



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE
SÓLIDA: OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO DERMADISTINCTINA K**

Rafael Andrade Tinano

**Belo Horizonte-MG
2011**



**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE
MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA TECNOLÓGICA**

**SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE
SÓLIDA: OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO
ANTIMICROBIANO DERMADISTINCTINA K**

Rafael Andrade Tinano

Monografia apresentada ao Curso de Química Tecnológica do CEFET-MG como parte das exigências da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II).

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Akemi Okuma

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Adriana Akemi Okuma (orientadora)

Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly (co-orientador)

Prof^a. Dra. Esther Maria Ferreira Lucas

Prof. Dr. Ildefonso Binatti

Monografia aprovada em 25 de novembro de 2011

**Belo Horizonte-MG
2011**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de fazer um agradecimento especial aos meus pais, José Tomaz Tinano Neto e Regina Célia Andrade Tinano, que sempre cuidaram de mim, me proporcionando uma boa educação, me ensinando a ser uma pessoa simples, honesta e sempre me incentivando a correr atrás dos meus objetivos. Agradeço todos os dias a Deus pelos pais maravilhosos que eu tenho. Agradeço, também, a minha família em especial a minha tia Maria Beatriz por todo seu carinho e apoio sempre acreditando em mim, me ajudando de todas as formas possíveis. Muito obrigado tia, serei eternamente grato.

Ao professor doutor Rodrigo Moreira Verly, que mais que um orientador é um amigo que esteve sempre disposto a ajudar trazendo grandes contribuições para a minha formação acadêmica.

A todo o pessoal do laboratório 246 de química orgânica da UFMG, Daniel, Bruno, Jarbas, Vitor, Naira, Bianca e a Roberta (laboratório de físico-química-UFMG) que me receberam de braços abertos e sempre me ajudaram nos momentos de dificuldades que enfrentei durante o desenvolvimento da síntese.

E a todos os amigos e amigas que estiveram comigo nessa longa caminhada acadêmica que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Boc	Terbutoxicarbonila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DDK	Dermadistinctina K
DDL	Dermadistinctina L
DDM	Dermadistinctina M
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamino
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dts	<i>N</i> -ditiassuccionila
EM	Espectrometria de massas
Fmoc	9-Florenilmetoxycarbonila
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
IPA	Álcool isopropílico
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidina
PEG	Polietilenoglicol
PS	Poliestireno
RNA	Ácido ribonucléico
SPFL	Síntese de peptídeos em fase líquida
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	Ácido trifluoracético
TIS	Tri-isopropilsilano
TOF	Tempo de voo
t_r	Tempo de retenção
Uv	Ultra-violeta

LISTA DE FIGURA E FLUXOGRAMA

	pg.
Figura 1: Esquema geral de aminoácidos	3
Figura 2: Isômeros L e D do aminoácido alanina.	4
Figura 3: Equação da reação de formação da ligação peptídica	6
Figura 4: Representação de um pequeno peptídeo mostrando a direção da cadeia peptídica.	6
Figura 5: Estrutura de ressonância do grupo peptídico.	7
Figura 6: Movimentação das unidades peptídicas	7
Figura 7: Modelo da conformação α -hélice	9
Figura 8: Conformação folha- β das cadeias polipeptídicas. (A) Conformação folha- β paralelo; (B) e (C) Conformação folha- β antiparalela.	10
Figura 9: Composição fosfolipídica das membranas celulares. (A) Fosfolipídeos presentes na membranas eucariotas;(B) Fosfolipídeos presentes na membranas procariotas.	13
Figura 10: Interações entre peptídeos antimicrobianos e as membranas plasmáticas dos procariotos e eucariotos.	14
Figura 11: Sapo do gênero <i>Phyllomedusa distincta</i>	16
Figura 12: Exemplo de síntese em solução utilizando resinas poliméricas.	21
Figura 13: Exemplos de solventes perfluorcarbonados utilizados na síntese em solução.	22
Figura 14: Esquema do princípio da síntese em fase líquida.	22
Figura 15: Visualização progressiva de uma resina mostrando as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas e a sua matriz com seus grupos funcionais que atuam como agentes ancorantes.	25
Figura 16: Esquema geral do princípio da síntese de peptídeo em fase sólida.	27
Figura 17: Síntese de peptídeo em fase sólida - Metodologia Merrifield. ...	29
Figura 18: Mecanismo de remoção do grupo Fmoc.	31
Figura 19: Esquema do princípio da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc.	32

Figura 20: Exemplo de estratégia com três ortogonalidades para a síntese de peptídeos em fase sólida.....	34
Figura 21 : Suporte sólido empregado na síntese do peptídeo DD K.....	35
Figura 22: Ativadores empregados na síntese do peptídeo DDK	37
Figura 23: Reação de ninhidrina para detecção do grupo amino livre	37
Figura 24: Seringa de reação utilizada na síntese do peptídeo DD K.....	38
Figura 25: Perfil de CLAE do fragmento de DDK. A linha reta representa o gradiente da análise cromatográfica.	44
Figura 26: Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra de DD K bruto, obtida da clivagem após o último acoplamento.	45
Figura 27: Perfil de CLAE da amostra de DDK bruto.....	46
Figura 28: Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra de DD K purificada.	47
Figura 29: Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra clivada da síntese após 27º acoplamento.	47

LISTA DE TABELAS E QUADROS

	pg.
Tabela 1: Peptídeos de importância biológica.....	12
Tabela 2: Acompanhamento da síntese do peptídeo DDK.....	42
Quadro 1: Estrutura e classificação dos aminoácidos encontrados nas proteínas e peptídeos.....	5
Quadro 2: Derivados de aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo DDK.....	36

RESUMO

SÍNTESE QUÍMICA DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA: OBTENÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DERMADISTINCTINA K

TINANO, R. A.; VERLY, R. M. e Okuma, A. A.

Peptídeos são biomoléculas que podem ser encontradas em uma grande variedade de organismos vivos tais como bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios e mamíferos. São menores que as proteínas sendo formadas pela união de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos, tendo massas moleculares menores que 30.000 Da. A seqüência desses aminoácidos corresponde à estrutura primária de um peptídeo e a sua estrutura secundária corresponde às conformações tridimensionais preferenciais adquiridas pela cadeia peptídica, sendo as mais comuns a α -hélice e folha- β .

Os peptídeos podem apresentar diferentes atividades biológicas e, por isso, vêm sendo estudados como agentes alternativos aos fármacos convencionais. Entretanto, há necessidade de sintetizá-los, uma vez que grande parte das fontes naturais não fornece quantidades suficientes que permitam a realização de estudos para o desenvolvimento de novas drogas antibióticas. Neste contexto, diversas técnicas de síntese vêm sendo desenvolvidas, podendo destacar a síntese enzimática, a síntese via DNA recombinante e a síntese química, que compreende a síntese em solução, em fase líquida e em fase sólida.

O presente trabalho aborda estes diferentes métodos para a obtenção de peptídeos. Além disso, é descrita também a síntese química em fase sólida do peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K (DD K), isolado da pele de anuros da classe *Phyllomedusa distincta*. Este peptídeo é o mais ativo contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e vários estudos vêm sendo realizados para aplicação desse peptídeo como protótipo de um fármaco antimicrobiano devido a sua baixa atividade hemolítica.

Palavras-chave: Síntese de peptídeos, peptídeos antimicrobianos, dermadistinctina K.

SUMÁRIO

	pg.
Lista de Abreviaturas.....	ii
Lista de Figuras e Fluxograma.....	iii
Lista de Tabelas e Quadros.....	v
Resumo.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Estrutura e potencial químico dos peptídeos	3
2.2 Peptídeos biologicamente ativos.....	10
2.2.1 Peptídeos Antimicrobianos	12
2.3 Síntese de peptídeos.....	17
2.3.1 Síntese química.....	20
2.4 Síntese de peptídeo em fase sólida	24
2.4.1 Estratégia Merrifield.....	28
2.4.2 Estratégia Fmoc	30
2.4.3 Estratégia com três ortogonalidades e mais dimensões	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Síntese do peptídeo DD K.....	34
3.1.1 Preparação da resina	38
3.1.2 Etapa de acoplamento.....	39
3.1.3 Etapa de desproteção	39
3.1.4 Etapa de clivagem do peptídeo da resina	39
3.1.5 Análise cromatográfica e purificação	40
3.1.6 Caracterização por Espectrometria de Massas	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Síntese do peptídeo DD K.....	41
4.2 Purificação e Caracterização	45
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Vários microrganismos vêm desenvolvendo resistência aos diversos antibióticos de uso convencional e aos antibióticos de última geração, ocasionando graves problemas de saúde pública e grandes prejuízos econômicos. As infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos e aos inúmeros agentes germicidas vêm atingindo índices cada vez mais elevados que colocam em risco a saúde dos seres vivos. Nesse contexto, inúmeros grupos de pesquisas, assim como a indústria farmacêutica, têm se motivado para o desenvolvimento de novas moléculas, naturais ou sintéticas, com o potencial de neutralizar ou danificar o patógeno alvo ao invés de afetá-lo geneticamente, inibindo assim a sua resistência (Prates e Bloch Jr, 2000).

Muitos seres vivos biossintetizam um imenso arsenal de substâncias químicas como, por exemplo, aminas, derivados de esteróides, alcalóides e peptídeos no combate a predadores e microrganismos patogênicos. Dentre todas as substâncias químicas citadas destacam-se os peptídeos que agem diretamente nas membranas bacterianas causando a lise celular. Vários desses peptídeos são encontrados em uma grande variedade de seres vivos incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios, aracnídeos e mamíferos. Entretanto nenhum dos organismos mencionados anteriormente se equivale aos anfíbios, onde é possível encontrar, principalmente em sua pele, uma vasta variedade dessas moléculas biologicamente ativas (Verly, 2006).

Moléculas de peptídeos podem apresentar diversas atividades como bactericidas, fungicidas, virucidas, tumoricidas e outras, e portanto, têm tornado-se moléculas alternativas aos antibióticos convencionais. Além disso, muitos estudos vêm sendo realizados para a criação de modelos para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (de Miranda Honorato, 2009). Estas descobertas geram um grande interesse na sociedade

científica por essa classe de compostos. Entretanto, como a grande maioria das fontes naturais é pobre nestes tipos de substância, o que impossibilita o isolamento de quantidades suficientes para a realização destes estudos, há a necessidade de sintetizá-las. Assim sendo, novos métodos de síntese estão sendo desenvolvidos e aprimorados. Entre esses novos métodos pode-se destacar a síntese de peptídeos em fase sólida introduzida por Merrifield, que consiste na introdução de polímeros insolúveis como suportes para a construção de cadeias peptídicas. Desde a sua descoberta, a síntese de peptídeos em fase sólida vem sendo desenvolvida e, atualmente, é o método mais empregado para reproduzir ou criar novas moléculas de peptídeos de forma sintética.

Nesta monografia serão abordadas algumas das principais metodologias de síntese de peptídeos incluindo a síntese enzimática, via DNA recombinante e a síntese química, sendo essa última focada na síntese em fase sólida. O trabalho tem como objetivo a obtenção do peptídeo antimicrobiano dermadistinctina K (DD K) utilizando a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) via a estratégia Fmoc. Esse peptídeo foi isolado pela primeira vez da espécie *phyllomedusa distincta*, encontrado na floresta amazônica brasileira (Batista *et al.*, 1999), e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas*. Além disso, nesse trabalho serão apresentados também os resultados da purificação e caracterização do peptídeo sintetizado, permitindo a verificação da eficiência do método empregado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura e potencial químico dos peptídeos

Peptídeos são biomoléculas menores que as proteínas e são formadas pela união de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos, com massas moleculares inferiores a 30.000 Da (Campbell e Farrell, 2004). Estima-se que peptídeos contêm até 100 aminoácidos enquanto as proteínas são superiores a 10000Da (Marzzoco e Torres, 2007).

Os aminoácidos são substâncias que possuem como estrutura comum um grupo amino ($-NH_2$) e um grupo carboxila ($-COOH$), com exceção da prolina que possui um grupo imino ($-NH-$) ao invés de um grupo amino, ligados a um carbono alfa. Ao carbono alfa também se encontram ligados um átomo de hidrogênio e um grupo variável, que é o responsável por determinar a identidade dos aminoácidos. Estes grupos que diferenciam os aminoácidos entre si são denominados cadeias laterais e usualmente podem ser representados pela letra R (Figura 1). (Marzzoco e Torres, 2007).

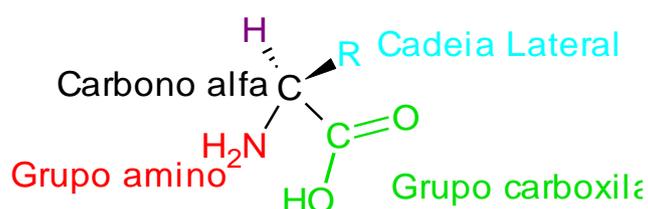


Figura 1 – Esquema geral de aminoácidos

Devido a esta estrutura comum o carbono alfa de todos os aminoácidos, com exceção da glicina, é classificado como assimétrico, pois está ligado a quatro grupamentos diferentes ($-NH_3^+$, $-COO^-$, $-H$, $-R$). A glicina é uma exceção, pois a sua cadeia lateral é constituída apenas de um átomo de hidrogênio. Esses aminoácidos com carbono alfa assimétricos podem gerar dois isômeros com configurações D e L, onde um é imagem especular do outro (Figura 2, p.4). Todos os peptídeos e proteínas encontrados nos seres vivos são constituídos de aminoácidos com a configuração L. Aminoácidos com a configuração D são encontrados em alguns antibióticos e em peptídeo constituintes da parede celular de algumas bactérias e são formados através de modificações dos 20 aminoácidos comumente

encontrados nas proteínas ou são produtos intermediários formados na via de síntese desses compostos (Marzzoco e Torres, 2007).

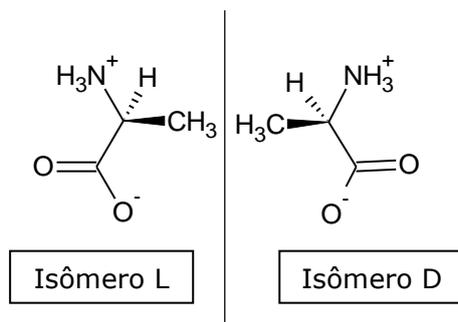
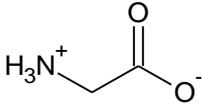
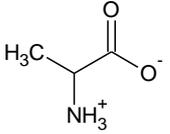
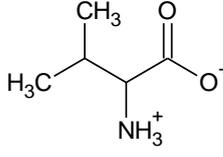
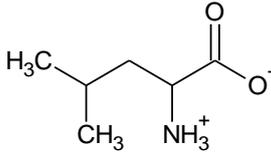
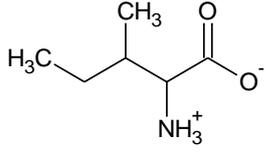
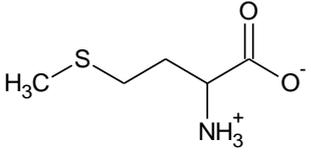
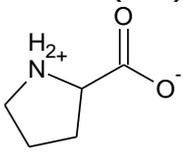
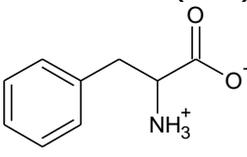
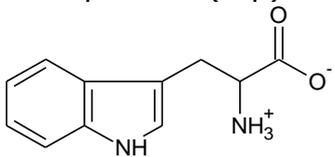
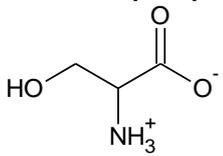
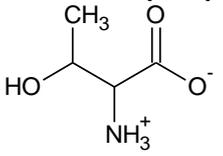
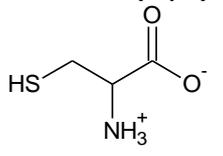
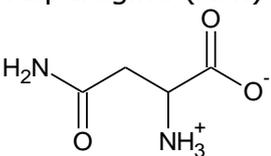
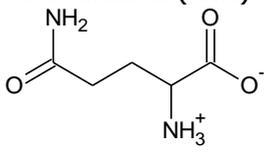
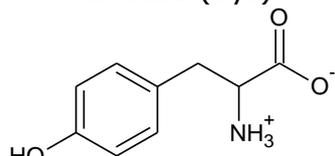
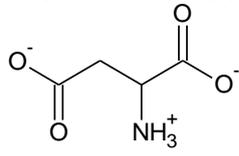
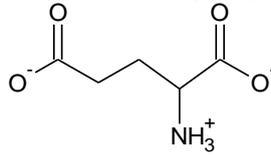
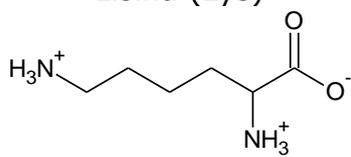
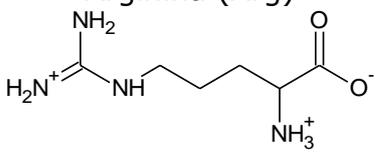
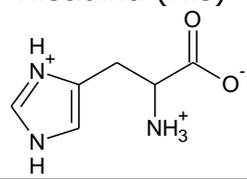


Figura 2 - Isômeros L e D do aminoácido alanina.

Os aminoácidos podem ser classificados, de acordo com a polaridade das suas cadeias laterais, em dois grandes grupos (Quadro 1, p.5): Aminoácidos apolares (que possuem uma cadeia lateral hidrofóbica) e aminoácidos polares (que possuem a cadeia lateral hidrofílica). Os polares ainda podem ser subdivididos em: polares não carregados e polares carregados negativamente ou positivamente em suas cadeias laterais. As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos, tais como polaridade, são extremamente importantes para compreender as conformações adquiridas pelas proteínas e peptídeos e, portanto, suas funções (Marzzoco e Torres, 2007).

Os aminoácidos em peptídeos e proteínas são unidos uns aos outros através de uma ligação covalente, que consiste em uma ligação amídica também conhecida como ligação peptídica. Essa ligação acontece entre um grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro, resultando na perda de uma molécula de água (Figura 3, p.6). Devido a este fato os aminoácidos constituintes de peptídeos e proteínas são denominados de resíduos de aminoácidos. A cadeia peptídica é formada então pela seqüência dos aminoácidos e apresenta um resíduo carboxi-terminal (C-terminal) e outro amino-terminal (N-terminal). A cadeia peptídica possui um sentido pré-determinado o qual tem início no resíduo N-terminal e final no resíduo C-terminal (Figura 4, p.6) (Berg, Stryer *et al.*, 2008).

