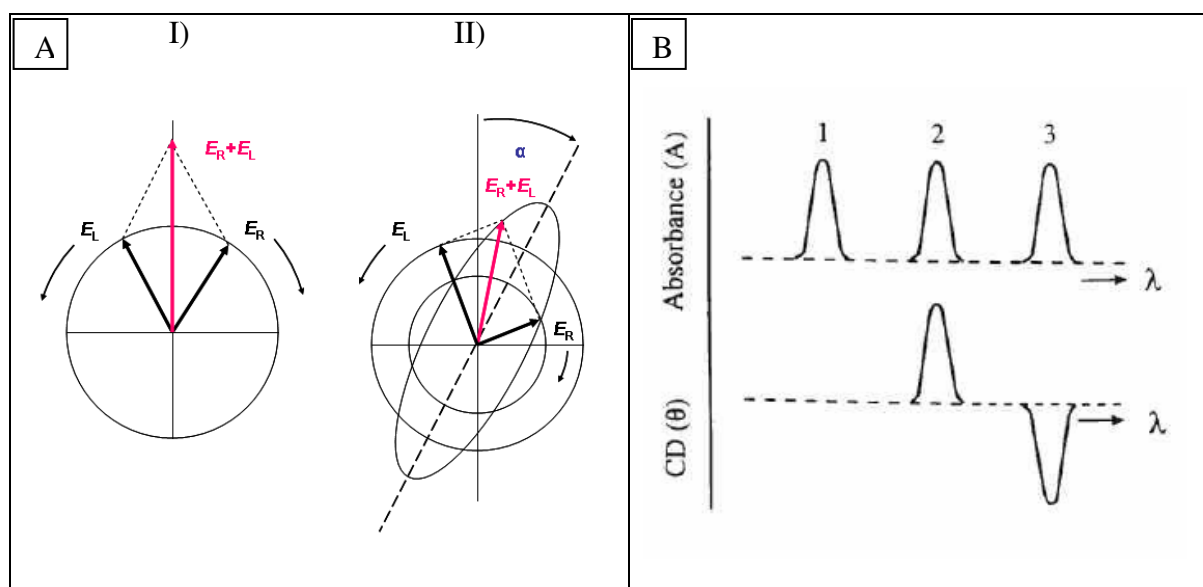


Figura 4: Origem dos efeitos dicroísmo circular. (A) Componentes circularmente polarizadas, direita (R) e esquerda (L), da radiação plano polarizada, sendo que em (I) as duas componentes apresentam a mesma amplitude e quando combinados produz radiação plano polarizada; e em (II) as componentes são de diferentes magnitudes, com resultante (linhas tracejadas) polarizada elipticamente. (B) A relação entre absorção e espectro de CD. Banda 1 não é quiral; banda 2 tem um espectro de CD positivo com L absorvido mais que R; analogamente a banda 3 tem uma banda negativa no espectro de CD (KELLY e PRICE, 2000).

Espectros de CD distintos têm sido descritos para conformações puras como α -hélice (Figura 6), β -folha, curvatura β e também estrutura ao acaso (random coil).

A α -hélice é uma estrutura secundária predominante em muitas proteínas. Seus espectros de CD são caracterizados por uma banda negativa em 222 nm (transição $n \rightarrow \pi^*$) e outra em 208 nm, a qual é parte de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, apresentando ainda uma banda positiva em 192 nm (GRESALFI e WALLACE, 1984; RODGER e ISMAIL, 2000). De acordo como diagrama de Ramachandran, as α -hélices correspondem a região $\Phi = -60^\circ$ e $\psi = -40^\circ$. Nessas estruturas, as ligações de hidrogênio entre o oxigênio e o nitrogênio têm tamanho de aproximadamente 2,86 Å. Essa estrutura varia, em tamanho, de 4 a 40 resíduos, sendo 3,6 resíduos por volta, ocupando 1,5 Å ao longo da hélice.

As características gerais, de espectros de CD, para β -folha são uma banda negativa em aproximadamente 216 nm e uma outra banda positiva em 195 nm (BAYLEY, 1980). A curvatura β apresenta no seu espectro de dicroísmo uma banda presentes em proteínas globulares estão organizados na conformação β -folha (WALTON, negativa em torno de 225 nm, referente à transição $n \rightarrow \pi$, uma forte transição $\pi \rightarrow \pi^*$ entre 200 nm e 205 nm, e uma forte banda negativa entre 180 e 190 nm. É o elemento estrutural mais abundante nos peptídeos e proteínas. Aproximadamente 28% dos resíduos (1981; CEIGHTON, 1993). A conformação β -folha depende da ligação de hidrogênio intramolecular entre a cadeia peptídica estendida individuais. De acordo com o diagrama de Ramachandran, as β -folhas correspondem a região ao redor de $\Phi = 117^\circ$ e $\psi = 142^\circ$. A conformação desse segmento é estável somente quando incorporado na β -folha, onde forma ligações de hidrogênio com grupos vizinhos.

