

RAPHAEL SANTA ROSA SAYEGH

Purificação e caracterização de peptídeos
antimicrobianos presentes na hemolinfa de
Acutisoma longipes (Gonyleptidae; Opiliones)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

São Paulo
2011

RAPHAEL SANTA ROSA SAYEGH

Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos
presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes*
(Gonyleptidae; Opiliones)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador:

Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sayegh, Raphael Santa Rosa.

Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones) / Raphael Santa Rosa Sayegh. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Pedro Ismael da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica, Biofísica e Imunidade de Artrópodes.

Versão do título para o inglês: Purification and characterization of antimicrobial peptides present in the haemolymph of *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae, Opiliones)

Descritores: 1. Opilião 2. Peptídeos antimicrobianos 3. Sistema imune em aracnídeos 4. Sequenciamento "de novo" 5. Vesículas unilamelares grandes 6. Espectroscopia de infravermelho I. Silva Junior, Pedro Ismael da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB045/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Raphael Santa Rosa Sayegh.

Título da Dissertação: Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones) .

Orientador(a): Pedro Ismael da Silva Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Para minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma maneira estiveram envolvidas durante o desenvolvimento deste projeto. Quero, com estas palavras, deixar claro que tudo feito neste trabalho não seria possível sem a valiosa contribuição de cada um de vocês.

Agradeço especialmente a meu orientador, Dr. Pedro Ismael, pela dedicação, ajuda e ensinamentos durante todos esses anos. Sou muito grato pela sua preocupação verdadeira com relação à minha formação.

Aos meus queridos pais, Luiz e Marilene, deixo aqui minha admiração pelo caráter inspirador de vocês. Me orgulho de ter pais tão dedicados e repletos de virtudes. Amo muito vocês!

Às minhas queridas irmãs, Carolina e Leticia, a convivência com vocês deixa meus dias mais alegres. Carol, obrigado pela revisão! Lelê, obrigado pelas risadas! Amo muito vocês!

Aos familiares que estão conosco e àqueles que já se foram, todo o carinho e lições de vida dadas por vocês me emocionam e engrandecem: Antonio (*in memoriam*), Elvira, Ermelindo (*i.m.*), Fernando, Gian, João Paulo, José Carlos (*i.m.*), Leda, Marcela, Maria Helena, Thais.

Aos amigos do laboratório de Química de Proteínas, sou imensamente grato pela ajuda de vocês e pelos bons momentos que passamos juntos ao longo desses anos. – Carol, Elisa, Gabriela, Katie, Ivan, Leonardo, Jorge, Rubens. Luana, você foi imprescindível para o funcionamento do laboratório. Sou muito grato a você!

Aos amigos que já passaram pelo laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes agradeço pelo suporte dado. – Carol, Diego, Eliane, Fernanda, Maria Fernanda, Paula, Rodrigo, Suzana e Taís.

Aos colaboradores diretos, gostaria de dizer que suas colaborações certamente enriqueceram o projeto e esclareceram muitas das minhas perguntas, além de terem tornado instigante o seu desenvolvimento:

- À Profa. Sirlei Daffre por abrir as portas do seu laboratório.

- Ao Dr. Robson Lopes de Melo pelo auxílio na síntese de peptídeos e ensinamentos valiosos.
- Ao Prof. Guillermo Montich por me introduzir a temas de biofísica e por me auxiliar muito durante minha permanência em Córdoba.
- Ao Dr. Daniel Lorenzini pela ajuda com as análises de massa e por me hospedar tão bem em sua casa. Saudades de X-coração!
- À Dra. Claudia Blanes Angeli por dedicar seu tempo me auxiliando nas análises por massa.
- Ao Dr. Ernesto Nakayasu pelo auxílio na parte de espectrometria de massas e pela leitura crítica dos resultados.
- À Dra. Isabel Batista pela realização do sequenciamento N-terminal
- Ao Dr. César Remuzgo pelas dicas sobre síntese de peptídeos.

À minha amada namorada, Beatriz, quero dizer que sua ajuda foi fundamental na elaboração, discussão e produção desta dissertação. A sua determinação na carreira transborda e me contagia. Posso realmente dizer que você me inspira.

Para os amigos cientistas ou com tendências a, me animo ao dizer que nossas discussões científicas, além de prazerosas, foram riquíssimas e com certeza influenciaram demais o jeito como enxergo o mundo. Adoro a companhia de vocês! – Ana, Bira, Bozo, Chicão, Carolzinha, Feijão, Guver, Juckus, Ju Zamp, Ká, Laura, Lu, Marcel, Mingau, Nada Mal, Ogro, Otite, Uno e Vanvan.

Ao meu mestre, Saul Gallegos, pelos ensinamentos em quadra que também servem para a vida.

Para aqueles que não são do meio científico, com certeza o convívio com vocês me inspirou e me ajudou em diversos sentidos. Meu caminho fica mais tranquilo sabendo que tenho amigos de verdade para compartilhar alegrias e angústias. Não dá pra imaginar a vida sem vocês! – Japa, Ju, Ká, Migu e Muxa (os mentecaptos).