Quadro 1: Estrutura e Classificação dos aminoácidos segundo suas cadeias laterais

Apolares (Hidrofóbicos)		
<p>Glicina (Gly)</p> 	<p>Alanina (Ala)</p> 	<p>Valina (Val)</p> 
<p>Leucina (Leu)</p> 	<p>Isoleucina (Ile)</p> 	<p>Metionina (Met)</p> 
<p>Prolina (Pro)</p> 	<p>Fenilalanina (Phe)</p> 	<p>Triptofano (Trp)</p> 
Polares não carregados (Hidrofílicos)		
<p>Serina (Ser)</p> 	<p>Treonina (Thr)</p> 	<p>Cisteína (Cys)</p> 
<p>Asparagina (Asn)</p> 	<p>Glutamina (Gln)</p> 	<p>Tirosina (Tyr)</p> 
Polares carregados negativamente (Ácidos)		
<p>Aspartato (Asp)</p> 	<p>Glutamato (Glu)</p> 	
Polares carregados positivamente (Básicos)		
<p>Lisina (Lys)</p> 	<p>Arginina (Arg)</p> 	<p>Histidina (His)</p> 

A seqüência de aminoácidos de cada peptídeo ou proteína é denominada de estrutura primária. Observa-se que a cadeia peptídica é formada por duas partes. Uma parte que se repete continuamente, denominada de cadeia principal e a outra que é variável onde se localizam as cadeias laterais (Verly, 2006; Berg, Stryer *et al.*, 2008).

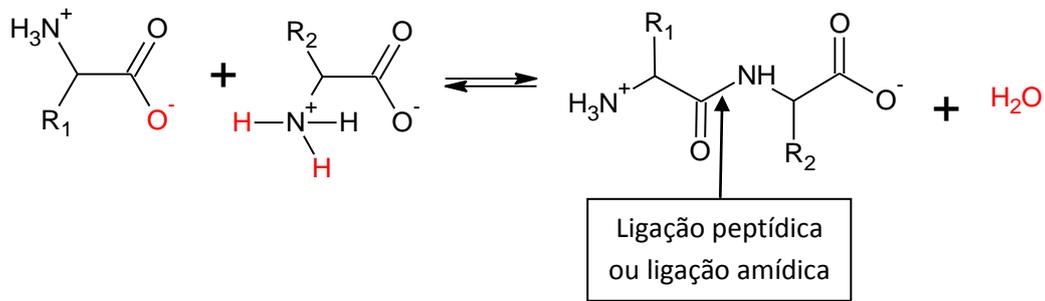


Figura 3 – Equação da reação de formação da ligação peptídica

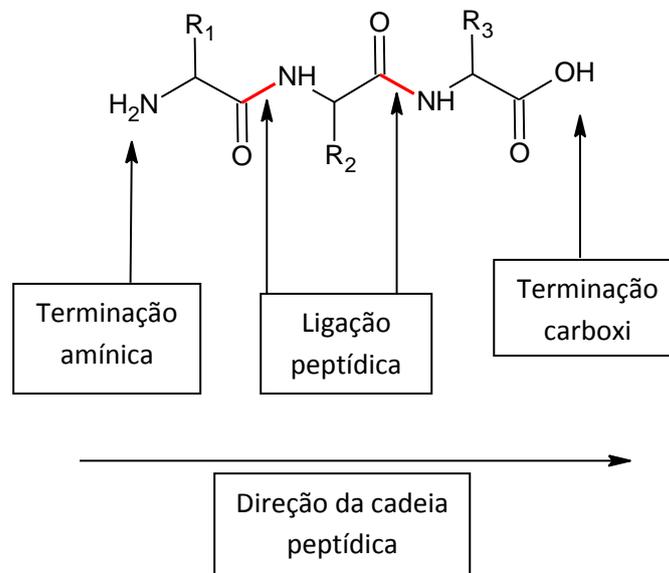


Figura 4 – Representação de um pequeno peptídeo mostrando a direção da cadeia peptídica.

É importante salientar que as propriedades das ligações peptídicas impõem restrições na conformação da estrutura do peptídeo formado. Apesar da ligação peptídica ser representada por uma ligação simples ela possui características intermediárias entre uma ligação simples e uma ligação dupla. Esta característica deve-se ao efeito de ressonância que ocorre devido à conjugação dos pares de elétrons não ligantes do nitrogênio com os elétrons π da carbonila (Figura 5, p.7), resultando em uma elevada barreira rotacional para a ligação C-N.

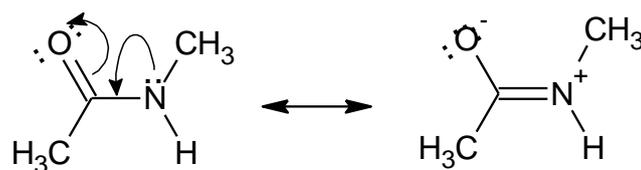


Figura 5 – Estrutura de ressonância do grupo peptídico.

Como resultado desse caráter parcial de ligação dupla a cadeia peptídica principal é constituída por varias unidades planares, conforme ilustrado na figura 6 (Marzzoco e Torres, 2007). Por outro lado, as ligações C_{α} -C e N- C_{α} possuem baixa barreira rotacional e permitem diferentes orientações dos planos contendo as ligações peptídicas (Figura 6) (Marzzoco e Torres, 2007). Essas características estruturais geram influências diretas nas conformações tridimensionais de peptídeos e proteínas. São restrições estereoquímicas que estão diretamente relacionadas às conformações preferenciais dos esqueletos peptídicos e protéico (Campbell e Farrell, 2004). A estas conformações preferenciais dá-se o nome de estrutura secundária, sendo as mais comuns a α -hélice e folha- β .

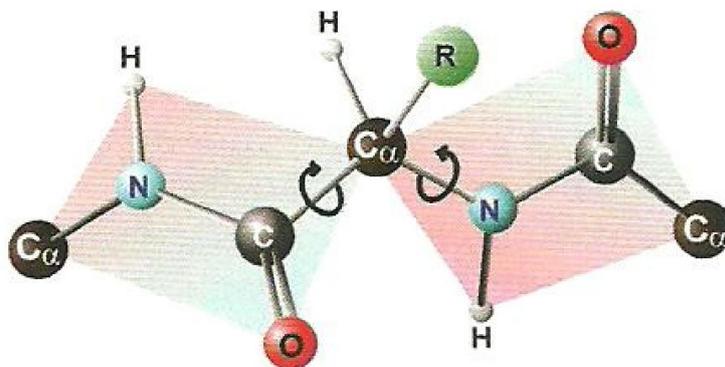


Figura 6 – Movimentação das unidades peptídicas

Fonte: (Marzzoco e Torres, 2007)

Na conformação α -hélice a cadeia polipeptídica forma uma estrutura helicoidal que é estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares e paralelas ao eixo da hélice. Estas ligações de hidrogênio ocorrem entre o hidrogênio amídico de um resíduo de aminoácido com o oxigênio do grupo carbonila de outro resíduo distantes por três resíduos na cadeia peptídica

(Nelson e Cox, 2002). Essa estrutura tem um passo, distância linear entre pontos correspondentes em voltas sucessivas, de 5,4 Å e cada passo da hélice inclui 3,6 resíduos de aminoácidos (Figura 7, p.9), sendo que cada passo sucessivo é unido aos passos subjacentes por três ou quatro ligações de hidrogênio (Nelson e Cox, 2002; Campbell e Farrell, 2004; Marzzoco e Torres, 2007).

Na α -hélice as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos encontram-se projetadas para a face externa da hélice fazendo com que não estabeleçam ligações de hidrogênio. Isto faz com que a estabilidade da α -hélice seja independente, até certo ponto, do tipo de cadeias laterais presentes nos resíduos de aminoácidos e assim vários polipeptídeos podem adquirir esse tipo de conformação. Entretanto, nem todos os polipeptídeos podem formar uma α -hélice estável. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando a cadeia polipeptídica possui diversos aminoácidos adjacentes de mesma carga que se repelem fortemente superando a força estabilizadora das ligações de hidrogênio e impedindo a formação da α -hélice (Nelson e Cox, 2002; Marzzoco e Torres, 2007). Outro fator desestabilizador de estruturas α -helicoidais de polipeptídeos é a presença de resíduos de aminoácidos de prolina e glicina. No primeiro, o átomo de nitrogênio que se encontra envolvido em uma ligação peptídica também pertence a um anel de cinco membros, causando uma limitação da rotação da ligação N-C α e, conseqüentemente, resultando em uma dobra na cadeia peptídica. Além disso, este mesmo átomo de nitrogênio não apresenta-se ligado a um átomo de hidrogênio, o que impossibilita a formação de ligações de hidrogênio interresiduais. Já a glicina, por apresentar um átomo de hidrogênio como cadeia lateral, aumenta a flexibilidade da cadeia polipeptídica, o que dificulta a formação de uma conformação mais rígida como a α -hélice (Nelson e Cox, 2002).

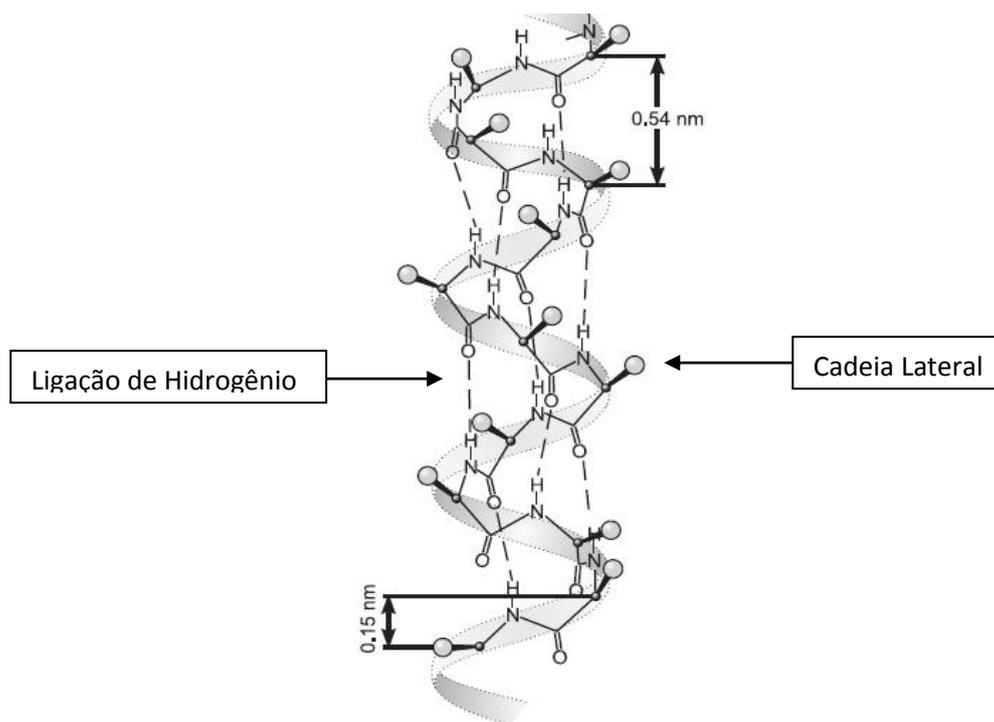


Figura 7 – Modelo da conformação α -hélice

Fonte: (Sewald e Jakubke, 2009)

Na conformação folha- β as cadeias polipeptídicas encontram-se estendidas em uma estrutura em ziguezague ao invés de helicoidal (Figura 8, p.10). Neste caso as sequências de aminoácidos podem ser dispostas lado a lado, para formar uma estrutura que se assemelha a uma série de pregas onde às cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos adjacentes encontram-se projetadas em direções opostas (Nelson e Cox, 2002). Nesta estrutura as ligações de hidrogênio são perpendiculares e não paralelas em relação à direção da cadeia protéica e são formadas entre cadeias polipeptídicas diferentes (ligações intercadeias) ou entre segmentos distantes de uma mesma cadeia (ligações intracadeias). Se as cadeias polipeptídicas se estendem na mesma direção, isto é, se as extremidades aminoterminal e carboxiterminal estão alinhadas, haverá a formação de uma conformação folha- β paralela. Entretanto, quando cadeias alternadas se estendem em direções opostas, uma folha- β antiparalela será formada (Campbell e Farrell, 2004).

Comparado com as proteínas, os peptídeos são compostos quimicamente mais versáteis, pois podem ser amidados ou esterificados na sua

extremidade carboxi, acetilados na sua extremidade amínica e sulfatados ou fosforilados em um ou mais resíduos.

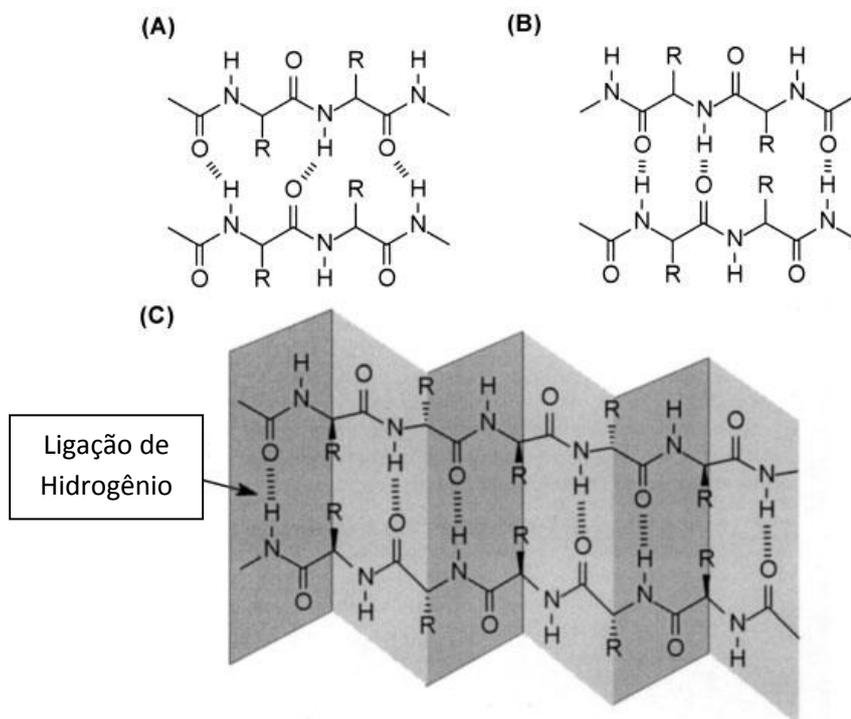


Figura 8 – Conformação folha- β das cadeias polipeptídicas. (A) Conformação folha- β paralelo; (B) e (C) Conformação folha- β antiparalela.

Fonte: (Sewald e Jakubke, 2009)

Além disso, peptídeos também são extremamente diversificados em termos funcionais, podendo atuar como toxinas, neurotransmissores, antibióticos, hormônios, antivirais entre outras (Verly, 2006).

2.2 Peptídeos biologicamente ativos

Venenos e toxinas de origem natural há muitos anos vêm representando uma extraordinária fonte de estudos para o homem devidos aos seus efeitos farmacológicos (Prates e Bloch Jr, 2000). Muitos seres vivos, com o intuito de aumentar as suas chances de sobrevivência no meio onde vivem, empregam esses tipos de substâncias químicas para se defender de predadores e microrganismos, sendo muitas destas substâncias peptídeos (Verly, 2006).

Os vertebrados, principalmente os anfíbios da ordem Anura, têm sido alvo de muitos estudos devido ao elevado potencial bioquímico na fabricação de toxinas (Dornelles, Marques *et al.*, 2010). Nas glândulas presentes na pele desses animais é produzida uma variedade de compostos ativos que compreendem moléculas alifáticas, aromáticas e heterocíclicas, além de alcalóides, esteróides, amins biogênicas, proteínas e peptídeos (Prates e Bloch Jr, 2000). Essas substâncias exercem diversas atividades biológicas, tais como cardiotoxícos, miotóxicos ou neurotóxicos, colinomiméticos, simpatomiméticos, vasoconstrictores locais, hipertensores, hemolíticos, alucinógenos antinociceptivos ou inibidores do crescimento de microrganismos (De Miranda Honorato, 2009).

Entre todas as moléculas mencionadas acima, os peptídeos são aqueles que têm despertado maior interesse devido às suas atividades como mediadores farmacológicos e a descoberta de moléculas análogas ou homólogas em tecidos do trato gastrointestinal e sistema nervoso de mamíferos (Prates e Bloch Jr, 2000).

Todo esse conhecimento sobre a importância e o papel funcional dos peptídeos começou a ser adquirido a partir do final da década de 50 e início da década de 60 quando vários peptídeos bioativos foram descobertos e tiveram as suas estruturas químicas determinadas. Isso só foi possível devido ao desenvolvimento contínuo de métodos analíticos e técnicas de isolamento e purificação cada vez mais sensíveis, como cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia de íons a base de celulose, cromatografia em contracorrente, e outros métodos desenvolvidos em várias áreas da bioquímica que complementaram e auxiliaram as técnicas utilizadas anteriormente (Sewald e Jakubke, 2009). A tabela 1, p.12, apresenta alguns exemplos de peptídeos que desempenham funções específicas no nosso organismo (Machado, Liria *et al.*, 2004).

Estas descobertas geraram um enorme interesse pelos peptídeos, principalmente aqueles que possuem atividades antimicrobianas, que vem sendo extensivamente estudados nos últimos anos. Os resultados desses estudos para a identificação de novas moléculas resultou na prospecção de diversos peptídeos biologicamente ativos que atuam no combate de

diversos microrganismos, sendo estas bactérias *Gram*-positivas, *Gram*-negativas, protozoários, fungos e até vírus (Mendel, 2008).

Tabela 1: Peptídeos de importância biológica

Peptídeos	Seqüência peptídica	Glândulas/células produtoras
Angiotensina II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Plasma sanguíneo
Oxitocina	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly	Neurohipófise
Vasopressina	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly	Neurohipófise
Leu-Encefalina	Try-Gly-Gly-Phe-Leu	Hipófise anterior e medula adrenal
Met-Encefalina	Try-Gly-Gly-Phe-Met	
Glutathiona	Glu-Cys-Gly	Maioria das células

Fonte: (Sewald e Jakubke, 2009) modificado.

2.2.1 Peptídeos Antimicrobianos

Alguns peptídeos apresentam a capacidade de se associar a bicamada lipídica das células. Essa associação tem como consequência a formação de poros na membrana ocasionando um possível desequilíbrio de cargas ou a lise celular. Essa capacidade dos peptídeos de danificarem as membranas celulares e provocarem a sua lise está diretamente relacionada com o seu potencial antimicrobiano (Vizzotto, 2009).

Em geral os peptídeos antimicrobianos apresentam baixa massa molecular (menos de 100 aminoácidos) contendo regiões ricas em aminoácidos básicos (como lisina e arginina, Quadro 1 , p.5) o que confere a molécula uma carga líquida positiva (+2 e +9) em pH fisiológico, e regiões ricas em aminoácidos hidrofóbicos. Essa separação espacial entre aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos confere uma característica anfipática aos peptídeos antimicrobianos, o que é fundamental para sua atividade biológica (Da Silva, 2008).