A terceira forma comum de estrutura secundária dos peptídeos e proteínas é a

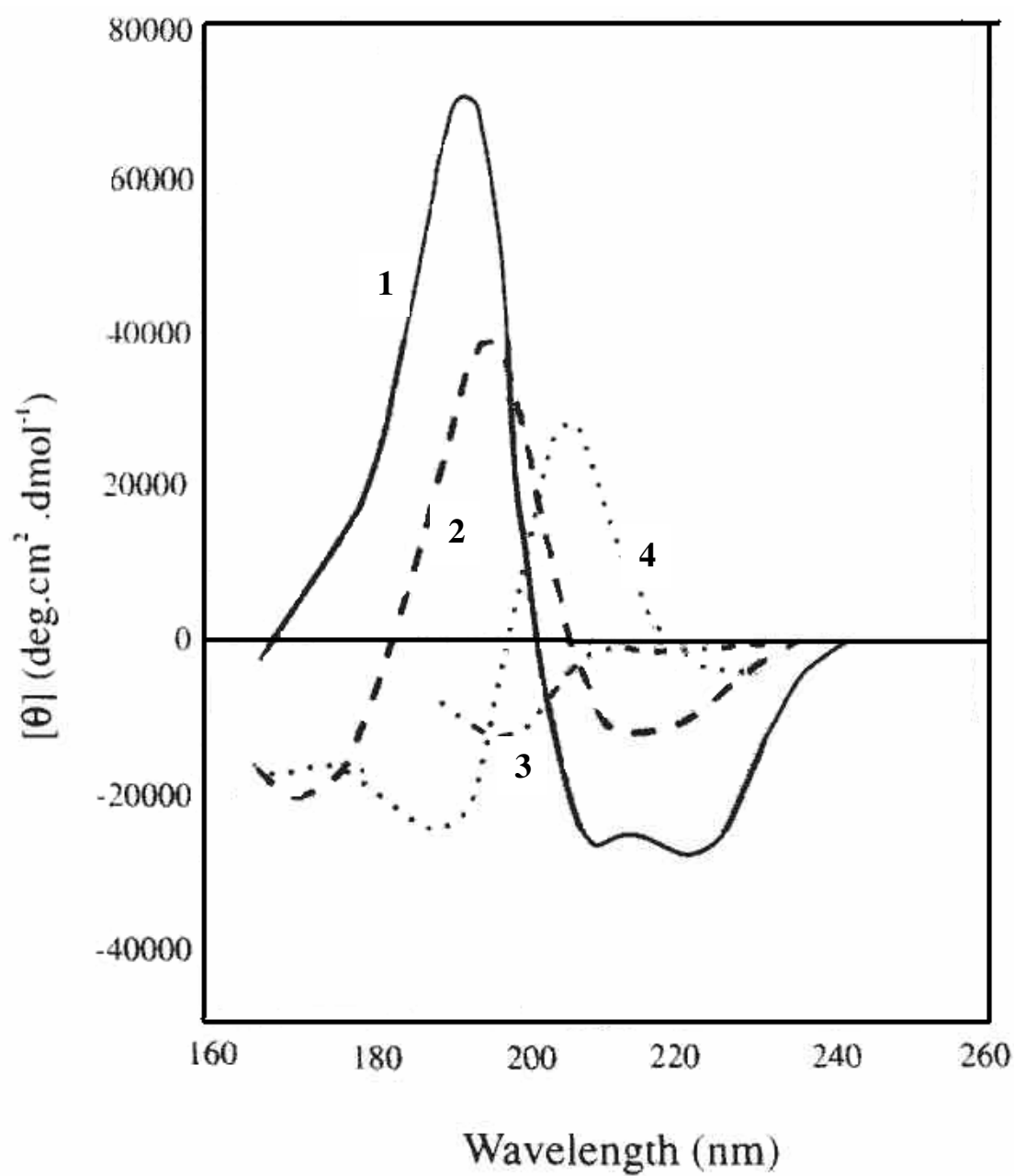


Figura 6: Espectro de CD-UV distante típicos de estruturas secundárias de peptídeos: (1) α -hélice; (2) β -folha; (3) Curva- β ; (4) Espiral ao acaso; (KELLY e PRICE, 2000).

curva- β , que compõe aproximadamente 25% dos resíduos de proteínas globulares (CEIGHTON, 1993; CHOU e BLIM, 1997). Uma curva- β envolve 4 resíduos consecutivos para encurvar a cadeia peptídica por aproximadamente 180 graus. Esta conformação (Figura 7) é frequentemente estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonil do resíduo (i) e próton da amida do resíduo ($i+3$).

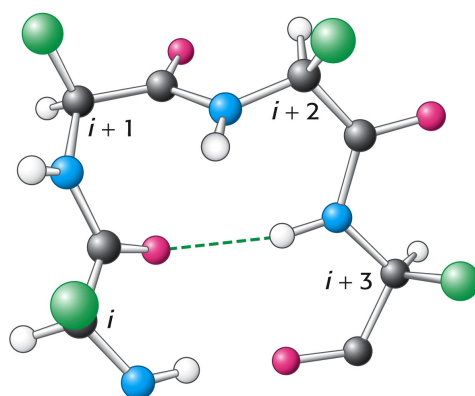


Figura 7: Conformação característica de curva- β , composta por 4 aminoácidos (STRYER, 1996).

Finalmente, um espectro de CD típico de estrutura ao acaso (random coil) é caracterizado por um forte sinal de CD negativo abaixo de 200 nm (Figura 6) e uma banda positiva em cerca de 218 nm para muitos sistemas (RODGER e ISMAIL, 2000).

Uma das aplicações desta técnica consiste na utilização dos resultados obtidos para a determinação das porcentagens das estruturas secundárias de uma proteína, através de um processo de desconvolução, pois o espectro de CD de proteínas observado é um somatório dos sinais de todas as conformações secundárias (SREERAMA et al., 1999). Uma variedade de métodos tem sido proposta para estimar as frações de estrutura secundária de proteínas (CHEN et al., 1972, 1974;

BRAHMS e BRAHMS, 1980; HENNESSEY e JOHNSON, 1981; VAN STOKKUM et al., 1990; SREERAMA e WOODY, 1994). Os métodos analíticos desenvolvidos para a desconvolução do espectro de CD de proteínas são baseados na combinação linear entre o espectro e a estrutura secundária (SREERAMA e WOODY, 1994).

1.5 Fluorescência

Esta é a técnica espectroscópica mais sensível disponível para estudos conformacionais. Ela é representada por um fenômeno com dois estágios distintos: excitação e emissão. Um fluoróforo absorve um fóton de luz, onde um elétron do orbital Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) é promovido do estado fundamental para um estado excitado, permanecendo neste estado por poucos nanosegundos, voltando para o nível vibracional fundamental por meio da conversão interna (processo não radiativo), ou com emissão de luz, processo denominado fluorescência (Figura 8).

A intensidade de fluorescência da amostra depende tanto da eficiência de absorção da luz quanto da eficiência de emissão do fóton a partir de um fluoróforo excitado (JOHNSON, 2005).

Esse processo resulta de uma transição singleto-singleto, observada através do retorno do estado excitado para o estado fundamental, ou seja, perda de energia inicialmente absorvida por processos radiativos (fluorescência ou fosforescência) ou não-radiativos (conversão interna, cruzamento entre sistemas ou supressão).

O estado singleto é caracterizado por possuir tempo de vida curto, sendo que o decaimento por fluorescência ocorre entre 10^{-8} e 10^{-9} segundos. Os elétrons do estado singleto excitado e do estado fundamental possuem spins anti-paralelos, sendo uma transição permitida.

Os espectros de fluorescência são deslocados para comprimentos de onda maiores, menor energia, que os da banda de absorção, também denominado de deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 1983).

O sinal de fluorescência pode ser analisado por múltiplos caminhos, incluindo sua intensidade, tempo de vida, energia (λ), e liberdade rotacional para revelar diferentes aspectos da estrutura, interação, mecanismo ou processos (JOHNSON, 2005). Por isso eles são usados nos estudos estruturais de biomolécula devido a presença de cromóforos naturais, fenilalanina, tirosina e triptofano, sendo este último o fluoróforo mais intenso, devido ao anel indol (CANTOR, 1980; LAKOWICZ, 1983; Ross et al., 1992; CHEN e BARKLEY, 1998).

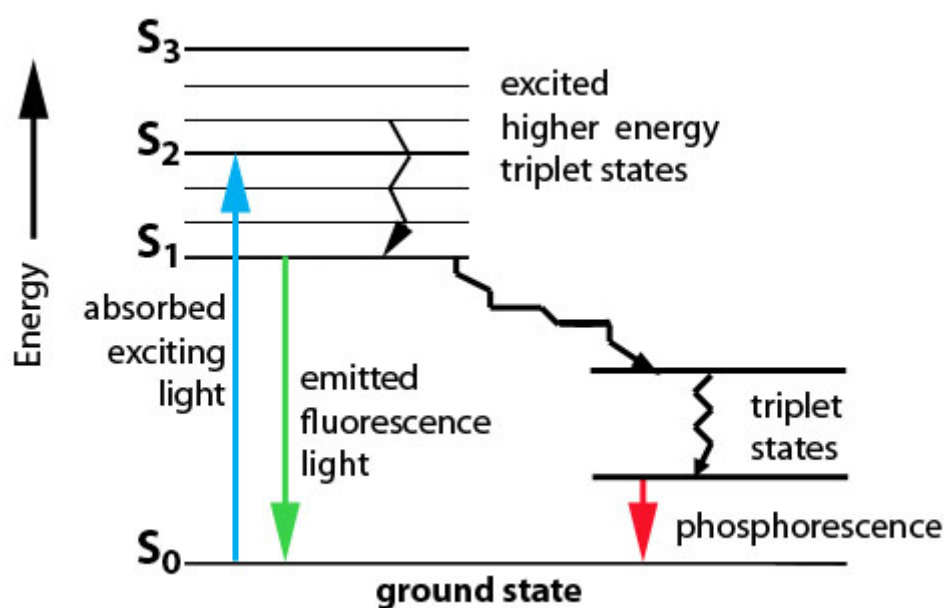


Figura 8: Diagrama de Jablonski para a absorção de fótons do estado fundamental (S_0) para os estados singlete excitados (S_1 e S_2). Em cada nível de energia eletrônico existe uma série de níveis de energia vibracionais (LAKOWICZ, 1999).

Os resíduos de triptofano podem ser seletivamente excitados em comprimentos de onda de 280 nm, apresentando um pico máximo de absorção em torno de 340 nm (LAKOWICZ, 1983). Além disso, são observadas tanto mudanças de intensidade quanto deslocamentos no pico de fluorescência. A emissão de resíduos de triptofano em um peptídeo pode ser maior ou menor que a emissão de triptofano livre em solução aquosa. Conseqüentemente, tanto um aumento quanto uma diminuição da intensidade de fluorescência pode ocorrer através de alteração da estrutura da biomolécula (SCHMID, 1990).

A fluorescência dos fluoróforos depende do ambiente que os circunda, pois a interação destes com moléculas do solvente altera a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência de emissão (LOURA et al.; 2004). A resposta destas propriedades especiais como conseqüência da alteração de polaridade, pH, temperatura, ligação a membranas e da adição de supressores pode ser usada para caracterizar propriedades conformacionais de proteínas e peptídeos.

A supressão de fluorescência refere-se a qualquer processo que contribua para a decaimento do estado excitado, excluindo-se os radiativos. Entre esses processos destacam-se: colisões entre moléculas (10^{-12} segundos), formação de complexos. Na supressão por colisão, o fluoróforo perde energia para o supressor durante o tempo de vida do estado excitado; ou seja, o supressor colide com o doador em seu estado excitado e neste processo o doador volta ao seu estado fundamental sem emitir fótons. No segundo tipo de supressão, formação de complexos, o doador e o supressor se unem formando um complexo não fluorescente; esta união pode ocorrer tanto no estado fundamental quanto no estado excitado. A supressão de fluorescência é um método útil na determinação da interação dos fluoróforos em membranas, ou seja, obtemos informações do ambiente ao redor do fluoróforo (SHAI, 1999).

A análise quantitativa da supressão de fluorescência é realizada empregando a equação de Stern-Volmer, que relaciona a supressão da fluorescência com a concentração da molécula supressora [Q]:

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{Equação 1})$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência do peptídeo na ausência do supressor, F é a intensidade de fluorescência em uma concentração determinada do supressor, e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. A maior inclinação da reta indica maior supressão da fluorescência.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Com base nas atividades biológicas exibidas e ao elevado caráter hidrofóbico, a Labaditina configura-se como um importante protótipo no desenvolvimento de novos fármacos. Com isso torna-se fundamental o conhecimento detalhado acerca de seus mecanismos de ação e alterações estruturais frente a membranas biológicas e outros meios, os quais até hoje não foram estudados.

Com auxílio das técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida será sintetizado o peptídeo Labaditina e seus análogos modificados buscando avaliar a importância da estrutura cíclica e dos resíduos de triptofano que apresentam papel importante na interação peptídeo-membrana. Por isso essas biomoléculas serão estudadas por dicroísmo circular (análise das mudanças estruturais), fluorescência (elucidação dos mecanismos de ação) e calorimetria (determinação das mudanças de dinâmica estrutural na membrana causada pelo peptídeo bem como parâmetros de desnaturação e constantes de ligação do peptídeo). Esses estudos serão efetuados e avaliados em diversas condições, incluindo interações com sistemas de membranas naturais (hemácias) e artificiais (lipossomos), com o propósito de poder entender o possível mecanismo de ação desses peptídeos. Além dos estudos de interação e modificação estrutural avaliaremos as atividades citotóxica e hemolítica, com o objetivo de buscar novas possibilidades de aplicações terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar e purificar o peptídeo Labaditina e análogos na forma linear e com substituições de um ou mais aminoácidos;
2. Avaliar o efeito do pH, temperatura e de agentes desagregantes/desnaturantes na estrutura secundária dos diferentes peptídeos;
3. Estudar a importância da conformação cíclica e dos resíduos de triptofano na busca de moléculas mais bioativas frente a estudos comparativos, utilizando-se de sistemas de membranas artificiais e naturais;
4. Analisar as alterações conformacionais que essas biomoléculas podem sofrer pela interação com lipossomos;
5. Analisar atividades biológicas, citotóxica e hemolítica dos diferentes peptídeos sintetizados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Síntese dos peptídeos

A estratégia utilizada para a síntese da labaditina (Lo) e dos análogos L₁, L₂, L₃, L₄ e L₅ foi a Fmoc/tBu. A síntese foi realizada em resina do tipo Wang, com grau de substituição de 1,3 mmol/g. O primeiro aminoácido, glicina, foi acoplado usando um método alternativo com 10 vezes de excesso em duas etapas (6 equivalentes na primeira reação e 4 equivalentes na segunda reação). Para isso 0,923 g da resina foi solvatada em dimetilformamida (DMF) por 30 minutos. Em seguida, na primeira reação 7,2 mmol (escala de síntese de 1,2 mmol) do aminoácido Fmoc-glicina foi solubilizado em DMF, acrescido de 2 mmol de DIC e 0,04 mmol de 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), agentes acoplantes e adicionados a resina. Esta solução, acrescida por diclorometano (DCM), foi agitada por 2 horas. O mesmo foi realizado na segunda reação, porém com 4,8 mmol do aminoácido Fmoc-glicina (4eq.).

Após o acoplamento do primeiro aminoácido a resina seca foi pesada obtendo-se 1,2321 g. Essa massa foi dividida em três partes, sendo 421,0 mg, escala 0,4 mmol (quantidade de grupos reativos disponíveis na resina) para os peptídeos Lo e L₁; 413,2 mg (0,4 mmol) para os peptídeos L₄ e L₅; 205,0 mg (0,2 mmol) para o peptídeo L₂; e 209,1 mg, e (0,2 mmol) para o peptídeo L₃. Os peptídeos Lo e L₁ foram feitos juntos e separados apenas após a clivagem, já os peptídeos L₄ e L₅ foram sintetizados juntos até o penúltimo aminoácido, pois diferem no último resíduo. Todos os aminoácidos, exceto glicina, foram acoplados usando 3 vezes de excesso (3 equivalentes).

O protocolo Fmoc/tBu (Figura 9) consiste de passos cíclicos de acoplamento e outros aminoácidos). A desproteção da cadeia peptídica, retirada do grupo Fmoc base-