A capacidade de associação desses peptídeos com a membrana fosfolipídica é determinada por interações hidrofóbicas entre os aminoácidos não polares

constituintes do peptídeo com a parte hidrofóbica da membrana, e interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos peptídeos com as cargas negativas dos lipídeos. Entretanto as composições fosfolipídicas das membranas plasmáticas de procaríotos e eucariotos são diferentes. Os fosfolipídios presentes nos eucariotos são basicamente a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline enquanto nos procaríotos estão presentes o fosfatidilglicerol, cardiolípine e fosfatidilserina (Figura 9). Essa distinção ocasiona diferenças de cargas e de hidrofobicidade entre as membranas plasmáticas. Com isso é possível dizer que as membranas dos procaríotos são mais vulneráveis às ações dos peptídeos antimicrobianos tendo em vista a alta densidade de cargas negativas devido à presença de grandes quantidades de fosfolipídios negativamente carregados (Figura 10, p. 14), como os fosfatidilglicerol e as cardiolípine. Essa seletividade lipídica juntamente com propriedades físico-químicas explicam a seletividade tóxica apresentada pelos peptídeos antimicrobianos (De Miranda Honorato, 2009; Vizzotto, 2009).

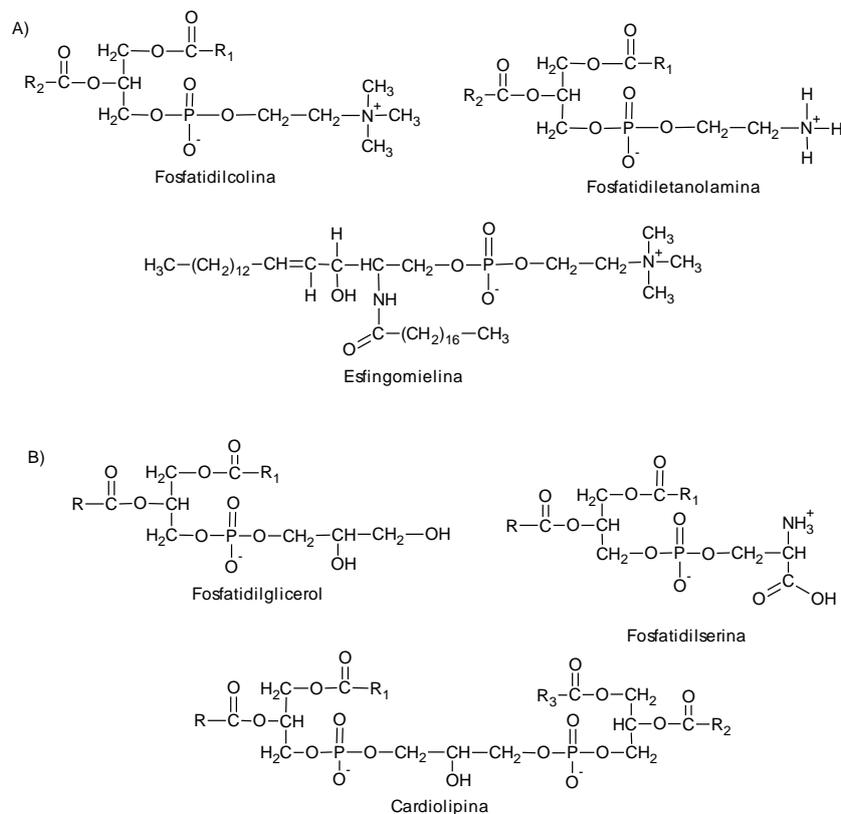


Figura 9 - Composição fosfolipídica das membranas celulares. (A) Fosfolipídeos presentes na membranas eucariotas;(B) Fosfolipídeos presentes na membranas procaríotas.

Outro fator que contribui para esta seletividade de peptídeos antimicrobianos a membranas bacterianas, é a presença de colesterol na composição das membranas plasmáticas de eucariotos. Estudos mostram que o colesterol estabiliza a membrana plasmática e diminui as interações entre peptídeo/membrana (Verly, Rodrigues *et al.*, 2008).

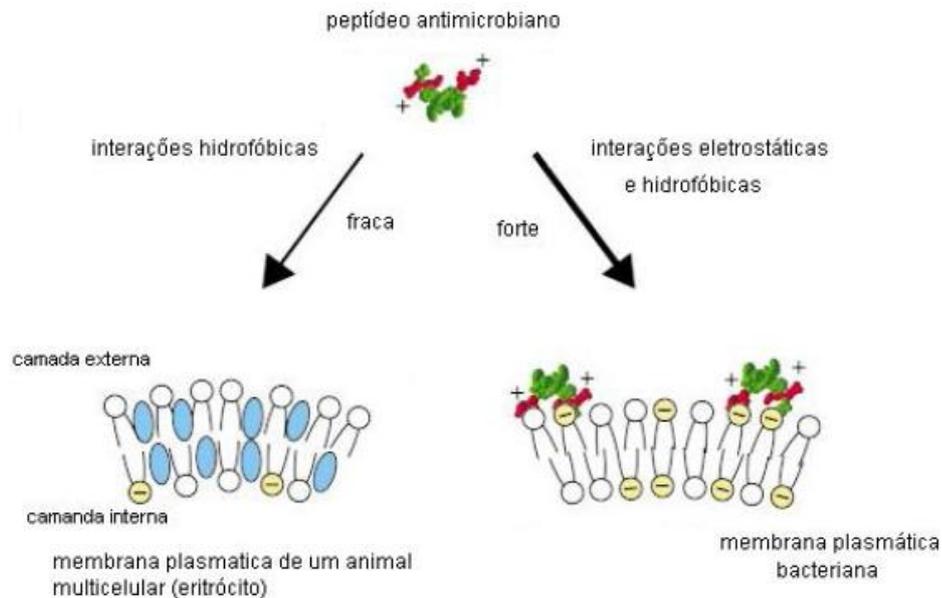


Figura 10 - Interações entre peptídeos antimicrobianos e as membranas plasmáticas dos procaríotos e eucariotos. Na representação da membrana de eucarioto as moléculas em azul representam o colesterol.

Fonte: (Da Silva, 2011)

Segundo Miranda Honorato (2009) mais de 900 peptídeos antimicrobianos já foram descritos. Em relação aos anfíbios mais de 600 peptídeos encontram-se identificados como possíveis antimicrobianos, sendo que vários deles já foram caracterizados em relação ao seu espectro de ação (Mendel, 2008).

Entre os anfíbios a família *Hylidae* se destaca por ser uma rica fonte de peptídeos antimicrobianos. Dentro dessa família a subfamília *Phyllomedusinae* é a que vem sendo mais estudada. Mais de 80 peptídeos antimicrobianos já foram descritos entre os quatro gêneros constituintes dessa subfamília: *Agalychnis*, *Hylomantis*, *Pachymedusa* e *Phyllomedusa*.

Mesmo apresentando diferenças na estrutura primária e conseqüentemente no seu espectro de ação, os peptídeos antimicrobianos da subfamília *Phyllomedusinae* são agrupados, por similaridade, em seis famílias de moléculas: dermaseptinas, filoseptinas, plasticinas, dermatoxinas, filoxinas e hiposinas (Mendel, 2008).

A família das dermaseptinas é composta por mais de 30 moléculas isoladas da secreção cutânea dos anfíbios da subfamília *Phyllomedusinae*. Mesmo sendo uma das famílias mais representativas entre as famílias dos peptídeos antimicrobianos o número de moléculas descritas ainda é reduzido em relação ao número de espécies ainda a serem estudados (Brand, 2007).

As dermaseptinas são peptídeos compostos por 24 a 34 resíduos de aminoácidos e na sua maioria apresentam um resíduo de triptofano (W) na terceira posição da região *N*-terminal, apesar de que substituições por metionina ou valina já tenham sido descritos (Brand, Leite *et al.*, 2002). São moléculas catiônicas e anfipáticas tendo sua carga positiva líquida variando de 2 a 5, apresentando maior abundância de resíduos de lisina (K) em relação aos resíduos de arginina (R) e histidina (H). Com relação à parte hidrofóbica da cadeia peptídica das dermaseptinas, são encontrados com maior frequência resíduos de leucina (L), isoleucina (I), alanina (A) e valina (V). Membros dessa família apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias *Gram* positivas, *Gram* negativas, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (Brand, 2007).

As dermaseptinas apresentam inúmeras vantagens em relação aos antibióticos tradicionais, como a capacidade de destruir rapidamente as células-alvo, além da sua alta eficiência contra linhagens de patógenos multi-resistentes. Essas características tornam as dermaseptinas fontes alternativas de antibióticos podendo ser utilizadas como protótipo na produção de novos fármacos (De Miranda Honorato, 2009).

Um dos representantes da família das dermaseptinas é o peptídeo dermadistinctina K (DD K), que será sintetizado neste trabalho. A DD K é um peptídeo linear composto de 33 resíduos de aminoácidos e produzido pelas glândulas granulares da pele do sapo do gênero *Phyllomedusa*

distincta (Figura 11), que vive na mata atlântica da região sudeste do Brasil. Além do DD K, o anuro da espécie *Phyllomedusa distincta* produz uma variedade de peptídeos antimicrobianos da família das dermaseptinas, incluindo o DD M e o DD L. Entretanto, dentre todos a DD K é o que apresenta o maior espectro de ação contra diversos patógenos, incluindo cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de serem moléculas com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Estas propriedades juntamente com a sua baixa atividade hemolítica tornam o peptídeo DD K alvo de intensos estudos para o desenvolvimento de protótipos de drogas antimicrobianas que apresentam baixa atividade em células de mamíferos (Verly, Rodrigues *et al.*, 2008; Verly, Moraes *et al.*, 2009).



Figura 11 - Sapo do gênero *Phyllomedusa distincta*
Fonte: (Verly, 2006)

Entretanto, a obtenção destes peptídeos via extração de suas fontes naturais torna-se inviável, já que grande parte destas fontes é pobre neste tipo de moléculas, o que dificulta o isolamento de quantidades suficientes para a realização de estudos necessários para o desenvolvimento dos novos fármacos antimicrobianos. Com isso diversas técnicas eficientes de síntese foram sendo desenvolvidas e aprimoradas, possibilitando a produção de peptídeos em escalas diferentes (Machado, Liria *et al.*, 2004).

2.3 Síntese de peptídeos

Atualmente são empregados três métodos para a síntese de peptídeos em diversas escalas. Esses métodos são: (i) Síntese enzimática, que utiliza enzimas proteolíticas para catalisar as reações de formação das ligações peptídicas (Guzmán, Barberis *et al.*, 2007); (ii) Síntese via DNA recombinante (Sewald e Jakubke, 2009) que emprega as técnicas avançadas da biotecnologia e a (iii) síntese química (Kent, 1988).

A escolha do método mais adequado é determinada pela seqüência e pelo tamanho da molécula que se deseja sintetizar. No caso de Peptídeos de elevada massa molar, como insulina e outros hormônios ou até mesmo proteínas, o método mais eficaz é síntese via DNA recombinante (Walsh, 2005). A síntese química é usualmente empregada quando o objetivo é a síntese de pequenos ou médios peptídeos variando de 5 a 80 resíduos de aminoácidos (Guzmán, Barberis *et al.*, 2007). Já a síntese enzimática fica restrita a produção de pequenos peptídeos com no máximo 10 resíduos de aminoácidos, sendo amplamente empregada na produção de dipeptídeos (Calvet, Torres *et al.*, 1996) e tripeptídeos (Byun e Kim, 2002). Neste sentido observa-se que na maioria dos casos as tecnologias desenvolvidas para a síntese de peptídeos não são competitivas entre si e nenhum desses métodos deixa de ser empregado em decorrência do desenvolvimento do outro.

Como dito anteriormente a síntese enzimática de peptídeos consiste na utilização de enzimas proteolíticas que são responsáveis por catalisar as reações de formação das ligações peptídicas. Entretanto essas enzimas podem agir como hidrolases, catalisando a clivagem das ligações peptídicas e originando produtos iônicos termodinamicamente mais estáveis. Portanto, uma reação catalisada por uma enzima trata-se de uma reação em equilíbrio, o qual pode estar deslocado para o sentido inverso que consiste na quebra das ligações peptídicas. Assim sendo, em muitos casos é necessária a utilização de diferentes estratégias para deslocar o equilíbrio no sentido direto da formação de ligações peptídicas e muitas estratégias estão sendo desenvolvidas, sendo classificadas de acordo com o componente carboxílico utilizado (Chen, Zhang *et al.*, 2010). Entre estas

estratégias pode-se destacar a termodinamicamente controlada, na qual o componente carboxílico terminal se encontra na sua forma livre e a cineticamente controlada que emprega o componente carboxílico na sua forma ativada utilizando enzimas que atuam como transferases catalisando a transferência de um grupo acil de um doador de acila ao componente nucleofílico através da formação de um intermediário acil-enzima. (Sewald e Jakubke, 2009).

As vantagens que os métodos enzimáticos trouxeram para a síntese de peptídeos são indiscutíveis. Essas vantagens estão relacionadas com a prevenção de racemização, a possibilidade do emprego de aminoácidos não modificados, utilização de quantidades pequenas de solventes e reagentes tóxicos, possibilidade de reutilização dos biocatalisadores, e a possibilidade da utilização de reatores para a produção de peptídeos em larga escala (Sewald e Jakubke, 2009). No entanto, as condições de temperatura e pH empregadas para a síntese de peptídeo pode ser prejudicial para a estabilidade das proteases levando uma redução da sua atividade (Bordusa, 2002). Além disso, não há nenhuma enzima universal que possa catalisar todas as combinações possíveis dos 21 aminoácidos, o que restringe esta metodologia sintética a determinadas seqüências peptídicas (Machado, Liria *et al.*, 2004) e em muito casos as proteases não são consideradas bons biocatalisadores para sínteses de peptídeos (Bordusa, 2002).

A síntese de peptídeos via tecnologia do DNA recombinante emprega as técnicas avançadas de clonagem e expressão genética utilizando microrganismos como sistemas de expressão para a produção de um ou vários peptídeos simultaneamente. A expressão gênica equivale a síntese do mRNA (transcrição) com posterior síntese da proteína (tradução). A biossíntese de um gene, correspondente a uma proteína ou peptídeo, depende da recombinação do material genético do microrganismo com o fragmento de DNA que possui o material genético equivalente ao peptídeo ou proteína desejada. Em muitas frentes de pesquisas as bactérias são os principais organismos empregados como sistemas de expressão, nos quais os fragmentos de DNA contendo o material genético a ser transfectado são introduzidos utilizando plasmídeos como vetores. Outros ramos empregam

a técnica do “*phage display*” que utilizam fagos, vírus responsáveis por infectar bactérias, como vetores para sintetizar o peptídeo desejado (Kay, Winter *et al.*, 1996). Em ambos os processos são sintetizados peptídeos compostos por aminoácidos proteínogênicos não modificados (Machado, Liria *et al.*, 2004).

A *Escherichia coli* é o principal microrganismo empregado para a produção de peptídeos via a tecnologia de DNA recombinante. Entretanto, observam-se inúmeras desvantagens no seu emprego. Entre essas desvantagens pode-se destacar a produção de endotoxinas juntamente com a produção da proteína alvo. Atualmente diversos organismos vêm sendo selecionados para atuarem como hospedeiros para a molécula de DNA recombinante, tornando-se sistemas de expressão alternativos à *Escherichia coli*. *Bacillus*, *Rhizobium* e *Streptomyces* vêm sendo empregados como novos organismos hospedeiros nas técnicas recombinantes além das células de eucariotos como as de insetos e mamíferos (Sewald e Jakubke, 2009).

Devido ao grande potencial associado às tecnologias aplicadas a genes diversas investigações estão sendo aplicadas no campo da biotecnologia e da agricultura e no desenvolvimento de medicamentos químicos. Atualmente vários peptídeos e proteínas são obtidos através da aplicação das técnicas da engenharia genética. Como exemplo da síntese dessas biomoléculas empregando as técnicas da engenharia genética pode-se destacar a somatostatina, um peptídeo de mamífero composto por 14 resíduos de aminoácidos, que foi o primeiro peptídeo sintetizado via tecnologia do DNA recombinante (Itakura, Hirose *et al.*, 1977), o hormônio de crescimento humano (Goeddel, Heyneker *et al.*, 1979) e os análogos de insulina (Barnett e Owens, 1997) dos quais muitos estão sendo usados no combate contra o diabetes *mellitus* tipo 1 e 2.

As técnicas empregadas para a expressão genética envolvendo células vivas apresentam determinadas limitações principalmente no que diz respeito à produção de polipeptídeos contendo entre 50 a 60 resíduos de aminoácidos. Outro problema verificado diz respeito à formação de peptídeos instáveis e tóxicos para as células, como antimicrobianos, além da insolubilidade dos

peptídeos sintetizados que ocasionam a formação de agregados. (Sewald e Jakubke, 2009).

Uma alternativa é a síntese química de peptídeos. Como a síntese empregada neste trabalho é classificada como síntese química, será descrito no próximo item uma breve abordagem dos princípios básicos dos principais tipos de síntese química de peptídeos.

2.3.1 Síntese química

A síntese química engloba a síntese em solução, também conhecida como síntese clássica, e as sínteses em fase sólida e em fase líquida. Esse tipo de síntese consiste na utilização de reagentes químicos para ativação do grupo carboxílico de um resíduo de aminoácido permitindo o ataque nucleofílico do grupo amino de outro resíduo de aminoácido resultando na formação da ligação peptídica. Todos os grupos funcionais que não estejam envolvidos na reação de formação das ligações peptídicas são devidamente protegidos na tentativa de reduzir a formação de subprodutos de reações secundárias.

Na síntese em solução todos os reagentes empregados encontram-se solubilizados e em contato direto com o solvente e a reação ocorre tanto na direção N→C-terminal quanto na direção C→N-terminal (Machado, Liria *et al.*, 2004).

Entre as vantagens relacionadas com este tipo de síntese podemos mencionar o maior contato entre os reagentes empregados, fazendo com que a reação seja deslocada preferencialmente no sentido da formação dos produtos, o baixo custo envolvido na reação comparada as demais metodologias descritas anteriormente, e as diversas possibilidades de modificações estruturais no produto da síntese (Amaral, Neves *et al.*, 2003).

Entretanto, a formação de subprodutos devido à ocorrência de reações paralelas e a degradação de intermediários, levam a uma redução drástica no rendimento final da síntese. Todavia, a principal desvantagem da síntese orgânica em solução é a complexidade e o tempo elevado para o processo de purificação, que geralmente emprega evaporação de solventes, extração, cromatografia em coluna, cristalização, destilação e outras técnicas não

muito comuns, sem considerar o grande volume de solvente utilizado gerando grandes quantidades de resíduos químicos. Esses problemas são agravados quando se leva em conta que na síntese química estão envolvidos um grande número de etapas para obtenção do produto final, diminuindo o rendimento e dificultando a purificação. (Marquardt e Eifler-Lima, 2001).