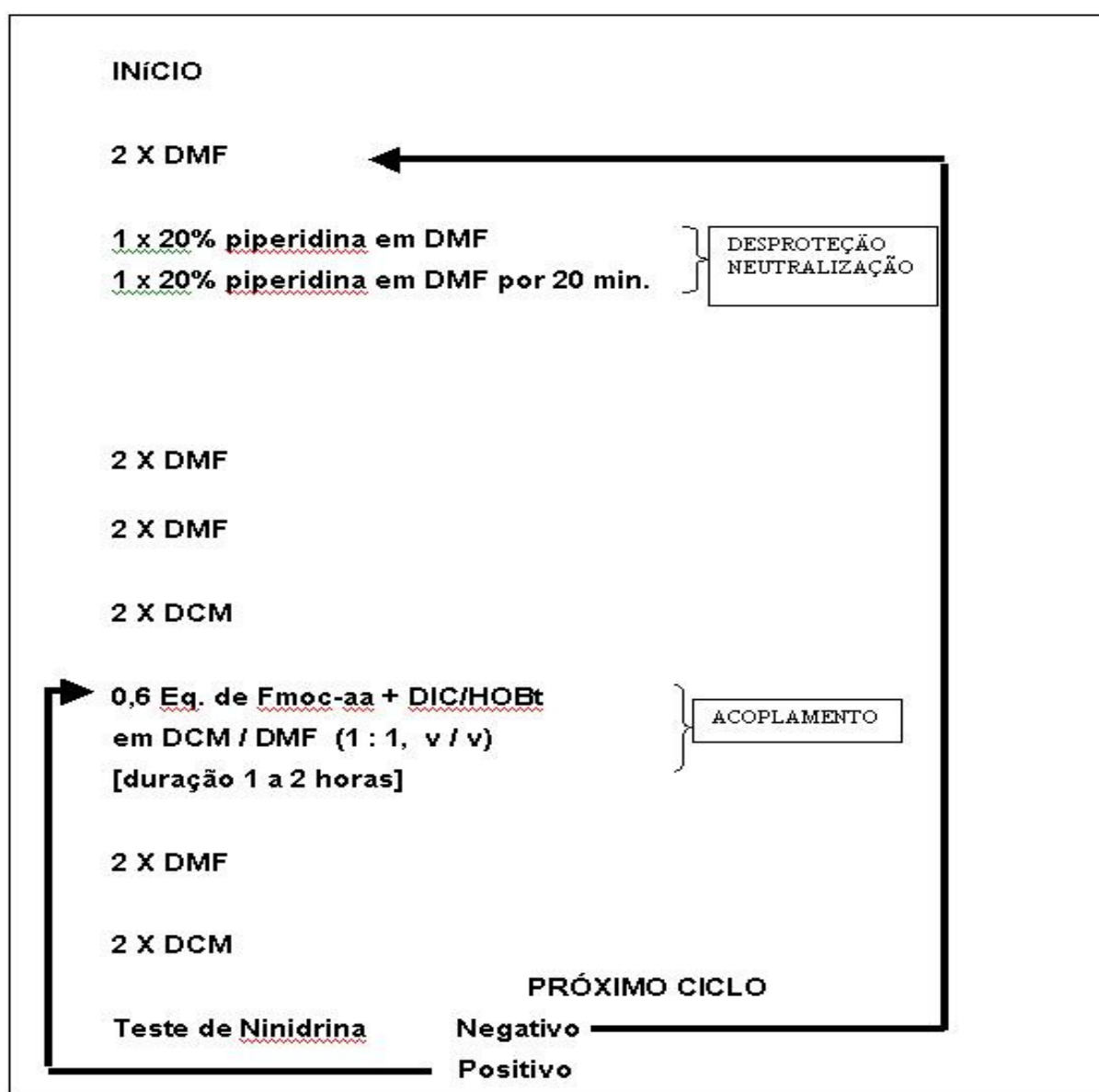


Figura 9: Representação em fluxograma do protocolo de síntese empregando-se a metodologia Fmoc/tBu.

lável, foi efetivada através da lavagem em solução 20% piperidina/DMF durante 20 minutos. Após cada acoplamento e desproteção foram efetuadas lavagens com os solventes orgânicos DMF e DCM, respectivamente, seguido do teste de ninidrina. Antes de cada acoplamento a resina foi solvatada (“inchada”) com DCM.

Para a obtenção dos peptídeos L_4 e L_5 , antes do acoplamento do último aminoácido, a peptidil-resina foi seca e pesada, obtendo-se 0,5993g. Essa massa foi dividido em dois lotes iguais, desprotegida e o último resíduo acoplado.

3.2 Clivagem dos peptídeos

A clivagem do peptídeo-resina foi realizada, separadamente, pela reação com uma solução contendo 5% água ultra pura (Millipore® Direct Q), 2,5% fenol, 2,5% EDT, 5% tioanisol e 82,5% TFA, chamado de reagente K (KING et al., 1990), durante duas horas, na proporção de 10 mL/g peptidil-resina. Após esse tempo, os peptídeos foram precipitados com éter etílico a 4°C, filtrados em uma placa porosa e separados da resina através da extração com uma solução 50% solvente A / 50% solvente B (Solvente A: 0,045% TFA/H₂O e Solvente B: 0,036% TFA/acetonitrila). Essa solução, 50% solvente A / 50% solvente B mais o peptídeo, foi concentrada à baixa pressão e liofilizada, obtendo-se um pó branco posteriormente identificado e caracterizado por CLAE.

3.3 Ciclização do peptídeo

Após a clivagem e caracterização o peptídeo L_1 foi ciclizado obtendo o L_0 (BARAGUEY et al., 1998). Para isso 128,3 mg de peptídeo linear (L_1) foi solubilizado em DMF (101 mL). Acrescentou-se HBTU (10 equivalentes), trietilamina (5 equivalentes). Após agitação por duas horas o peptídeo foi extraído

através de um funil de separação, com acetato de etila (AcOEt). O volume obtido nessa extração foi concentrado à baixa pressão, liofilizado e analisado em CLAE.

3.4 Purificação dos peptídeos

A purificação de cada um dos peptídeos brutos foi realizada em HPLC Shimadzu LC-10A/C-47A, com detector Diode Array SPD-M 10A VP (preparativo) com coluna 300 mm x 19 mm; partícula de 15 μ m; C₁₈, Ultrasphere. A determinação das frações puras foi realizada, analiticamente, em HPLC Shimadzu LC-10A/C-47^a (analítico) com coluna 4,6 mm x 25 cm; partícula de 5 μ m; ODS - Ultrasphere.

As condições cromatográficas tanto para o modo preparativo quanto analítico estão detalhadas a seguir:

Modo Preparativo	
Solventes	A: 0,045% TFA/H ₂ O
	B: 0,036% TFA/ACN
Gradiente(L₀)	45% - 75% de solvente B em 90 min
Gradiente(L₁)	35% - 55% de solvente B em 90 min.
Gradiente(L₂)	35% - 55% de solvente B em 90 min
Gradiente(L₃)	30% - 50% de solvente B em 90 min.
Gradiente(L₄)	25% - 45% de solvente B em 90 min.
Gradiente(L₅)	25% - 45% de solvente B em 90 min.
Fluxo	4mL/min
Comprimento de onda de detecção	220 nm.

Modo Analítico	
Solventes	A: 0,045% TFA/H ₂ O
	B: 0,036% TFA/ACN
Gradiente(L₀):	isocrático 53% de solvente B
Gradiente(L₁):	isocrático 45% de solvente B
Gradiente(L₂):	isocrático 45% de solvente B
Gradiente (L₃):	isocrático 38% de solvente B
Gradiente(L₄):	isocrático 35% de solvente B
Gradiente(L₅):	isocrático 35% de solvente B
Fluxo	1,0mL/min
Comprimento de onda de detecção:	220 nm.

3.5 Espectrometria de Massas

A massa molecular de cada peptídeo foi determinada utilizando um espectrômetro de massas ultrOTOFG - ESI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As amostras foram introduzidas diretamente na fonte de ionização, via bomba de infusão, com um fluxo de 10 µL/min. A voltagem do capilar foi mantida a 3 kV e a temperatura do gás de desolvatação a 250°C. Os experimentos foram realizados utilizando o modo positivo, sendo o nitrogênio o gás de colisão.

3.6 Preparação de lipossomos

Lipossomos constituídos por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foram preparados pelo método de extrusão dissolvendo-se 1 mg/mL desse lipídio em clorofórmio. A remoção do solvente orgânico foi realizada passando-se um fluxo de gás N₂ pela solução (evaporação), que em seguida foi mantido à vácuo por 2 horas. O filme formado foi ressuspensão em tampão TRIS 50 mM, pH 7, aquecido em banho seco (60°C) e agitado de 10 em 10 minutos durante 1 hora. Essa emulsão lipídica de

sistemas multilamelares foi, através de um aparelho extrusor (Liposofast, da Avestin, Ottawa, Canadá), fracionada (rompida) pela passagem por uma membrana de polycarbonato com diâmetro de poro de 100 nm, por cerca de 20 vezes, resultando em sistemas unilamelares (lipossomos).

3.7 Determinação do diâmetro dos Lipossomos

A estabilidade dos lipossomos foi avaliada medindo-se a distribuição de tamanho das partícula por espalhamento de luz dinâmico (equipamento Beckman Coulter, modelo N5). Com o objetivo de obter um adequado ajuste da intensidade do aparelho as amostras de lipossomo foram previamente diluídas. A estabilidade dessas estruturas também foi acompanhada na presença de diferentes concentrações de metanol (MeOH) e em diferentes proporções peptídeo/lipossomo, após 2 horas de incubação à temperatura ambiente.

3.8 Determinação da concentração dos peptídeos

A concentração das soluções peptídicas foi determinada, espectrofotometricamente, considerando o coeficiente de extinção molar (ϵ) do triptofano igual a $5600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (CREIGHTON, 1997). O coeficiente de extinção molar dos diferentes peptídeos foi determinado em função da quantidade de resíduos triptofano presente na molécula, conforme a equação abaixo e estão listados a seguir:

$$\epsilon_{\text{peptídeo}} = (\text{N}^{\circ} \text{ de Trp}) \cdot \epsilon_{\text{(trp)}}$$

Peptídeo	Coefficiente de extinção molar do peptídeo (ϵ) $M^{-1}.cm^{-1}$
Lo	11200
L ₁	11200
L ₂	5600
L ₃	5600
L ₄	11200
L ₅	5600

A determinação da concentração dos peptídeos segue a lei de Beer-Lambert, conforme:

$$\text{Absorbância}_{(280nm)} = \epsilon_{\text{peptídeo}} \cdot b(\text{cm}) \cdot C \text{ (mol/L)}$$

3.9 Ensaios de Fluorescência de Triptofano

Os ensaios de absorção e emissão foram realizados em cubetas de quartzo de caminho ótico de 0,5 cm em fluorímetro Spectronic SLM 8100 a 25°C.

Foram tituladas soluções do peptídeo (Lo e L₁), separadamente, com lipossomos constituídos de DPPC. A excitação dos peptídeos foi feita no comprimento de onda de máxima absorção do triptofano, 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi obtido em uma faixa de 300 a 450 nm.

A intensidade de fluorescência e os comprimentos de onda de máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) emissão foram obtidos, para cada peptídeo, em meio aquoso, pH 7,0 e também na presença de lipossomos constituídos de DPPC.

Os estudos foram realizados adicionando o peptídeo até a concentração máxima de 50 μM , empregando-se uma proporção peptídeo/lipídeo (P/L) de $73 \cdot 10^{-3}$. O espectro de emissão e o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão foram utilizados na análise do comportamento estrutural do peptídeo.

3.10 Supressão de Fluorescência

A supressão de fluorescência foi realizada adicionando-se, sucessivamente, 5 μL da solução 6 M de acrilamida numa solução 50 μM de peptídeo ($\text{P/L} = 73 \cdot 10^{-3}$) até a concentração final de 100 mM de acrilamida.

3.11 Ensaios de Dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD na região UV - distante foram adquiridos de 190 a 250 nm, em um espectropolarímetro JASCO modelo J-810 equipado com célula termostatizada do tipo Peltier. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm (KELLY et al., 2005) e os parâmetros para a coleta dos espectros foram:

Parâmetros	
Resolução	0,5 nm
Velocidade de Varredura	10 nm/min
Tempo de Resposta	2 s
Largura de Banda	1 nm
Acumulações	6

Empregando-se esta técnica foram realizados os seguintes estudos:

3.11.1 Efeito de solventes

Os espectros de CD dos peptídeos Lo e L₁ (100 µM) foram obtidos em diferentes meios (Metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e água. Os solventes utilizados apresentam pureza acima de 99,95%.

3.11.2 Efeito de Concentração do peptídeo

Os espectros de CD para os peptídeos Lo e L₁ foram realizados em meio aquoso variando-se a concentração de 5 a 270 µM, pH7,0.

3.11.3 Efeito de pH

Os espectros foram coletados submetendo os peptídeos Lo e L₁ (100µM) em meio aquoso a diferentes valores de pH, na faixa de 1 a 10, utilizando HCl e NaOH (PAYNTER e RUSSELL, 2002). Os peptídeos foram incubados por 2 horas em cada pH, o qual foi avaliado por meio de um pHmetro, antes da coleta dos dados de CD.

3.11.4 Efeito de Temperatura

Os espectros foram coletados em meio aquoso, pH 7,0, numa faixa de 10 a 70°C, com incrementos de 5°C cada, utilizando-se um sistema Peltier. As amostras dos peptídeos Lo e L₁ (100 µM) foram incubadas por 1 min na temperatura de análise, antes da coleta dos espectros.

3.11.5 Efeito de Variação do TFE

Os peptídeos Lo e L₁ (100µM) foram incubados, por 2h, em porcentagens crescentes de TFE, variando na faixa de 10 a 90%, e em seguida foram coletados os espectros de CD.

3.11.6 Efeito da Guanidina

Os peptídeos Lo e L₁ (100μM) foram incubados por 2h em meio aquoso (pH 7,0) na presença de concentrações crescentes de cloreto de guanidina, variando de 0,01 a 6,0 mol/L e em seguida foram coletados os espectros de CD.

3.11.7 Efeito de Interação com Lipossomos

Os peptídeos Lo e L₁, em diferentes concentrações, foram incubados por 2h com lipossomos constituídos de DPPC até a proporção P/L = $73 \cdot 10^{-3}$. Os espectros foram coletados a partir dessas soluções, pH 7,0.

3.12 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os estudos de calorimetria foram realizados utilizando um aparelho N-DSC II: Differential Scanning Calorimeter da empresa Calorimetry Sciences Corporation (CSC).

A amostra de lipossomo e a referência (tampão) foram inicialmente desaeradas e aplicadas no compartimento do calorímetro (300 μL de cada). Foi realizada uma varredura de temperatura de 10 a 90°C, com velocidade de aquecimento de 1,0°C/min e uma varredura de 90 a 10°C com velocidade de resfriamento de 1,0°C/min. Esse ciclo foi repetido por pelo menos mais 1 vez. Um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra quando o processo é endotérmico, e aumenta a energia fornecida para a referência quando o processo é exotérmico, conservando assim o sistema com a mesma temperatura. Um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações, uma vez que a compensação de potência é proporcional à energia envolvida na

reação.

Foram avaliadas por DSC amostras de lipossomos constituídos de DPPC puros e também na presença de diferentes concentrações de peptídeos (0 a 50 μ M).

3.13 Efeito Hemolítico dos peptídeos

Os eritrócitos foram isolados de sangue recém coletado humano (onde eu fui a doadora). O sangue foi centrifugado (4730 xg por 15min a 4°C) em citrato de sódio 3,8% (1:4 v/v) e o sedimento lavado por mais 3 vezes nesta mesma solução. Finalmente sedimento foi ressuspensão em solução salina PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Foram incubados 2×10^7 eritrócitos (determinado por câmara de Neubauer), em tampão PBS, e 10% MeOH com diferentes concentrações dos peptídeos (em concentrações previamente determinadas), por 30 minutos a 37°C. A solução foi então centrifugada (4730 xg por 10min, 4°C) para a retirada das células lisadas. A liberação de hemoglobina, determinada através da absorbância do sobrenadante em 414nm em espectrofotômetro foi correlacionada com a lise dos eritrócitos.