Contudo, estratégias estão sendo desenvolvidas por alguns pesquisadores na tentativa de reduzir a complexidade das etapas de purificação empregadas na síntese em solução. Um exemplo dessas estratégias está ilustrado na figura 12. O excesso de ácido, utilizado para obtenção dos derivados pirazólicos, foi removido do meio reacional pela adição de uma resina insolúvel de poliestireno-isocianato. A purificação foi realizada por uma simples filtração obtendo um produto com 97% de pureza. Essas metodologias empregando resinas poliméricas para a remoção do excesso dos materiais de partida ou de subprodutos tem se mostrado eficientes a síntese química em solução (Dias e Corrêa, 2001).

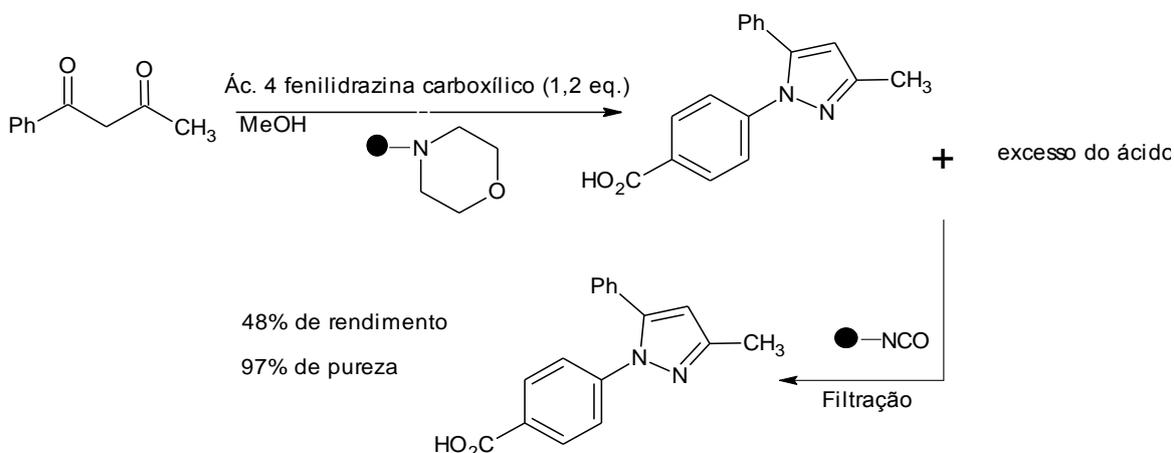


Figura 12 - Exemplo de síntese em solução utilizando resinas poliméricas. Figura adaptada de (Dias e Corrêa, 2001)

Outro exemplo de estratégia desenvolvida para facilitar os processos de purificação é baseado no princípio de extração líquido-líquido. Nesta técnica a remoção das impurezas é realizada utilizando solventes perfluorcarbonados (Figura 13, p.22). Esses solventes são imiscíveis em água e na maioria dos solventes orgânicos e formam no meio reacional uma terceira fase que é facilmente removida (Amaral, Neves *et al.*, 2003).

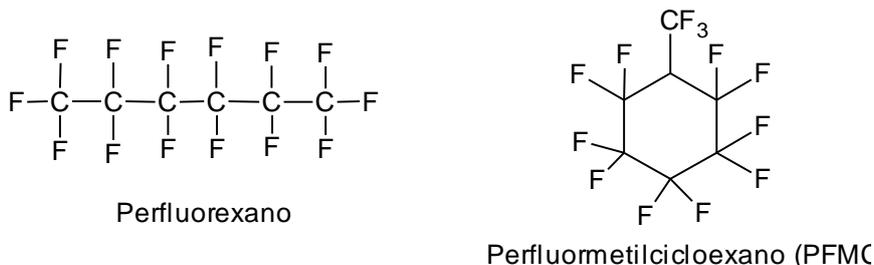


Figura 13 - Exemplos de solventes perfluorcarbonados utilizados na síntese em solução. Figura adaptada de (Amaral, Neves *et al.*, 2003)

Nos últimos anos observou-se o desenvolvimento de uma nova técnica de síntese de peptídeos baseada no emprego de suportes poliméricos solúveis permitindo que reações utilizando resinas sejam realizadas na forma homogênea (Sewald e Jakubke, 2009). Esse novo método de síntese foi denominado de síntese de peptídeo em fase líquida (SPFL) (Figura 14) e vem sendo cada vez mais utilizada, pois combina as vantagens associadas na síntese em fase sólida, principalmente no que se refere na facilidade da etapa de purificação, com as vantagens da síntese em solução mencionadas anteriormente.

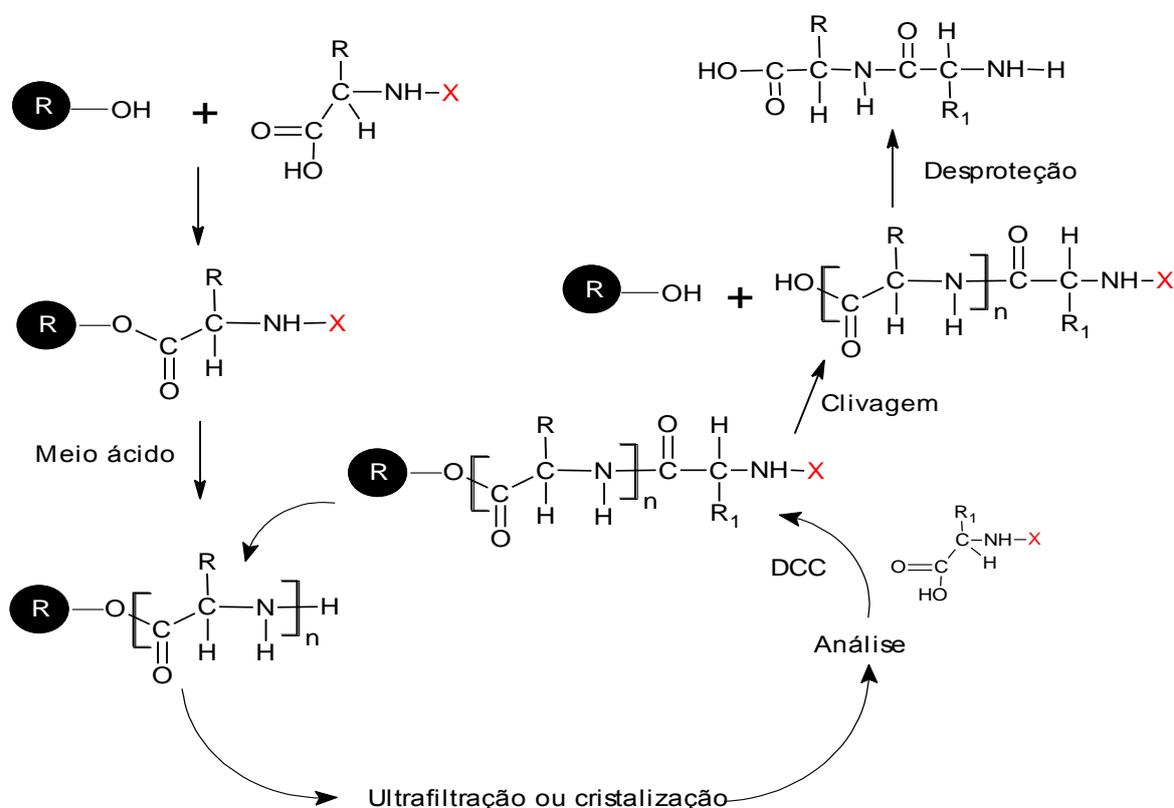


Figura 14 - Esquema do princípio da síntese em fase líquida. A espécie X, em vermelho, representa o grupo amino protetor. Figura adaptada de (Sewald e Jakubke, 2009)

Entre os polímeros solúveis desenvolvidos para a aplicação da síntese em fase líquida pode-se destacar o polietilenoglicol (PEG), sendo um dos polímeros solúveis mais estudados para a síntese orgânica em fase líquida, e o poliestireno (PS). A ampla aplicabilidade do PEG é justificada pela sua elevada solubilidade em diversos solventes orgânicos como em dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM), tolueno, acetonitrila, água e metanol, porém insolúvel em éter dietílico, álcool isopropílico e etanol gelado (Wentworth Jr e Janda, 1999).

O emprego do PEG como suporte polimérico na SPFL solucionou os problemas referentes à utilização do polímero de poliestireno. A Introdução do PEG permitiu que o excesso de reagentes de acoplamento de baixo peso molecular fosse removido por um processo de ultrafiltração não necessitando recorrer a processos complexos e trabalhosos de precipitação decorrentes do emprego do poliestireno como suporte para o crescimento da cadeia peptídica. Novos avanços foram alcançados quando Bayer e Mutter desenvolveram uma metodologia que consiste na cristalização do suporte polimérico (Mutter e Bayer, 1974). Neste estudo foi observado que a adição de um solvente orgânico adequado, tal como éter dietílico, ao meio reacional provoca a cristalização espontânea e quantitativa do peptidil-PEG. Por outro lado, não foi observado a co-precipitação dos reagentes e das matérias-primas de baixo peso molecular, possibilitando assim, a fácil separação por filtração. Entretanto, à medida que a cadeia peptídica aumenta na matriz polimérica a solubilidade do peptidil-PEG sofre alteração gerando soluções viscosas que dificultam no processo de filtração. Por isso, a síntese de peptídeos em fase líquida se limita a produção de polipeptídeos com menos de 30 resíduos de aminoácidos (Sewald e Jakubke, 2009).

Além desta, outras desvantagens estão associadas à síntese em fase líquida, como a utilização limitada de solventes, pois deve-se utilizar aqueles nos quais o suporte polimérico é solúvel, o tempo excessivo para a sua execução e as dificuldades encontradas para sua automação (Amaral, Neves *et al.*, 2003; Sewald e Jakubke, 2009).

Neste contexto inúmeros grupos de pesquisa estão surgindo com o intuito de desenvolver novos suportes poliméricos com propriedades que atendam

as condições exigidas pela fase líquida, objetivando não somente a síntese de peptídeos, mas também a produção de outras classes de substâncias (Wentworth Jr e Janda, 1999; Toy e Janda, 2000).

Outro método de síntese química é a síntese em fase sólida, que emprega suportes sólidos insolúveis para a construção da cadeia peptídica e estratégias de grupos protetores. Neste trabalho foi empregado este método e o seu princípio está descrito em detalhes no próximo item.

2.4 Síntese de peptídeo em fase sólida

O conceito de síntese de peptídeos utilizando suportes sólidos, também conhecido como síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), foi introduzido por Robert Bruce Merrifield (Merrifield, 1963), e proporcionou não somente uma evolução na síntese de peptídeos como também revolucionou a química orgânica nos últimos 20 anos.

A síntese de peptídeos em fase sólida é realizada através da utilização de suportes sólidos que consistem de pequenos grãos insolúveis e porosos, que fornecem sustentação física as cadeias peptídicas em formação. Esses suportes são formados por polímeros de cadeias lineares que se encontram interligados transversalmente por ligações cruzadas, formando uma esfera de dimensões padronizadas. Ao longo das cadeias poliméricas observa-se a presença de unidades funcionais que podem ser constituídas por um único átomo ou por espécies químicas de estruturas variadas que são responsáveis pela fixação do primeiro resíduo de aminoácido (Figura 15, p.25) (Marquardt e Eifler-Lima, 2001).

Particularmente os suportes sólidos constituem de partículas quimicamente inertes a todos os reagentes e solventes empregados no processo de síntese, e não interagem com as cadeias peptídicas em formação. Além disso, permitem a modificação química, para gerar ligações eficientes com o primeiro resíduo de aminoácido e são suficientemente porosas, o que facilita a difusão de solventes e reagentes no interior dos grãos deixando os "sítios ativos" mais acessíveis (Faria, 2003).

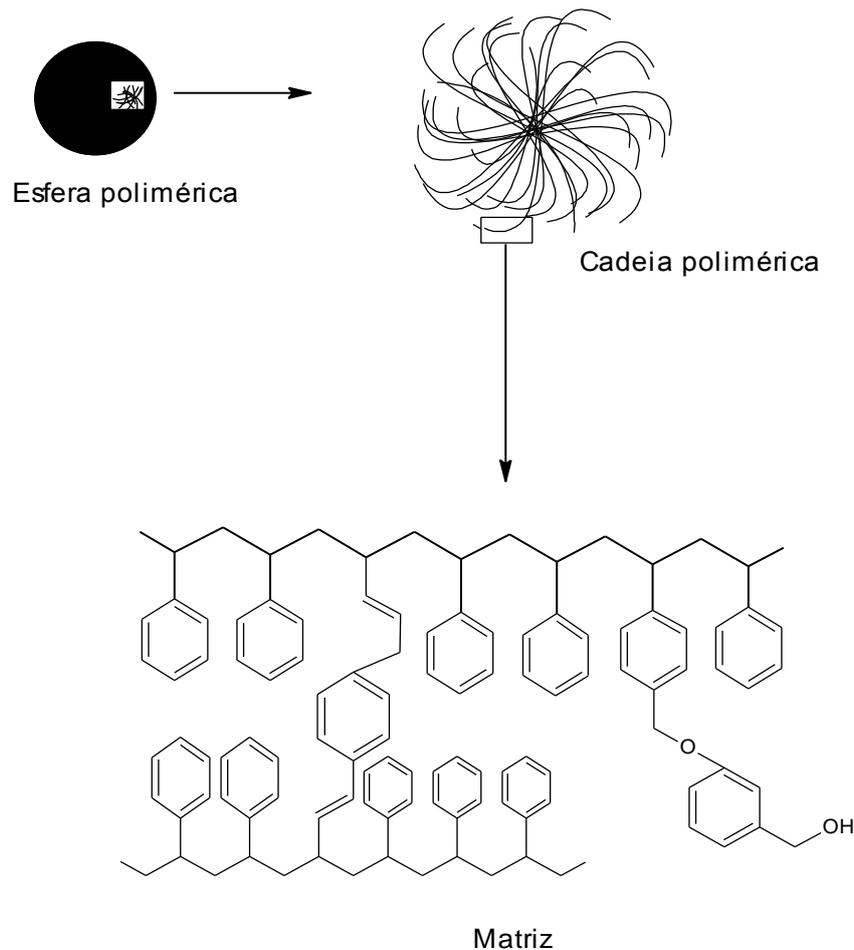


Figura 15 - Visualização progressiva de uma resina mostrando as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas e a sua matriz com seus grupos funcionais que atuam como agentes ancorantes. Figura adaptada de (Marquardt e Eifler-Lima, 2001)

A síntese de uma cadeia peptídica empregando suportes sólidos insolúveis apresenta algumas vantagens: separação do substrato (peptidilresina) dos reagentes solúveis, remoção de solventes por simples filtração, capacidade de suportar condições reacionais mais agressivas do que as utilizadas em síntese em solução, facilidade de automatização, a possibilidade da utilização de excesso de reagentes e, finalmente, a redução na perda física do peptídeo, já que o mesmo se encontra preso ao suporte sólido. Entretanto, essa metodologia apresenta limitações decorrentes da formação de subprodutos de reações incompletas ou reações secundárias, que dificultam a separação devido à sua natureza química ser bastante semelhante ao do peptídeo formado (Chan e White, 2000).

O princípio de funcionamento da síntese de peptídeo em fase sólida está ilustrado na figura 16, p.27. A síntese inicia-se quando o primeiro resíduo de aminoácido da seqüência peptídica desejada é fixado ao suporte sólido. Essa fixação ocorre através da formação de uma ligação covalente entre o "sítio ativo" da resina polimérica com o grupo carboxila do aminoácido, sendo essa ligação resistente as condições reacionais empregadas para a síntese do peptídeo. Entretanto para que essa ligação seja formada o aminoácido deve ser previamente ativado no seu grupo carboxi formando compostos reativos como ésteres ativados.

Para evitar possíveis reações indesejadas, são realizadas proteções dos grupos amino e das cadeias laterais que possuem grupos reativos. 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. Estes permanecem protegendo as cadeias laterais ao longo da síntese e são denominados de grupos protetores permanentes. Por outro lado, as espécies químicas que atuam como protetores dos grupos amino são seletivamente removidos durante a síntese sendo denominados de grupos protetores temporários.

Uma vez que o primeiro resíduo de aminoácido está fixado à resina, a próxima etapa consiste justamente na remoção do grupo amino protetor, deixando-o livre para reagir com um segundo derivado de aminoácido (aminoácido protegido). Este último, por sua vez é pré-ativado para a formação da ligação peptídica. Nesta etapa emprega-se excesso de reagentes que são removidos por filtração a vácuo, seguida de uma lavagem do conjunto resina-peptídeo (peptidilresina) e o grupo protetor que agora protege o grupo amino do dipeptídeo é removido permitindo o acoplamento do terceiro resíduo de aminoácido. Essas etapas de desproteção e acoplamento se repetem até a obtenção do peptídeo desejado. Na etapa final realiza-se a remoção simultânea dos grupos protetores das cadeias laterais e do peptídeo da resina já que os mesmos são removidos nas mesmas condições reacionais.