A lise máxima das células (100%) foi obtida pela incubação de uma suspensão de hemácias com 0,1% (v/v) de Triton X-100. A porcentagem de hemólise foi determinada através da equação abaixo:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{[(A_{414} \text{ amostra analisada}) - (A_{414} \text{ em PBS} + 10\% \text{ MeOH})]}{[(A_{414} \text{ em } 0,1\% \text{ de Triton}) - (A_{414} \text{ em PBS} + 10\% \text{ MeOH})]}$$

3.14 Efeito Citotóxico dos peptídeos

O teste de citotoxicidade foi realizado com os peptídeos Lo e L₁, utilizando-se as seguintes linhagens bacterianas: Gram positiva (*Streptococcus mutans*) e Gram negativa (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*).

Antes da incubação com diferentes concentrações da solução peptídica (0,5 e 100 μ M), a suspensão bacteriana foi previamente incubada para atingir o meio da fase exponencial (10^9 UFC/mL). Em seguida foi serialmente diluída em PBS para a obtenção de 10^3 UFC/mL. Após este procedimento, 1mL da suspensão de cada bactéria foi incubada com os peptídeos, nas concentrações de 5 e 100 μ M, durante 10 min. Após este período de incubação com os peptídeos 50 μ L da suspensão foi inoculada em meio TSA (Tryptic Soy Agar) (Acumedia, Michigan, USA), utilizando a técnica de semeadura " Spread Plate ". As placas foram colocadas em uma jarra de microaerofilia e incubadas a 37°C por 24 e 72 horas para as bactérias *Streptococcus mutans* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, respectivamente. Em seguida foi realizada a contagem das placas, através do contador de colônias Phoenix, para determinar o número de UFC/mL. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.15 Simulação de Dinâmica Molecular (DM)

Todas as simulações realizadas, incluindo o preparo dos sistemas e minimizações de energia, foram conduzidas com o pacote GROMACS ("GRONigen MACHine for Simulation") (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). Foram construídos dois sistemas com cada peptídeo (Lo e L₁), colocado no centro de caixas cúbicas contendo água e íons para neutralizar a estrutura do peptídeo.

Os peptídeos foram modelados pelo campo de força GROMOS96 (ref). As ligações covalentes foram restritas pela aplicação do algoritmo LINCS (HESS *et al.*,

1997) ao mesmo tempo em que as moléculas de água, modelo SPC (ref), foram mantidas estruturalmente estáveis pelo algoritmo SETTLE (MIYAMOTO e KOLLMAN, 1992). A temperatura (298 K) foi controlada pelo algoritmo de Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984) com constante de acoplamento de tempo de 0,1 ps. Todos os sistemas também foram mantidos à pressão constante de 1 bar através do algoritmo de berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984) com constante de acoplamento de 0,5 ps. Foi aplicado um raio de corte em 1 nm para as interações intermoleculares com o método “*particle-mesh Ewald*” (DARDEN *et al.*, 1993) para correções das interações de longo alcance. As equações de movimento nas simulações por DM foram integradas com o algoritmo “*leap-frog*” (HOCKNEY *et al.*, 1974) com intervalo de tempo 2 fs. Os dados foram obtidos em colaboração com o Grupo de Simulação Molecular pelo Dr. Carlos Fuzo e sob a coordenação do Prof. Dr. Léo Degève

3.16 Diagrama de Ramachandran

Os modelos obtidos por DM foram avaliados através do diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN; SASISEKHARAN, 1968), obtido por meio do programa Swiss-Pdb Viewer (Ca.expasy.org/spdbv/) (GUERX; PEITSCH, 1997). Através desse software foram avaliados os ângulos diedrais (ângulos de torção ϕ e ψ que compõem a estrutura principal do peptídeo), obtidos por DM.

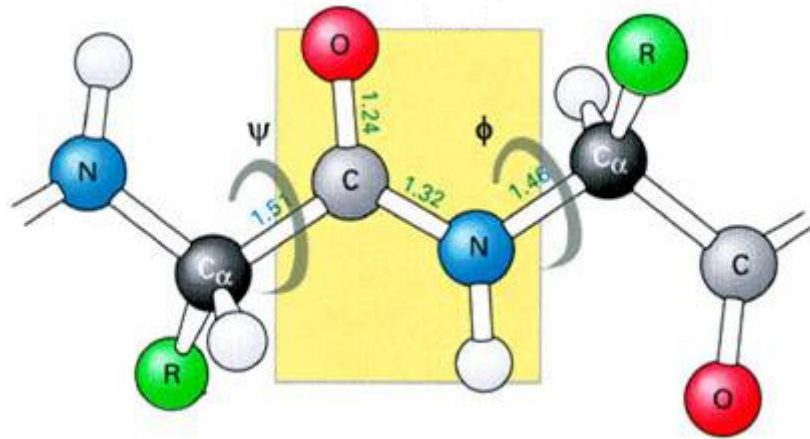


Figura 10: Representação de uma ligação peptídica e seus respectivos ângulos diédricos, phi (ϕ) e psi (ψ). Os ângulos ϕ e ψ são responsáveis pela variação conformacional da cadeia principal, o que torna a cadeia polipeptídica flexível (NELSON e COX, 2002).

6. Referências Bibliográficas

- ADLER, J. (1973). A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 14, 77-9.
- AKÉ, R. C.; REJÓN, G. E.; PAT, M. F.; RODRÍGUEZ, L. M. P.; SÁNCHEZ, S. R. P. (2004). Bioactive Terpenoids from Roots and Leaves of *Jatropha gaudieri*. ***Sociedad Química México***, 48: 11-14.
- ALBERICIO, F. (2000) Orthogonal protecting groups for N – alpha-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. ***Biopolymers***, 55:123-139,
- ANDERLUH, G.; BARLIC, A.; PODLESEK, Z.; MACEK, P.; PUNGERCAR, J.; GUBENSEK, F.; ZECCHINI, M. L.; DALLA S. M.; MENESTRINA, G. (1999) Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone - Topology in lipid membranes. ***European Journal of Biochemistry***, 263:128-136.
- ANDERSSON, D.; CARLSSON, U.; FRESKGD, P. (2001) Contribution of tryptophan residues to the CD spectrum of the extracellular domain of human tissue factor. ***European Journal Biochemistry***, 268:1118-1128.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. **Oxford University Press**, 1989.
- AUVIN, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; LEZENVEN, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B. (1997) Curcacycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophHin. ***Tetrahedron Letters***, 38:2845-2848.
- AUVIN-GUETTE, C.; BARAGUEY, C.; BLOND, A.; XAVIER, H. S.; POUSSET, J. L.; BODO, B. (1999) Pohlins A, B e C, Cyclic Peptides from the latex of *Jatropha pohlina* ssp. *Molissima*. ***Tetrahedron Letters***, 55:11495-11510.
- BARAGUEY, C.; GUETTE, C. A.; BLOND, A.; CAVELIER, F.; LEZENVEN, F.; POUSSET, J. L.; BODO, B. (1998) Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. ***Journal Chemical Society***, 1:3033-3039.
- BARANY, G.; MERRIFIELD, R. B. (1980) Analysis, synthesis and biology. New york: **Academic press**.
- BARBOSA, S. C.; CILLI, E. M.; JUNIOR, E. C.; ALTEI, W. F. (2006) Viabilidade de síntese e interação com miméticos de membrana do peptídeo Labaditina. In: Congresso de iniciação científica da UNESP, 18. Botucatu.
- BERENDSEN H. J. C.; POSTMA J. P. M.; DINOLA A.; HAAK, J. A. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. ***Journal Chemical Physics***, 81:3684-3690.
- BERTHELOT, T.; GONÇALVES, M.; LAÏN, G.; ESTIEU-GIONNET, K.; DÉLÉRIS, G. (2006) New strategy towards the efficient solid phase synthesis of cyclopeptides. ***Tetrahedron*** 62:1124-1130.
- BRAHMS, S.; BRAHMS, J. (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. ***Journal of Molecular Biology***, 138:149-178.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. (1991) Introduction to protein structure, Garland Publishing, Inc. New York and London.
- CANTEL, S.; ISAAD, A.L.; SCRIMA, M.; LEVY, J.J.; DIMARCHI, R. D.; ROVERO, P.; HALPERIN, J. A.; D'URSI, A. M.; PAPINI, A. M.; CHOREV, M. (2008) Synthesis and conformational analysis of a cyclic peptide obtained via *i* to *i*+4

- intramolecular side-chain to side-chain azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. **Journal of Organic Chemistry**, 73: 5663-5674
- CANTOR, C. R., SCHIMMEL, P. R. (1980) **Biophysical chemistry**, Part II. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- CANTOR, C. R., TIMASHEFF, S. N. Optical spectroscopy of proteins. In *The Proteins*, editors. Academic Press, New York. p. 145-306, 1982.
- CHATTOPADHYAY, A.; LONDON, E. (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. **Biochemistry**, 26:39-45.
- CHEN, Y.; BARKLEY, M. D.; (1998) Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins. **American Chemical Society**, 37:9976 – 9982.
- CHOO-SMITH, L. P.; SUREWICZ, W. S. T, (1997) The interaction between Alzheimer amyloid β (1-40) peptide and Ganglioside G_{M1} -containing membranes. **FEBS Letters**. 402:95-98.
- CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**. 294:1327-1336.
- CREIGHTON, T. E. *Protein Structure: a Practical Approach*: Oxford University Press, 20 -2-1993. **Practical Approach Series**.
- DALY, N. L.; KOLTAY, A.; GUSTAFSON, K. R.; BOYD, M. R.; CASAS-FINET, J. R.; CRAIK, D. J. (1999) Solution structure by NMR of circulin A. **Journal of Molecular Biology**, 285:333-345.
- DARDEN T.; YORK D.; PEDERSEN, L. (1993) Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewald Sums in Large Systems. **Journal Chemical Physics**. 98:10089-10092.
- DAVE, P. C.; BILLINGTON, E.; PAN, Y.; STRAUS, S. K. (2005) Interaction of Alamethicin with Ether-Linked Phospholipid Bilayers: Oriented Circular Dichroism, ^{31}P Solid-State NMR, and Differential Scanning Calorimetry Studies. **Biophysical Journal**, 89:2434–2442.
- DEVA, M. S. Z. W.; BEHERE, D. V. (1999) Fluorescence and circular dichroism spectroscopic studies on bovine lactoperoxidase. **BioMetals**, 12:219-225.
- EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. (1976) Fluorescence quenching of Indole and Model Micelle Systems. **Journal of Physical Chemistry**, 80: 486-493.
- EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. (1976) Exposure of Tryptophanyl Residues in Protein. Quantitative Determination by Fluorescence Quenching Studies. **Biochemistry**. 15:672-680
- FASMAN, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, **Plenum Press** – New York and London, 1996.
- GIACOBINI E. (2000) Cholinesterase Inhibitors Stabilize Alzheimer Disease, **Journal Neurochemical Research**, 25:1185–1190.
- GÓMEZ-PUYOU, M. T.; DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, L.; REYES-VIVAS, H.; GÓMEZ-PUYOU, A. (2001) Structural Alterations and inhibition of unisite and multisite ATP hydrolysis in soluble mitochondrial F1 by Guanidinium chloride. **Biochemistry** 40:3396-3402.
- GRESALFI T. J., WALLACE B. A. (1984) Secondary structural composition of the Na/K-ATPase E1 and E2 conformers. **Journal of Biological Chemistry**. 259:2622–2628.
- GRISHINA, I. B.; WOODY, R. W. (1994) Contributions of Tryptophan Side Chains to

- the Circular Dichroism of Globular proteins: Exciton Couplets and coupled Oscillators. **Faraday Discussion**, 99:245-262.
- GUEX, N.; PEITSCH, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, 18:2714-2723.
- HENNESSEY, J. P.; JOHNSON, W. C. (1981) Information content in the circular dichroism of proteins. **Biochemistry**, 20:1085-1094.
- HESS, B., BEKKER, H., BERENDSEN H. J. C. E FRAAIJE, J. G. E. M. (1997) LINC: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of computational Chem**, 18:1463-1472.
- HOCKNEY, R.W.; GOEL, S.P.; EASTWOOD, J.W. (1974) Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, 14:148-158.
- INNOVAGEN. Peptide Property Calculator Disponível em: <http://www.innovagen.se>.
- Solid Phase Peptide Synthesis**, 2º Ed. Pierce, 1979, p. 105-107
- JIA, C.; QI, W.; HE, Z.; YANG, H.; QIAO, B. (2006) Synthesis of heptapeptides and analysis of sequence by tandem ion trap mass spectrometry. **Central European Journal of Chemistry**, 285-298.
- JOHANSSON, S. (2001) Studies on Cytotoxic and Neutrophil challenging polypeptides and cardiac glycosides of plant origin. **Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala**, 7:94.
- JOHNSON, A. E. (2005) Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. **Traffic**, 6:1078-92.
- KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1751:119-139.
- KELLY, S. M.; PRICE, N. C. (2000) The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein and Peptide Science**, 1:349-384.
- KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. (1990) A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, 36:255-266.
- KOSASI, S.; VAN DER SLUIS, W. G.; BOELEN, R.; 'T HART, L. A.; LABADIE, R. P. (1989) Labaditin, a novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha multifida* L. (euphorbiaceae). **FEBS LETTERS** 256:91-96.
- KOSASI, S.; VANDERSLUIS, W. G.; BOELEN, R.; THART, L.; LABADIE, R. P. LABADITIN. (1999) A novel cyclic decapeptide from the latex of *Jatropha-Multifida* I (Euphorbiaceae). **Febs Letters**, 256:91-96.
- KRITTANAI, C.; JOHNSON, W. C., JR. (1997) Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. **Analytical Biochemistry**, 253:57-64.
- KWON, Y. U.; KODADEK, T. (2007) Quantitative Comparison of the Relative Cell Permeability of cyclic and Linear peptides. **Chemistry and Biology**, 14:671-677.
- LADOKHIN, A. S.; HOLLOWAY, P. W. (2000) Fluorescence of membrane- bound tryptophan octyl ester: A model for studying intrinsic fluorescence of protein-membrane interactions. **Biophysical Journal**, 69:506-517.
- LADOKHIN, A. S.; JAYASINGHE, S.; WHITE, S. H. (2000) How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? **Analytical Biochemistry**, 285:235-245.
- LAKOWICS, J. R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2º ed. New york: Kluwer Academic/Plenum Publishers,.
- LAKOWICZ, J. R. (1983) Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum,
- LOURA, L. M. S.; ALMEIDA, R. F. M. (2004) Tópicos de Biofísica de Membranas.