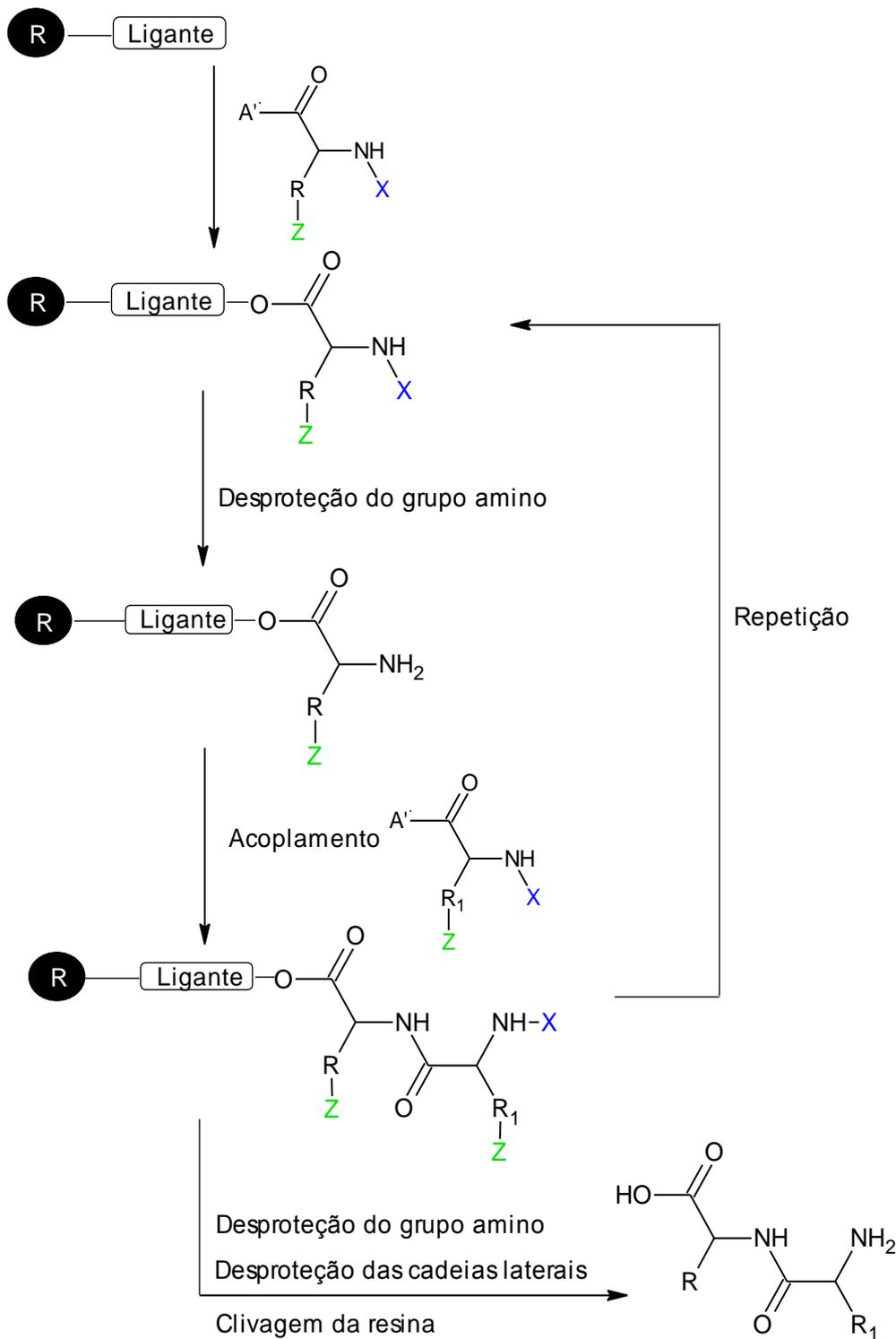


Figura 16 - Esquema geral do princípio da síntese de peptídeo em fase sólida. X representa o grupo protetor do grupo amino; Y representa o grupo protetor da cadeia lateral e A representa a carboxila ativada. Figura adaptada de (Chan e White, 2000)

Atualmente, duas metodologias são amplamente empregadas para a síntese de peptídeos em fase sólida e diferenciam-se na estratégia de grupos protetores as quais estão descritas a seguir.

2.4.1 Estratégia Merrifield

Na metodologia de Merrifield, ilustrada na figura 17, p.29, o resíduo de aminoácido é fixado, pela sua extremidade C-terminal, ao suporte sólido através da formação de um éster benzílico com um copolímero constituído de estireno e divinilbenzeno, tendo como ligante o grupo hidroximetilfenilacetamidometil poliestirenol (resina PAM) (Kent, 1988). Observa-se que o suporte sólido original desta metodologia, clorometil poliestireno, vem sendo gradativamente substituída devido ao fato da sua utilização provocar um aumento na ocorrência de reações secundárias especialmente em processos de sínteses de peptídeos de cadeias mais longas, devido a instabilidade apresentada pela ligação peptidil-éster benzílico em condições ácidas (Barany, Kneib Cordonier *et al.*, 1987).

Nesta estratégia o grupo *tert*-butoxicarbonila (Boc) é utilizado como grupo protetor temporário do grupo amino sendo a sua remoção efetuada em meio ácido, empregando-se normalmente ácido trifluoracético puro (TFA) ou em diclorometano (DCM). Já os derivados do grupo benzila são empregados como grupos de proteção permanentes das cadeias laterais. O grupo amino é neutralizado com diisopropiletilamino (DIPEA) antes da realização da etapa de acoplamento. Originalmente os acoplamentos eram efetivados com a ativação dos resíduos de aminoácidos com dicicloexilcarbodiimida (DCC) em DCM, mas recentemente verifica-se a substituição do DCC por anidridos simétricos pré-formados ou por ésteres benzotriazolil em dimetilformamida (DMF) ou em *N*-metilpirrolidina (NMP). A clivagem do peptídeo do suporte sólido e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais também são realizadas em meio ácido, porém as condições reacionais empregadas são mais agressivas que aquelas utilizadas na remoção do grupo Boc, sendo efetuadas com fluoreto de hidrogênio anidro (HF) (Chan e White, 2000). Entretanto, observa-se a necessidade da adição de "seqüestradores" de carbocátion como anisol, tioanisol ou triisopropilsilano com o intuito de evitar a ocorrência de reações

secundárias devido à formação de íons carbenium intermediários nos processos de desproteção das cadeias laterais (Sewald e Jakubke, 2009).

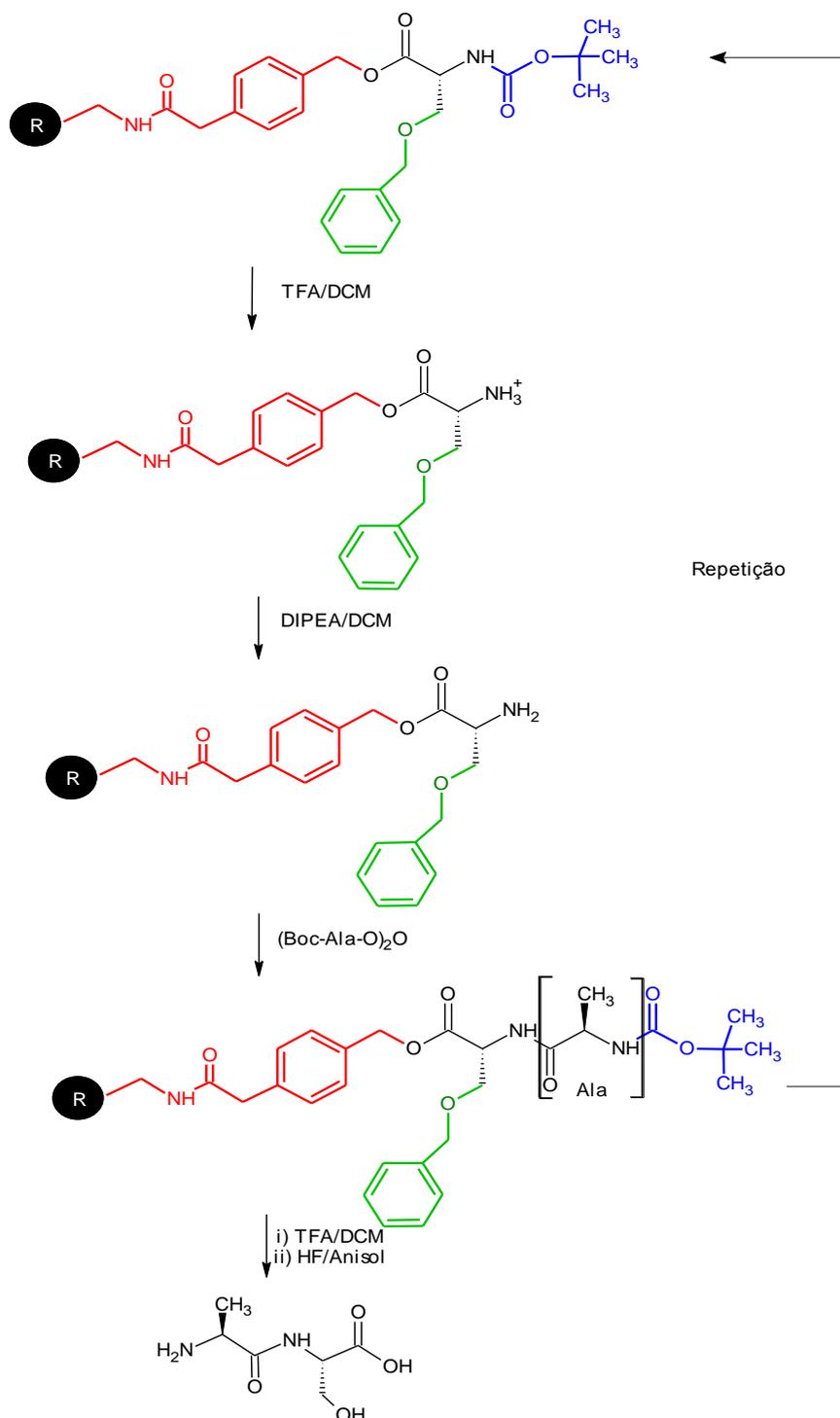


Figura 17 - Síntese de peptídeo em fase sólida - Metodologia Merrifield. Em vermelho está representado o ligante do suporte polimérico, em azul o grupo protetor do grupo amino (Boc) e em verde o grupo protetor das cadeias laterais reativas. Figura adaptada de (Chan e White, 2000)

As principais limitações desta 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 equipamentos especiais para a etapa final da síntese devido ao emprego de HF (Sewald e Jakubke, 2009).

2.4.2 Estratégia Fmoc

Diferentemente da metodologia de Merrifield que promove a variação da acidez para obter a seletividade na remoção dos grupos protetores temporários e permanentes, a metodologia Fmoc baseia-se na estratégia de ortogonalidade na qual as remoções das proteções temporárias e permanentes ocorrem em condições químicas completamente antagônicas. Essa metodologia tornou-se possível pela substituição do grupo de proteção temporário Boc, lábil em meio ácido, pelo grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) que é facilmente removido em condições básicas (Carpino e Han, 1972). Entretanto, assim como na metodologia de Merrifield, a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais e a clivagem do peptídeo do suporte polimérico são realizadas em condições ácidas. Todavia, a utilização de grupos *t*-butila e tritila como grupos de proteção das cadeias laterais e alcóxibenzila como agente fixador do peptídeo ao suporte sólido permitiu que suas remoções fossem realizadas em condições ácidas mais moderadas que aquelas empregadas na estratégia de Merrifield.

O princípio geral da metodologia Fmoc está ilustrado na figura 19, p.32. O aminoácido Fmoc protegido é fixado ao suporte sólido, pela sua extremidade C-terminal, através de um ligante que é lábil em meio ácido. O grupo Fmoc é removido do aminoácido fixado ao suporte polimérico pelo tratamento com piperidina em DMF. O segundo resíduo de aminoácido Fmoc protegido é acoplado ou como uma espécie pré-ativada ou sem a pré-ativação onde vários ativadores são utilizados, sendo esse acoplamento realizado em DMF ou NMP. Com a obtenção da seqüência peptídica desejada o peptídeo é clivado da resina e as proteções das cadeias laterais

removidas com tratamento de TFA 95% dando fim à síntese (Fields e Noble, 1990; Chan e White, 2000).

Outra vantagem associada à metodologia Fmoc é a possibilidade do monitoramento do progresso da reação por espectroscopia UV devido à formação de dibenzofulveno ou fulveno-piperidina, que é rapidamente consumido pela piperidina sendo formado o dibenzofulveno (produto 1) que absorve energia na região do ultravioleta (Figura 18). Esse monitoramento é extremamente importante principalmente para os processos sintéticos em que a remoção do grupo protetor Fmoc é lenta ou incompleta. Todavia as desvantagens associadas a esta metodologia envolvem a formação de estruturas secundárias, trazendo problemas de agregação, e os tratamentos repetitivos com piperidina para as remoções do grupo Fmoc promovem reações colaterais como a formação de dicetopiperazina, principalmente em dipeptídeos contendo prolina (Fields, 1994; Sewald e Jakubke, 2009).

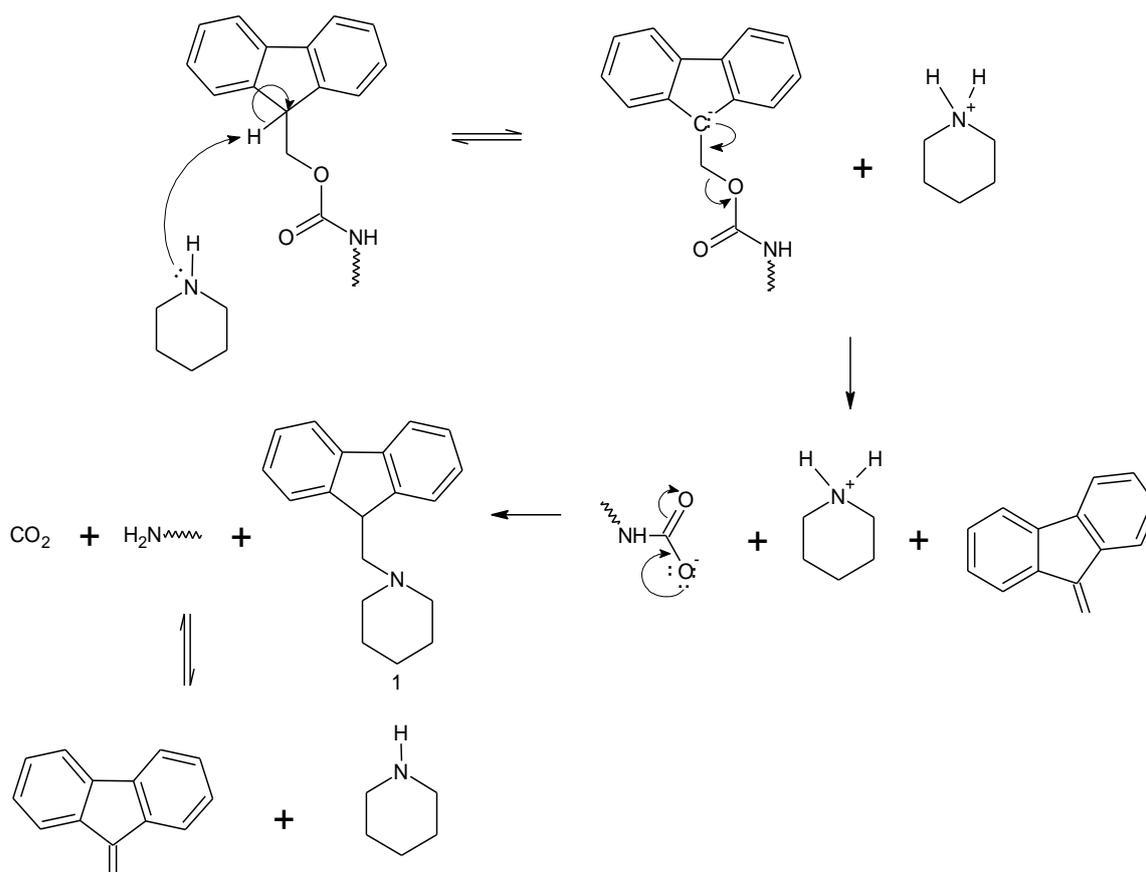


Figura 18 - Mecanismo de remoção do grupo Fmoc. Figura adaptada de (Chan e White, 2000)

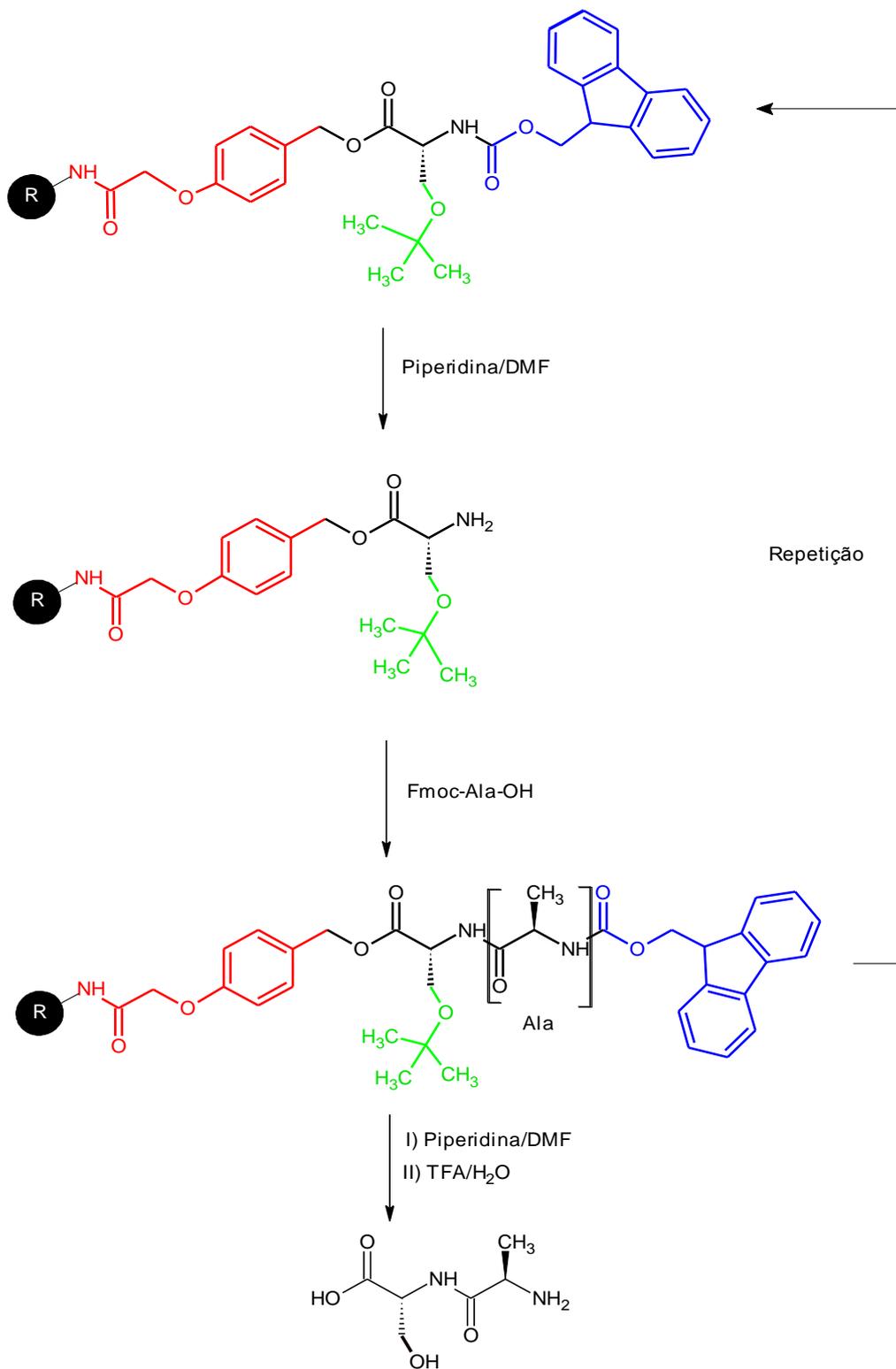


Figura 19 - Esquema do princípio da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc. Em azul está representado o grupo protetor do grupo amino 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc). Figura adaptada de (Chan e White, 2000)

2.4.3 Estratégia com três ortogonalidades e mais dimensões

Um sistema ortogonal é definido como um processo de remoção de grupos de proteção empregando mecanismos químicos completamente diferentes. Esse sistema pode ser desenvolvido para dois, três ou mais graus de ortogonalidade onde os grupos de proteção podem ser seletivamente removidos por ácidos, bases, tióis, íon fluoreto, cianeto ou outros nucleófilos, silanos, fotólise, hidrogenólise, redução, oxidação e catálise por Pd(0) (Gutte, 1995).