- Sociedade Portuguesa de Química**, 63:121-125.
- MAKANISH S.; CATT K. J.; BALLA T. (1994) Inhibition of agonist-stimulated inositol 1,4,5-triphosphate production and calcium signaling by the myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin. **Journal of Biological Chemistry**, 269:6528-6535.
- MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. (2001) A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, 24
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. (2002) A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochemical Analysis**, 13:51-54.
- MATSUZAKI, K. (2001) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defence? **Biochemical Society**, 29:598-601.
- MAYR, L.; SCHMID, F. X. (1993) Stabilization of a protein by guanidinium chloride. **Biochemistry** 32:7994-7998.
- MEIER, M.; SEELIG, J. (2008) Length Dependence of the Coil to β -Sheet Transition in a Membrane Environment. **Journal of the American Chemical Society**, 130:1017-1024.
- MELINO, S.; RUFINI, S.; SETTE, M.; MORERO, R.; GROTTESI, A.; PACI, M.; PETRUZZELLI, R. (1999) Zn^{+2} Ions Selectively Induce Antimicrobial Salivary Peptide Histatin-5 To Fuse Negatively Charged vesicles. Identification and Characterization of a Zinc-Binding motif Present in the Function Domain. **Biochemistry**, 38:9626-9633.
- MENEZES, H.; JARED, C. (2002) Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 132:1-7.
- MERRIFIELD, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis .1. Synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 85:2149.
- MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. (1992) An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, 13:952-962.
- NAGATA, K.; HUANG, C.; SONG, J.; NARAHASHI, T. (1997) Direct actions of anticholinesterases on the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. **Brain Research**, 769:211-218.
- NAKAMURA, M.; SEKINO-SUZUKI, N.; MITSUI, K.; OHNO-IWASHITA, Y. (1998) Contribution of tryptophan residues to the structural changes in perfringolysin O during interaction with liposomal membranes. **Journal of Biochemistry**, 123:1145-1155.
- NELSON, D. L., COX, M. (2002) *Lehninger Princípios de Bioquímica* 4º Ed.
- PARK, N. G. (1995) Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. **Biopolymers**, New York, 36:793- 801
- PAYNTER, S.; RUSSELL, D.A. (2002) Surface Plasmon Resonance Measurement of pH-Induced Responses of Immobilized Biomolecules: Conformational Change or Electrostatic Interaction Effects?. **Analytical Biochemistry**, 309:85-95.
- POWL, A. M.; EAST, M. J.; LEE, A. G.; (2003) Lipid-Protein interactions studied by introduction of tryptophan residue: the mechanosensitive Channel MscL. **Biochemistry**, 42:14306-14317.
- RAMACHANDRAN, G. N. (1968) Protein structure and crystallography. **Science**, Washington, 141:288-91.
- REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 24:536-47.

6. Referências Bibliográficas

- REZAI, T.; BOCK, J. E.; ZHOU, M. V.; KALYANARAMAN, C.; LOKEY, R. S.; JACOBSON, M. P. (2006) Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides. **Journal of the American Chemical Society**, 128:14073-14080.
- REZAI, T.; YU, B.; MILLHAUSER, G. L.; JACOBSON, M. P.; LOCKEY, S. (2006) Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers. **American Chemical Society**, 128:2510-2511.
- RIDDER, A.; SHUPJEN, P.; UNTERREITMEIER, S.; LANGOSCH, D. (2005) Tryptophan Supports Interaction of transmembrane helices. **Journal of molecular biology**, 354:894-902.
- RODGER A.; ISMAIL, M. A. (2000) Introduction to circular dichroism. In: Gore MG, editor. Spectrophotometry and spectrofluorimetry. New York: **Oxford University Press**, 99-139.
- SAMOCHOCKI, M.; HOFFLE, A.; FEHRENBACHER, A.; JOSTOCK, R.; LUDWIG, J.; CHRISTNER, C.; RADINA, M.; ZERLIN, M.; ULLMER, C.; PEREIRA, E. F. R.; LUBBERT, H.; ALBUQUERQUE, E. X.; MAELICKE, A. (2003) Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 305:1024-1036.
- SEELIG, J. (2004) Thermodynamics of Lipid-peptide Interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, 40-50.
- SFORÇA, M. L.; MACHADO, A.; FIGUEREDO, R. C. R.; OYAMA Jr, S.; SILVA, F. D.; MIRANDA, A.; DAFRE, S.; TERESA, M.; MIRANDA, M.; SPISNI, A.; PERTINHEZ, T. A. (2005) The micelle-bound Structure of na Antimicrobial Peptide Derived from the α -Chain of Bovine hemoglobin Isolated from the Tick Boophilus microplus. 44:6440-6451.
- SHAI, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lutic peptides. **Bioquímica et Biophysica acta**, 55-70.
- SHIN, S. Y.; LEE, S. H.; YANG, S. T.; PARK, E. J.; LEE, D.G.; LEE, M. K.; EOM, S. H.; SONG, W. K.; KIM, Y.; HAHM, K. S.; KIM, J.I. (2001) Antibacterial, antitumor and hemolytic activities of α -helical antibiotic peptide, P18 and its analogs. **Journal of Peptide Research**. 58:504-514.
- SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S., Y.; WOODY, R. W. (1999) Estimativa do número de alfa-hélice e beta-segmentos de folha de proteínas usando espectroscopia de dicroísmo circular. **Protein Science**, 8:370.
- STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis. **Pierce Chemical Company**.
- STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. (2005) Interaction of alamethicin with Ether-linked phospholipid: Oriented Circular Dichroism 31P Solid-State NMR, and Differential Scanning Calorimetry Studies, **Biophysical Journal**, 89:2434–2442.
- STORCH, A.; SCHRATTENHOLZ, J. C.; COOPER, E. M.; ABDEL-GHANI, O.; GUTBROD, K. H.; WEBER, S.; REINHARDT, C.; LOBRON, B.; HERMSEN, V.; SOSKIC, E. F. R.; PEREIRA, E. X.; ALBUQUERQUE, C. (1995) Physostigmine, galanthamine and codeine act as noncompetitive nicotinic receptor agonists on clonal rat pheochromocytoma cells. **European Journal Pharmacology**, 290:207–219.
- STRYER, L. Bioquímica - 4ª Ed. (1996) Guanabara Koogan.

- THENNARASU, S.; NAGARAJ, R. (1996) Specific antimicrobial and hemolytic activities of 18-residue peptides derived from the amino terminal region of the toxin pardaxin. **Protein Engineering** 9:1219-1224.
- TORCHILIN, V. P. (2004) Polymeric immunomicelles: Carriers of choice for targeted delivery of water-insoluble pharmaceuticals. 4:63-68.
- TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. (2002) Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, 26:301-304.
- VAN DER SPOEL D., LINDAHL E., HESS B., VAN BUREN A. R., GROMACS User Manual version 3.3, <http://www.gromacs.org>, 2005.
- VAN DER WEL, P. C. A.; REED, N. D.; GREATHOUSE, D. V.; KOEPPE, R. E. (2007) Orientation and motion of Tryptophan Interfacial Anchors in Membrane Spanning Peptides. **Biochemistry**. 46:7514-7524.
- VAN Stokkum, I. H. M., SPOELDER, H. J. W., BLOEMENDAL, M., VAN GRONDELLE, R. GROEN, F. C. A. (1990) Estimation of Protein Secondary Structure and Error Analysis from Circular Dichroism Spectra, **Analytical Biochemistry**, 191:110-118.
- WADE, J. D.; MATHIEU, M. N.; MACRIS, M.; TREGGAR, G. W. (1999) Base-induced side reactions in Fmoc- solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as $N\alpha$ -deprotection reagent. **Letters in Peptide Science**, 7:107-112.
- WOODY, R. W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. **Journal European Biophysics**, 23:253-262.
- XIAO, Q.; PEI, D. (2007) High-Throughput synthesis and screening of cyclic peptide antibiotics. **Journal of medicinal chemistry**, 50:3132-3137.
- YANG, J. J.; PITKEATHLY, M.; RADFORD, S. E. (1994) Far-UV Circular Dichroism Reveals a Conformational Switch in a Peptide Fragment from the β -Sheet of Hen Lysozyme. **Biochemistry**, 33:7345-7353.
- ZHOU, J.; TAN, N. (1999) Plant cyclopeptides. **Journal American Chemical Society**, Chemical reviews.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)