Um exemplo de um sistema de ortogonalidade com duas dimensões foi descrito no item 2.4.2 que retrata o princípio de funcionamento da estratégia Fmoc/tbu. Entretanto, observa-se o desenvolvimento crescente de estratégias baseados em três ou mais dimensões de ortogonalidade para serem empregados na síntese de peptídeos em fase sólida. Uma estratégia com três dimensões de ortogonalidade desenvolvida para a síntese de peptídeos em fase sólida está representada na figura 20, p.34. Essa estratégia consiste na combinação do grupo *N*-ditiassuccinila (Dts) (vermelho), que é removido por tióis e estável em condições ácidas e a presença de luz, com o grupo *t*-butila (azul), responsável pela proteção das cadeias laterais, que são removidos em condições ácidas, mas estável a tióis e a luz, e com um grupo ligante, 2-nitrobenzila (verde), responsável por fixar o peptídeo à resina sendo a clivagem realizada fotolicamente em 350 nm, porém resistente a condições ácidas ou a presença de tióis. Esse tipo de estratégia permite total seletividade nas reações de desproteção ou clivagem possibilitando a obtenção de peptídeos parcialmente ou totalmente protegidos (Gutte, 1995; Sewald e Jakubke, 2009).

Outro exemplo de uma estratégia com três ortogonalidades consiste na combinação do grupo Fmoc, protetor do grupo amino, com o grupo *t*-butila, protetor das cadeias laterais, e com um éster alílico que é o ligante responsável por fixar o peptídeo a resina sendo estes grupos removidos sob condições básicas, ácidas e por catálise com Pd(0) respectivamente. Contudo, observa-se que essa estratégia nada mais é que uma modificação da tradicional estratégia ortogonal Fmoc, sendo obtida pela substituição do agente fixador original alcoxibenzila pelo grupo alílico. A introdução do

grupo alílico permitiu que reações secundárias, como alquilação, fossem evitadas já que os grupos alílicos originam carbocátions menos reativos (Gutte, 1995).

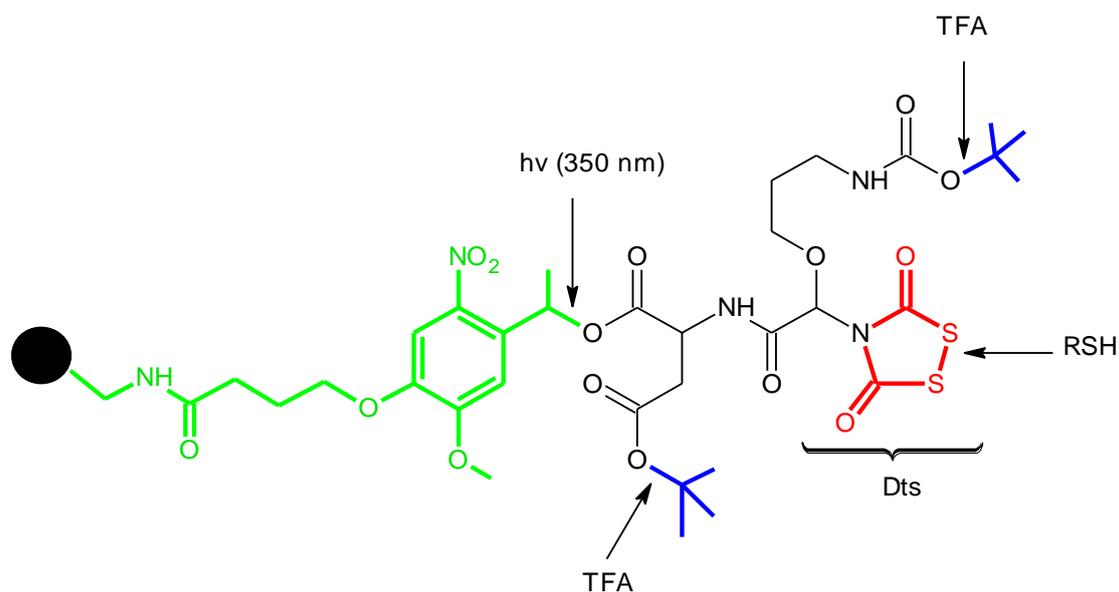


Figura 20 - Exemplo de estratégia com três ortogonalidades para a síntese de peptídeos em fase sólida. Figura adaptada de (Sewald e Jakubke, 2009)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do peptídeo DD K

O peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K, de seqüência GLWSK IKAAGKEAAKAAKAAGKAALNAVSEAV-NH₂, foi sintetizado manualmente empregando a metodologia da síntese em fase sólida através da estratégia Fmoc (Chan e White 2000). Como suporte sólido foi empregado a resina Rink amida (Figura 21, p.35), fornecida pela Iris Biotech (Marktredwitz, Alemanha) com grau de substituição 0,63 g mmol⁻¹ e que fornece como produto final o peptídeo amidado.

Todos os derivados de aminoácidos utilizados foram obtidos da Iris Biotech (Marktredwitz, Alemanha), os quais são devidamente protegidos no seu grupamento *N*-terminal e nas suas cadeias laterais quando reativas (Quadro 2, p.36).

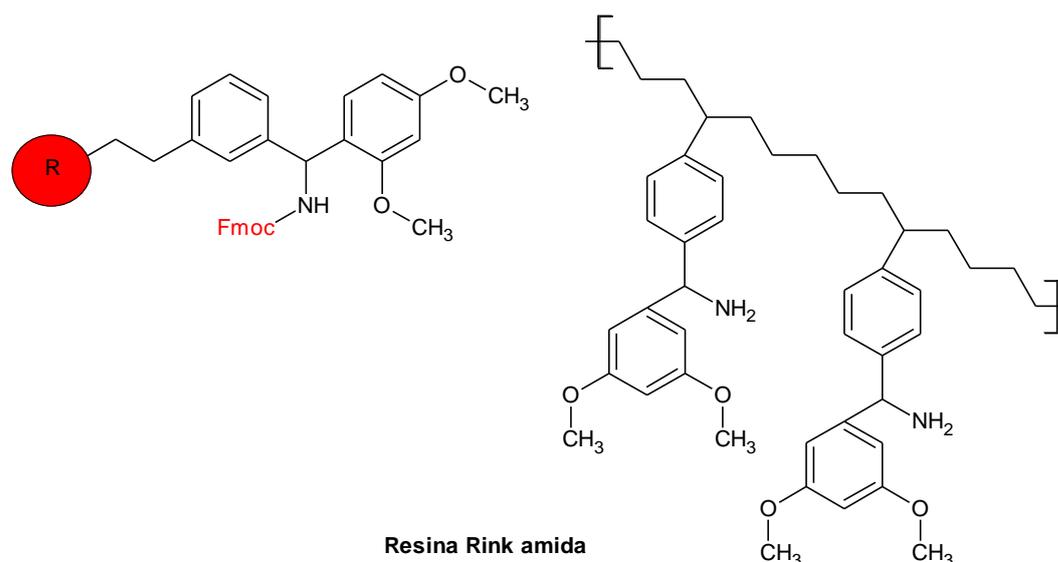


Figura 21 - Suporte sólido empregado na síntese do peptídeo DD K

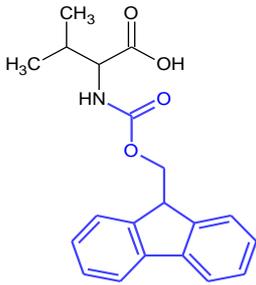
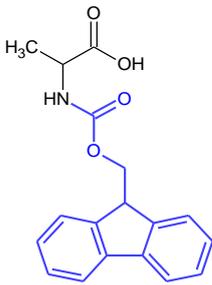
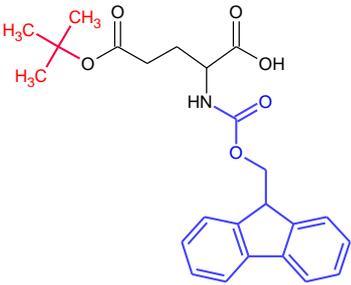
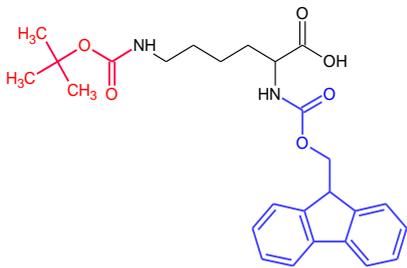
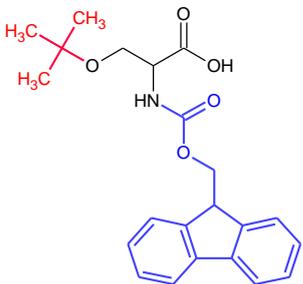
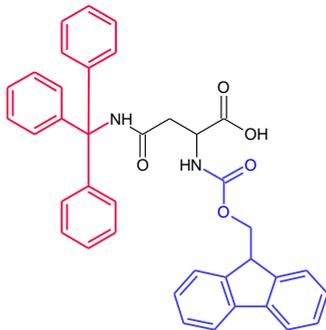
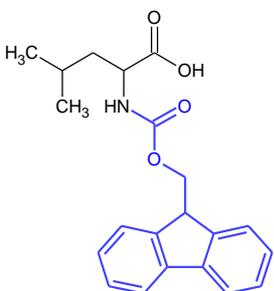
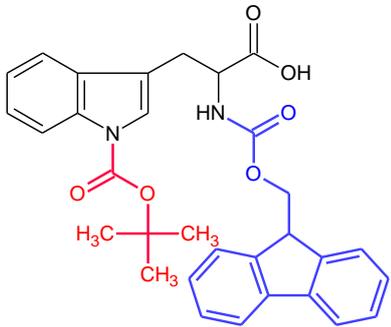
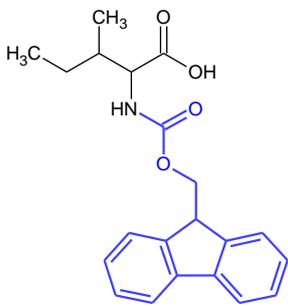
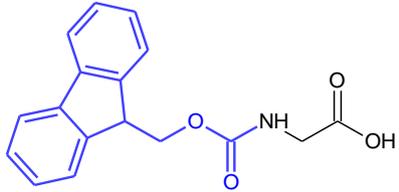
A remoção dos grupos protetores Fmoc, necessário para a realização da etapa de acoplamento, foi realizada empregando soluções de Piperidina (20% em DMF).

Para as etapas de acoplamento foram preparadas soluções de derivados de aminoácidos em *N,N*-dimetilformamida (DMF) destilada e diclorometano (DCM) contendo *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e a 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Figura 22, p.37) como ativadores de grupos carboxilas.

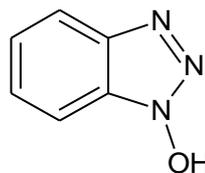
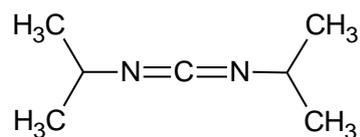
As lavagens da resina após cada etapa de desproteção e acoplamento foram realizadas com DMF e álcool isopropílico (IPA), finalizando a limpeza com DCM.

A síntese foi monitorada realizando-se um teste qualitativo rápido e sensível para a detecção de grupos aminos livres. Esse teste, conhecido como teste de Ninhidrina ou teste de Kaiser, consiste na reação do grupo amino livre com ninhidrina (Figura 23, p.37) sob condições cuidadosamente controladas permitindo a confirmação da ocorrência das etapas de desproteção e acoplamento. Para este teste foram utilizadas soluções de piridina a 2% (v/v) em solução aquosa de KCN a 1mmol.L^{-1} , fenol a 80% (m/v) em etanol e ninhidrina a 5% (m/v) em piridina, seguindo as proporções 1:2:1, respectivamente (Verly, 2010).

Quadro 2: Derivados de aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo DD K

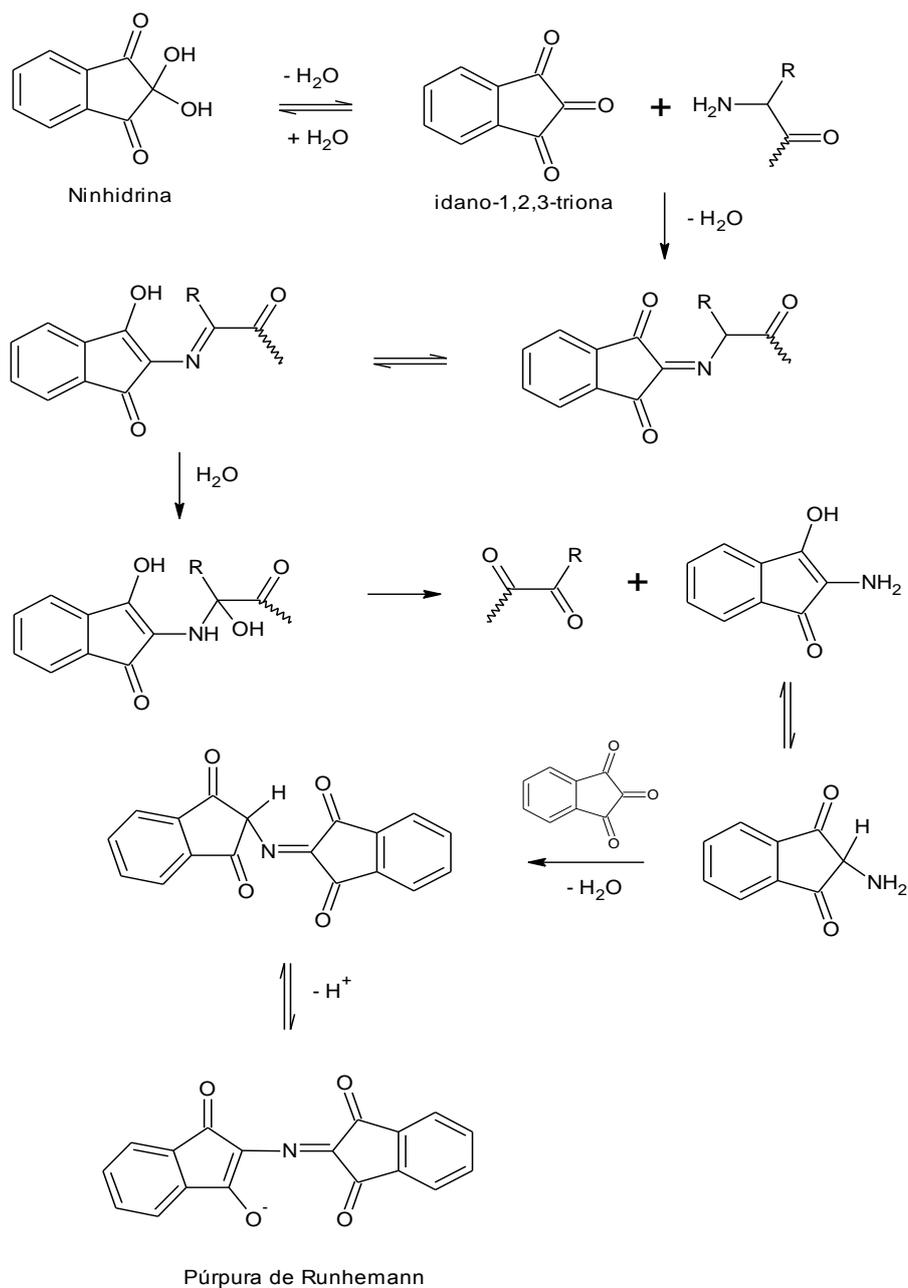
<p>Fmoc-L-Val-OH</p> 	<p>Fmoc-L-Ala-OH</p> 	<p>Fmoc-L-Glu(TBu)-OH</p> 
<p>Fmoc-L-Lys(Boc)-OH</p> 		<p>Fmoc-L-Ser(TBu)-OH</p> 
<p>Fmoc-L-Asn(Trt)-OH</p> 	<p>Fmoc-L-Leu-OH</p> 	<p>Fmoc-L-Trp(Boc)-OH</p> 
<p>Fmoc-L-Ile-OH</p> 	<p>Fmoc-L-Gly-OH</p> 	

*Grupo Fmoc destacado em azul e grupos protetores de cadeias laterais destacados em vermelho



N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) 1-hidroxibenzotriazol (HOBt)

Figura 22 - Ativadores empregados na síntese do peptídeo DD K



Púrpura de Runhemann
Composto de coloração azul - violeta

Figura 23 - Reação de ninhidrina para detecção do grupo amino livre.

3.1.1 Preparação da resina

Antes de iniciar a síntese da cadeia peptídica deve-se preparar a resina para a fixação do primeiro resíduo de aminoácido da seqüência peptídica. Para isso pesou-se 100,6 mg de resina, quantidade suficiente para obtenção de 200,0 mg do peptídeo DD K, transferindo-a para a seringa de reação (Figura 24). Em seguida adicionou-se aproximadamente 3,0 mL de DCM (quantidade suficiente para cobrir toda a resina), deixando sob agitação, em mesa agitadora, por 10 minutos. Após esse tempo removeu-se o DCM por filtração sob pressão e repetiu-se o processo por mais duas vezes.

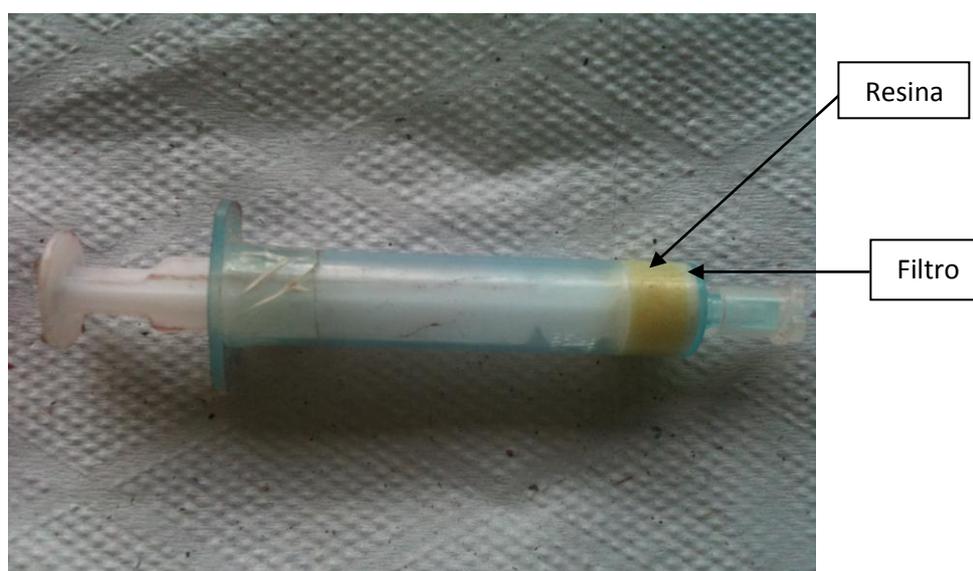


Figura 24 - Seringa de reação utilizada na síntese do peptídeo DD K

O próximo passo consiste na remoção dos grupos protetores Fmoc presentes nos grupos substituintes da resina. Para essa remoção colocou-se uma quantidade suficiente de 4-metil-piperidina para cobrir toda a resina presente na seringa de reação deixando o sistema sob agitação, em mesa agitadora, por 12 minutos. Em seguida removeu-se a 4-metil-piperidina por filtração e adicionou-se mais desse reagente deixando o sistema novamente sob agitação por 12 minutos. Após a nova filtração lavou-se a resina com DMF e IPA por três vezes alternadamente encerrando-se a lavagem com DCM. Após essa etapa, retirou-se uma amostra da resina transferindo-a para um tubo de ensaio para realização do teste de ninhidrina. Para isto, adicionou-se uma gota da solução de KCN com piridina, duas gotas da solução de fenol em etanol e uma gota da solução

de ninhidrina. Aqueceu-se o tubo até aproximadamente 100°C por 4 minutos. O resultado positivo é revelado pela presença de grãos da resina escurecidos e indicam a presença de grupos aminos livres.

3.1.2 Etapa de acoplamento

A etapa de acoplamento consiste na formação de ligações peptídicas entre dois derivados de aminoácidos. O primeiro acoplamento é a fixação do primeiro resíduo de aminoácidos à resina desprotegida. Os demais acoplamentos consistem na adição de resíduos de aminoácidos à peptidilresina de acordo com a sequência peptídica.

Para cada etapa de acoplamento, preparou-se uma solução do derivado de aminoácido desejado, pré-ativados com HOBt e DIC. Em seguida, adicionou-se esta solução na seringa de reação (contendo resina ou peptidilresina desprotegida) deixando-a sob agitação, em mesa agitadora, por períodos de duas a três horas. Após a agitação, lavou-se a resina com DMF, IPA e DCM conforme descrito no item 3.1.1. Após cada etapa de acoplamento foi realizado o teste de ninhidrina. O resultado negativo é confirmado pela não alteração da coloração dos grãos e indicam que não há grupos aminos livres.

3.1.3 Etapa de desproteção

A etapa de desproteção consiste na remoção do grupo protetor Fmoc do resíduo de aminoácido acoplado a resina.

O procedimento para a desproteção do grupamento *N*-terminal dos resíduos de aminoácidos é o mesmo utilizado para a desproteção dos grupos substituintes da resina e encontra-se descrito no item 3.1.1

Após a desproteção do grupo *N*-terminal realiza-se o acoplamento de um novo resíduo de aminoácido da sequência peptídica. Com isso as etapas de acoplamento e desproteção são repetidas até obtenção da sequência peptídica desejada.

3.1.4 Etapa de clivagem do peptídeo da resina

A reação de clivagem é a etapa final da síntese onde se realiza a remoção simultânea do peptídeo da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais através da utilização do ácido trifluoracético (TFA). Entretanto, as

condições reacionais empregadas para a reação de clivagem dependem exclusivamente da resina e da seqüência peptídica desejada. Para o caso do peptídeo antimicrobiano DD K, sintetizado neste trabalho, a solução de clivagem estabelecida de acordo com a sua seqüência e obtida na literatura foi: 95% de TFA, 2,5% de água e 2,5% de tri-isopropilsilano (TIS).

Preparou-se um volume total de 1,74 mL da solução de clivagem (10 mL de solução para 1g de resina) contendo 1,65 mL de TFA (10 mL/g de resina), 0,04 mL de água e 0,04 mL de TIS, sendo essa preparação realizada na seringa de reação. Deixou-se o sistema sob agitação, em mesa agitadora, durante 3 horas, sendo esse tempo determinado pelo tipo de resina e da seqüência de aminoácidos que compõem o peptídeo, pois grupos protetores diferentes das cadeias laterais necessitam de tempos diferentes para serem completamente removidos. Ao final deste período filtrou-se, sob pressão, a solução contendo o peptídeo para a remoção da resina seguida de uma lavagem com TFA para garantir a total remoção do peptídeo da seringa. Em seguida, realizou-se a evaporação do TFA presente no filtrado utilizando nitrogênio gasoso para concentrar o peptídeo. Em seguida, foi adicionado 5,0 ml de éter isopropílico gelado para garantir as condições necessárias de precipitação completa do peptídeo. Após a precipitação removeu-se o éter isopropílico após centrifugação, sendo esse processo repetido três vezes. Por fim solubilizou-se o peptídeo em água deionizada e procedeu-se sua liofilização.

3.1.5 Análise cromatográfica e purificação

A análise da pureza e a purificação do peptídeo sintetizado foi realizada empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Varian modelo Pro Star 210 com detector na região do ultravioleta modelo Pro Star 330, do Departamento de Química do ICEx da UFMG. Para análise do produto da síntese foi empregada coluna analítica Vydac C18 (250 x 4,6 mm), e para purificação coluna semi-preparativa Vydac C18 (250 x 10 mm, 5 µm)

A água deionizada foi obtida em aparelho da marca Millipore modelo QPAK[®], do Departamento de Química do ICEx da UFMG.

Os gradientes foram realizados utilizando-se água deionizada acidulada com ácido trifluoroacético (0,1% TFA, fase A) e acetonitrila grau UV-HPLC em TFA (ACN/0,08% TFA, fase B). A detecção foi realizada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 214 nm.

3.1.6 Caracterização por Espectrometria de Massas

A amostra bruta do peptídeo sintetizado e as obtidas das análises por CLAE foram analisadas por *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) em espectrômetros de massas MALDI-ToF/ToF-MS (Applied Biosystems, USA) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, operando em modo positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do peptídeo DD K

Como mencionado no item 3.1 à síntese do peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K foi realizada manualmente empregando a síntese em fase sólida através da estratégia Fmoc, sendo a resina Rink amida utilizada como suporte sólido. Nesta síntese HOBt e DIC foram utilizados como reagentes de acoplamento responsáveis pela ativação dos grupos carboxilas dos resíduos de aminoácidos permitindo a ocorrência das reações de formação das ligações peptídicas. Para o monitoramento do processo sintético foi empregado o teste de *Kaiser* ou teste de Ninhidrina que é um teste qualitativo que consiste na detecção de grupos aminos livres permitindo identificação de reações incompletas. Este teste foi realizado ao longo de toda a síntese sempre após as etapas de acoplamento e desproteção do grupo amino, sendo o mesmo identificado por uma coloração azul da resina. O resultado positivo após as etapas de acoplamento caracteriza que reações de formação da ligação peptídica não ocorram completamente sendo necessário a realização da mesma reação de acoplamento (reacoplamento) até que o teste confirme que a reação foi completa. Todo o acompanhamento da síntese do peptídeo DD K está mostrado na tabela 2, p.42.

Tabela2: Acompanhamento da síntese do peptídeo DDK

Ordem de acoplamento	Resíduos de aminoácidos	Excesso	Tempo gasto na reação (h)
1 ^a	Fmoc-L-Val-OH	4	3
2 ^a	Fmoc-L-Ala-OH	4	2
3 ^a	Fmoc-Glu(tbut)-OH	4	2
4 ^a	Fmoc-Ser(tbu)-OH	4	2
5 ^a	Fmoc-Val-OH	4	2
6 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
7 ^a	Fmoc-Asn(trt)-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Asn(trt)-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Asn(trt)-OH	4	3
8 ^a	Fmoc-Leu-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Leu-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Leu-OH	4	3
9 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
10 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
11 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2
12 ^a	Fmoc-Gly-OH	4	2
13 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
14 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
15 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2
16 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	1,5
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	4	2
17 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
18 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2,4
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	4	2
19 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2
20 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
21 ^a	Fmoc-Ala-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	4	2
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	5	2,5
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	5	2,2
22 ^a	Fmoc-Glu(tbut)-OH	5	2
reacoplamento	Fmoc-Glu(tbut)-OH	5	3,2
reacoplamento	Fmoc-Glu(tbut)-OH	6	2,5
23 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	2,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	2,42
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3
24 ^a	Fmoc-Gly-OH	6	2,5
25 ^a	Fmoc-Ala-OH	6	2,5
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Ala-OH	6	4
26 ^a	Fmoc-Ala-OH	6	3,2
27 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	2,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	4
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	4,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
28 ^a	Fmoc-Ile-OH	6	2
reacoplamento	Fmoc-Ile-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Ile-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Ile-OH	6	3
29 ^a	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6	3,5
30 ^a	Fmoc-Ser(tbu)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Ser(tbu)-OH	6	3
31 ^a	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	4
reacoplamento	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	3
reacoplamento	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	3
32 ^a	Fmoc-Leu-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Leu-OH	6	4
reacoplamento	Fmoc-Leu-OH	6	4
33 ^a	Fmoc-Gly-OH	6	3,5
reacoplamento	Fmoc-Gly-OH	6	4
reacoplamento	Fmoc-Gly-OH	6	4,5

Nesta tabela é possível observar que o desenvolvimento da síntese ocorreu de maneira eficiente até o 6^a acoplamento, sendo necessário realizar dois reacoplamentos para o resíduo de asparagina (7^a acoplamento) e mais dois reacoplamentos para o resíduo de leucina (8^a acoplamento). Entretanto, verifica-se que do 9^a ao 14^a acoplamento o processo sintético voltou a não apresentar problemas, mas a partir do 15^a acoplamento (lisina) em diante vários processos de reacoplamentos foram realizados, sendo necessário alterar o excesso de reagentes e o tempo de reação na tentativa de garantir a completa reação de formação da ligação peptídica. Dois fatores podem ser fundamentais para esclarecer os diversos problemas enfrentados durante a síntese.

O primeiro fator corresponde à maior proporção de ligações cruzadas da resina empregada o que resulta em uma menor porosidade da mesma. Conseqüentemente, a solvatação no interior da resina é dificultada e a reação torna-se incompleta nesta região. Já o segundo fator está relacionado com o elevado grau de substituição da resina (0,63 g mmol⁻¹). Resinas com essas características permitem a obtenção de maior quantidade de peptídeo por apresentarem um elevado número de ligantes em seus grãos. Entretanto, esses ligantes encontram-se muito próximos na cadeia polimérica e favorecem aglomerações das cadeias peptídicas que estão sendo formadas, especialmente para peptídeos de cadeias longas como DD K (33 resíduos de aminoácidos). Essas aglomerações juntamente com a menor porosidade da resina acabam dificultando a difusão de reagentes no interior da matriz polimérica gerando limitações para os processos reacionais. Uma solução viável para a redução desses problemas seria a substituição da resina por uma que apresente um grau de substituição menor como, por exemplo, a resina tenta Gel SRAM com grau de substituição de 0,27 g mmol⁻¹.

Essas dificuldades mencionadas anteriormente são evidentes no 27^a acoplamento, onde foram realizadas 8 reacoplamentos de lisina. Devido ao elevado número de reacoplamentos foi planejado uma clivagem do fragmento de DD K a partir de uma pequena quantidade de resina empregando as mesmas condições e os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.4. Este procedimento foi realizado para verificar a eficiência

deste acoplamento. O fragmento foi clivado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 25) e por espectrometria de massas (Figura 26, p. 45). A partir do cromatograma obtido observa-se a presença de um pico intenso com tempo de retenção (t_r) de 24,8 min e um outro pico menos intenso com t_r de 25,5 min. O espectro de massas da amostra da síntese mostrou a presença de íons com a relação massa/carga de 2466,67 e 2388,54 correspondendo ao fragmento de DD K contendo 27 resíduos de aminoácidos (KAAGKEAAKAAAKAAGKAALNAVSEAV-NH₂) e ao fragmento de DD K contendo 26 resíduos, sem a presença da lisina (AAGKEAAKAAA KAAGKAALNAVSEAV-NH₂).

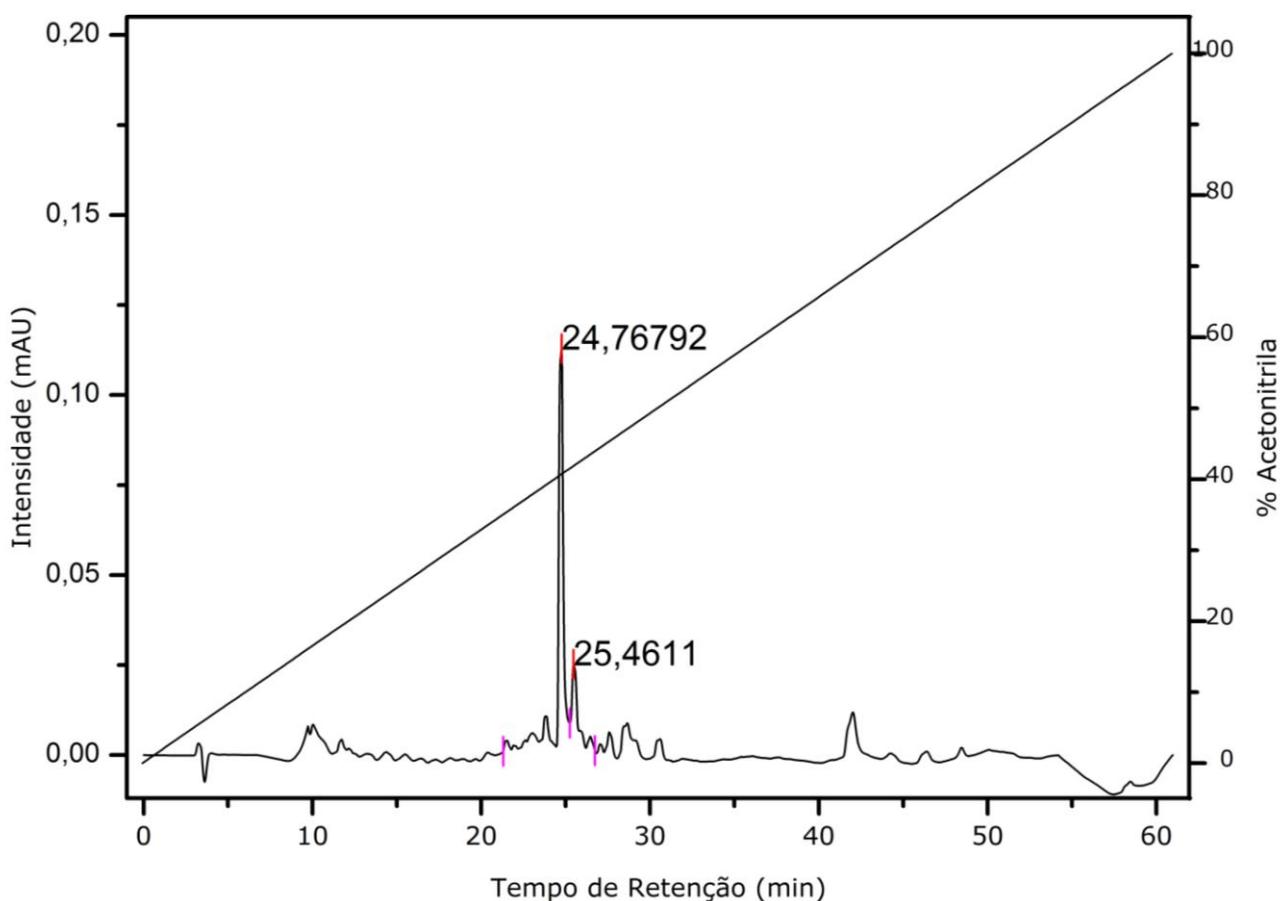


Figura 25 - Perfil de CLAE do fragmento de DDK. A linha reta representa o gradiente da análise cromatográfica.

As análises por espectrometria de massas dos picos de t_r 24,8 min e t_r 25,5 min, separadamente, confirmaram que o pico mais intenso (t_r 24,8 min) corresponde ao fragmento de DD K com o resíduo de lisina acoplado e protegido com o grupo Fmoc (m/z de 2466,67). A partir desses resultados,

planejou-se apenas mais uma etapa de reacoplamento para este resíduo de Lys, pois a integração do pico de t_r 24,8 min do cromatograma do fragmento de DD K (Figura 25, p.44) mostrou que aproximadamente 92% da resina já havia reagido.

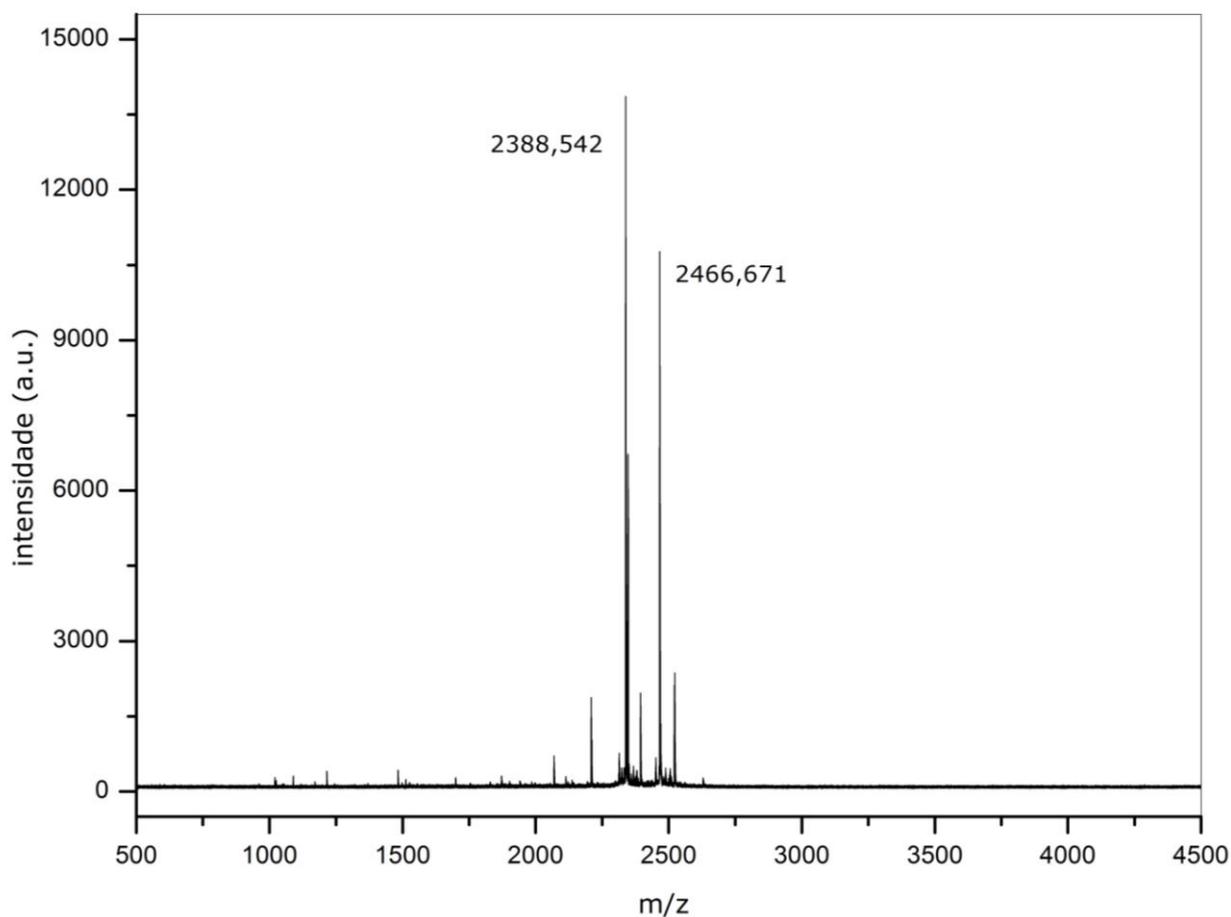


Figura 26 - Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra clivada da síntese após 27^o acoplamento.

4.2 Purificação e Caracterização

Após a etapa de clivagem o peptídeo bruto obtido foi submetido às análises por espectrometria de massas e por cromatografia líquida. O cromatograma obtido após a análise do peptídeo bruto está ilustrado na figura 27, p.46. Analisando esse cromatograma observa-se um pico intenso com tempo de retenção de 23,9 min que supostamente correspondia ao peptídeo DD K. A análise da mesma amostra de peptídeo bruto por espectrometria de massas pode ser observada na figura 28, p.47. Observando o espectro de massas verifica-se a presença de um pico intenso de relação massa/carga de 3150,78 correspondendo ao peptídeo DD K e outro pico de relação

massa/carga de 3022,65 que corresponde a um análogo de DD K com ausência de um resíduo de Lys em sua seqüência peptídica, podendo estar associado ao resíduo de Lys-6 (27º acoplamento). Os demais picos correspondem a subprodutos obtidos durante a síntese, peptídeos menores ou ainda não completamente desprotegidos.

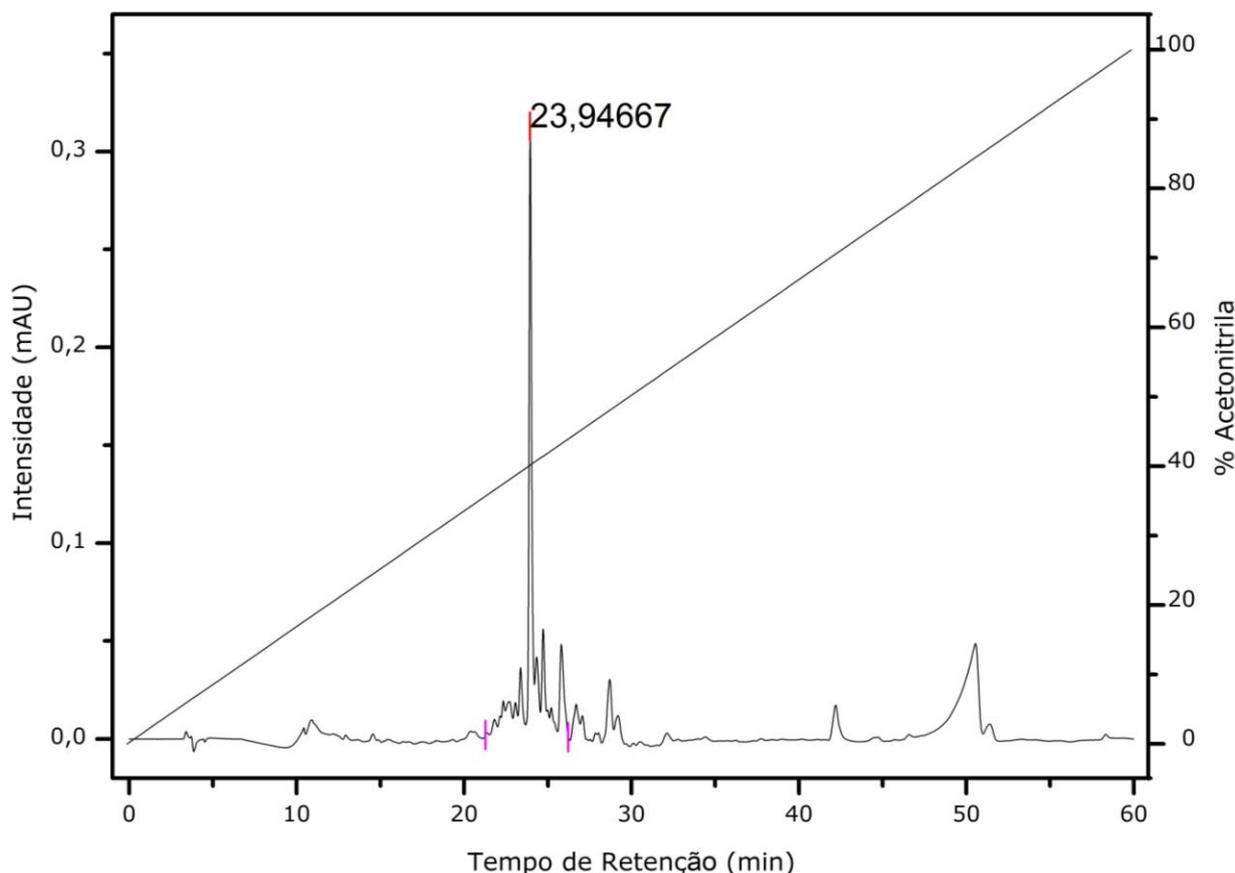


Figura 27 - Perfil de CLAE da amostra de DDK bruto. A linha reta representa a variação da concentração acetonitrila durante a análise cromatográfica.

Finalmente, a amostra bruta foi submetida à purificação por CLAE, coletando-se apenas a fração com t_r próxima a 23,9 min, e o espectro de massa do peptídeo purificado pode ser observado na figura 29, p.47. Neste espectro é possível verificar a presença de um íon de relação m/z correspondente ao peptídeo DD K protonado (3150,95) e outro íon de relação m/z 1774,12. Este resultado revela que a amostra ainda apresenta a contaminação de um subproduto da síntese, sendo necessária ainda uma segunda etapa de purificação para a obtenção de um grau de pureza

adequado para a aplicação do peptídeo em estudos futuros como protótipo de fármacos em novas formulações.

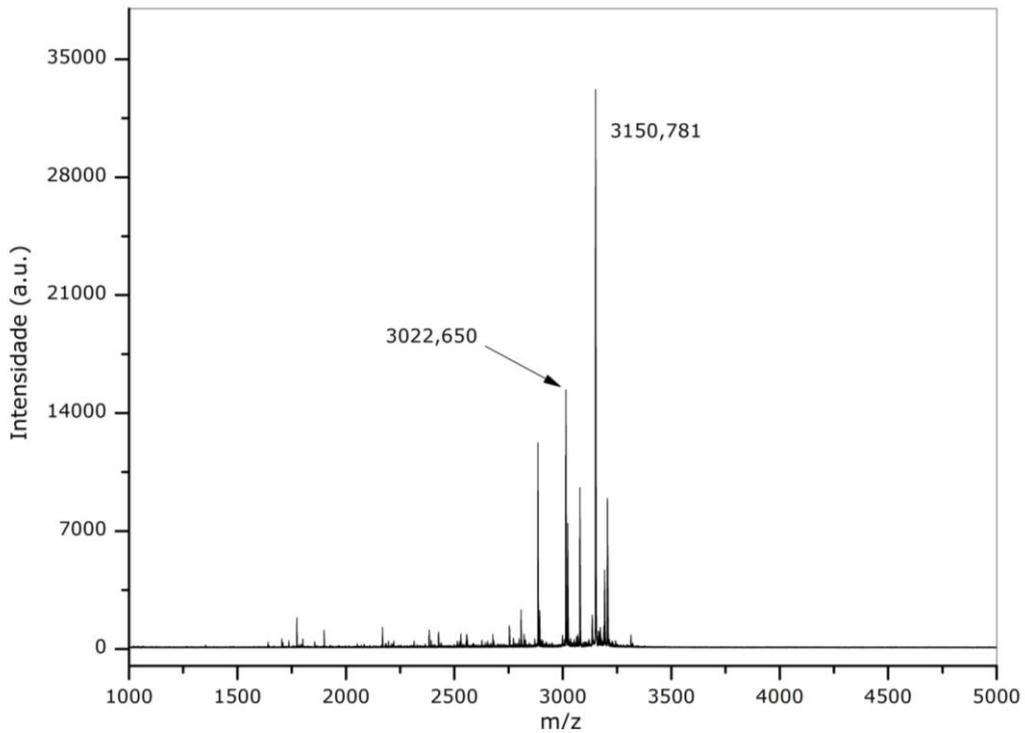


Figura 28 - Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra de DD K bruta obtida da clivagem após o último acoplamento.

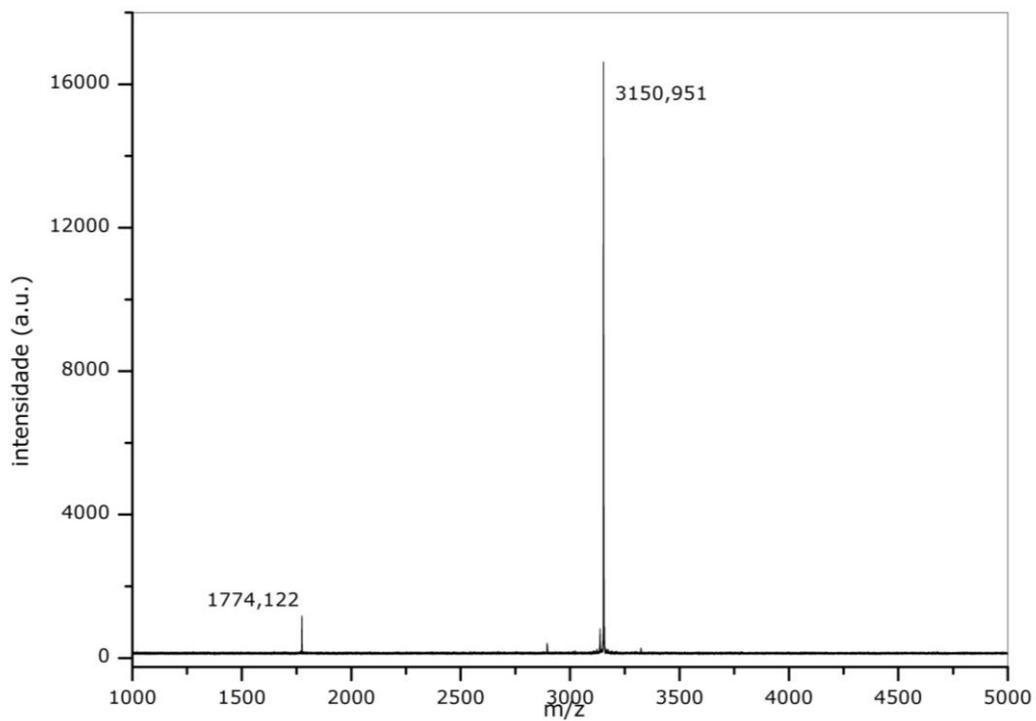


Figura 29 - Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra de DD K purificada.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo antimicrobiano Dermadistinctina K. Apesar dos inúmeros problemas encontrados ao longo do processo sintético, a metodologia empregada para a síntese do peptídeo, utilizando suporte sólido para a construção da cadeia peptídica via estratégia Fmoc, se mostrou eficiente e de fácil execução. Essas dificuldades estão principalmente relacionadas com o elevado grau de substituição da resina que favorece os processos de aglomerações das cadeias peptídicas e a pequena porosidade que dificulta a difusão do solvente no seu interior. Esses fatores acabam reduzindo a exposição dos ligantes aos reagentes químicos prejudicando os processos reacionais.

As técnicas de cromatografia de alta eficiência e espectrometria de massas demonstraram ser suficientes e eficazes para as análises realizadas, pois possibilitaram a identificação de fragmentos de DD K contendo ou não resíduos de lisina, possibilitaram a confirmação do sucesso da síntese e a purificação da amostra bruta do peptídeo sintetizado.

O peptídeo DDK sintetizado neste trabalho vem sendo estudado e utilizado como modelo para averiguar a possibilidade da ligação de peptídeos a superfície de nanopartículas magnéticas, que atuariam como dispositivos para carregamento dessas biomoléculas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, P. A., G. Neves, *et al.* Combinatorial chemistry: advanced tool for drug leads discovery. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.39, n.4, p.351-363. 2003.

Barany, G., N. Kneib Cordonier, *et al.* Solid phase peptide synthesis: a silver anniversary report*. International Journal of Peptide and Protein Research, v.30, n.6, p.705-739. 1987.

Barnett, A. H. e D. R. Owens. Insulin analogues. Lancet, v.349, n.9044, p.47-51. 1997.

Batista, C. V., L. R. Da Silva, *et al.* Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*. Peptides, v.20, n.6, p.679. 1999.

Berg, J. M., L. Stryer, *et al.* Bioquímica: Reverte Editorial Sa. 2008

Bordusa, F. Proteases in organic synthesis. Chemical reviews, v.102, n.12, p.4817-4868. 2002.

Brand, G. D. Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2007.

Brand, G. D., J. R. S. A. Leite, *et al.* Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.51, p.49332. 2002.

Byun, H. G. e S. K. Kim. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from Alaskan pollack skin. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v.35, n.2, p.239-243. 2002.

Calvet, S., J. L. Torres, *et al.* Enzymatic peptide synthesis in organic media. Synthesis of CCK-8 dipeptide fragments. Biocatalysis and Biotransformation, v.13, n.4, p.201-216. 1996.

Campbell, M. e S. O. Farrell. Bioquímica: Thomson Learning Ibero. 2004

Carpino, L. A. e G. Y. Han. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. The Journal of Organic Chemistry, v.37, n.22, p.3404-3409. 1972.

Chan, W. C. e P. D. White. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach: Oxford University Press, USA. 2000

Chen, F., F. Zhang, *et al.* Recent progress in the chemo-enzymatic peptide synthesis. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.4, n.10, p.721-730. 2010.

Da Silva, F. D. Mecanismo de ação da microplusina, um peptídeo quelante de cobre com atividade antimicrobiana. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Da Silva, T. P. Potencial Terapêutico de Peptídeos Antimicrobianos Isolados de Venenos de Anfíbios. (Monografia). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

De Miranda Honorato, C. T. Análise peptidômica da secreção cutânea do anuro *Eupemphix nattereri* com ênfase na prospecção de peptídeos antimicrobianos. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília/DF, 2009.

Dias, R. L. A. e A. G. Corrêa. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. Quim. Nova, v.24, n.2, p.236-242. 2001.

Dornelles, M. F., M. G. B. Marques, *et al.* Revisão sobre toxinas de Anura (Tetrapoda, Lissamphibia) e suas aplicações biotecnológicas. Ciência em Movimento-Biociências e Saúde, n.24, p.103-113. 2010.

Faria, S. M. S. P. Síntese de péptidos envolvidos em mecanismos de acção antibiótica. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade do Porto, Porto, 2003.

Fields, G. B. Methods for removing the Fmoc group. Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States), v.35, p.17-27. 1994.

Fields, G. B. e R. L. Noble. Solid phase peptide synthesis utilizing 9 fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. International Journal of Peptide and Protein Research, v.35, n.3, p.161-214. 1990.

Goeddel, D. V., H. L. Heyneker, *et al.* Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. Nature, v.281, p.544-548. 1979.

Gutte, B. Peptides: synthesis, structures, and applications: Academic Pr. 1995

Guzmán, F., S. Barberis, *et al.* Peptide synthesis: chemical or enzymatic. Electronic Journal of Biotechnology, v.10, n.2, p.279-314. 2007.

Itakura, K., T. Hirose, *et al.* Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science, v.198, n.4321, p.1056. 1977.

Kay, B. K., J. Winter, *et al.* Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual: Academic Pr. 1996

Kent, S. B. H. Chemical synthesis of peptides and proteins. Annual review of biochemistry, v.57, n.1, p.957-989. 1988.

Machado, A., C. W. Liria, *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. Química Nova, v.27, p.781-789. 2004.

Marquardt, M. e V. L. Eifler-Lima. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. Química Nova, v.24, n.6, p.846-855. 2001.

Marzocco, A. e B. B. Torres. Bioquímica Básica. 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2007.

Mendel, S. M. S. Prospecção de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea de anfíbios do gênero Phyllomedusa. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. Journal of the American Chemical Society, v.85, n.14, p.2149-2154. 1963.

Mutter, M. e E. Bayer. Rapid Procedure for Liquid Phase Peptide Synthesis: The Crystallization Method. Angewandte Chemie International Edition in English, v.13, n.1, p.88-89. 1974.

Nelson, D. L. e M. M. Cox. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª. Edição, Sarvier, SP. ISBN: 8573781254. 2002.

Prates, M. V. e C. Bloch Jr. Peptídeos antimicrobianos: uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v.17. 2000.

Sewald, N. e H. D. Jakubke. Peptides: chemistry and biology: VCH. 2009

Toy, P. H. e K. D. Janda. Soluble polymer-supported organic synthesis. Accounts of Chemical Research, v.33, n.8, p.546-554. 2000.

Verly, R. M. Síntese e Estudos por Calorimetria e Ressonância Magnética Nuclear do Peptídeo Antimicrobiano Dermadistinctina K. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

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

Verly, R. M., C. M. Moraes, *et al.* Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. Biophysical journal, v.96, n.6, p.2194-2203. 2009.

Verly, R. M., M. A. Rodrigues, *et al.* Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. Peptides, v.29, n.1, p.15-24. 2008.

Vizzotto, C. S. Isolamento e caracterização de compostos bioativos da peçonha da aranha caranguejeira Lasiodora sp. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

Walsh, G. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. Applied microbiology and biotechnology, v.67, n.2, p.151-159. 2005.

Wentworth Jr, P. e K. D. Janda. Liquid-phase chemistry: recent advances in soluble polymer-supported catalysts, reagents and synthesis. Chem. Commun., n.19, p.1917-1924. 1999.