Agradeço a contribuição de todos os funcionários, técnicos, alunos e pesquisadores do Centro de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan. E às ótimas risadas matinais da Dona Cida, que levantam o ânimo.

“(...) este *brave new world* é obra de uma sociedade secreta de astrônomos, biólogos, engenheiros, metafísicos, poetas, químicos, algebristas, moralistas, pintores, geômetras... dirigidos por um obscuro homem de gênio. Sobram indivíduos que dominam essas diversas disciplinas, mas não os capazes de invenção e menos ainda os capazes de subordinar a invenção a um rigoroso plano sistemático.”

Jorge Luis Borges

RESUMO

SAYEGH, R. S. R. **Purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa de *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones)**. 2011. 152 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

No sistema imune de artrópodes, em contraste com o dos vertebrados, não ocorre uma resposta a antígenos por meio da produção de imunoglobulinas específicas contra agentes infecciosos. Portanto, a imunidade adaptativa está ausente, sendo que o sistema imune nesses animais baseia-se somente numa resposta inata. Os mecanismos presentes na resposta imune inata dos artrópodes incluem: (i) o sistema de coagulação; (ii) a cascata da profenoloxidase; (iii) a liberação de moléculas que possuem ação direta contra microorganismos – dentre elas, os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Estas moléculas podem ser constitutivas, como observado em aracnídeos, ou terem sua expressão induzida após desafio imune, como observado em alguns insetos. PAMs são moléculas anfipáticas, geralmente catiônicas e compostas por 9 a 100 resíduos. O estudo desses peptídeos, além de possibilitar a descoberta de novas moléculas que tenham modo de ação alternativo aos antibióticos convencionais, permite uma compreensão mais ampla do sistema imunológico de diferentes grupos de animais, bem como a origem dos seus mecanismos na história evolutiva. Neste trabalho foi utilizado o opilião *Acutisoma longipes* como modelo experimental para a caracterização de PAMs presentes na sua hemolinfa, tendo em vista que não há registros de estudos dessa natureza que utilizaram representantes da ordem Opiliones. Primeiramente, foi demonstrada a ocorrência de diversas frações, obtidas da purificação da hemolinfa, com atividade anti-*M. luteus*, consistidas por peptídeos que aparentemente são constitutivos. Uma das frações mostrou-se pura e apresentou um peptídeo de 2,1 kDa cuja estrutura primária, composta por 18 resíduos, foi completamente elucidada (SGYLPGKEYVYKYKGKVF) por sequenciamento “de novo” e sequenciamento do N-terminal. Este peptídeo linear foi nomeado longipina. O peptídeo sintético apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli* e

Micrococcus luteus, e as leveduras *Candida albicans* e *C. tropicalis*, além de não apresentar atividade hemolítica na máxima concentração testada (100 μM). Foi demonstrado que a longipina liga-se preferencialmente a vesículas unilamelares grandes (LUVs), constituídas de fosfolipídios aniônicos (POPG), que mimetizam as cargas da superfície das células de microorganismos. A ligação do peptídeo a LUVs compostas, na razão molar de 1:1, por POPG e POPC (zwitteriônico) provoca o extravasamento de marcadores (carboxi-fluoresceína) aprisionados nos seus interiores. Esse peptídeo encontra-se majoritariamente desestruturado em solução ou na presença de sistema mimético composto somente por POPC. Porém, na sua ligação com POPG:POPC 1:1, adota estruturas β e estrutura relacionada à presente em agregados intermoleculares de fibras amiloides.

Palavras-chave: opilião. peptídeos antimicrobianos. sistema imune em aracnídeos. sequenciamento “de novo”. vesículas unilamelares grandes. espectroscopia de infravermelho.

ABSTRACT

SAYEGH, R. S. R. **Purification and characterization of antimicrobial peptides present in the haemolymph of *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones)**. 2011. 152 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The arthropods immune system, in contrast to the vertebrates one, lacks a response to antigens through the production of specific immunoglobulins to fight against infectious agents. Therefore, the adaptive immunity is absent, and their immune system is only supported by an innate response. The mechanisms present in the arthropods innate immune response include: (i) the clotting system; (ii) the prophenoloxidase cascade; (iii) the release of molecules that can directly act against microorganisms – among them, the antimicrobial peptides (AMPs). These molecules can be constitutive, as observed in arachnids, or have their expression induced upon immune challenge, as observed in some insects. AMPs are amphipathic molecules, usually cationic and formed by 9 to 100 residues. The study of these peptides, besides allowing the discovery of new molecules that exert their mode of action alternatively from the conventional antibiotics, permits a wider understanding of the immunological system from different groups of animals, as well as the origin of their mechanisms in the evolutionary history. The harvestman *Acutisoma longipes* was used in this work as an experimental model for the characterization of AMPs from its haemolymph, taking into account that there are no records of using representatives of the Opiliones order in such kind of study. Firstly, it was demonstrated the occurrence of several fractions, obtained from the haemolymph purification, that presented anti-*M. luteus* activity, consisted by peptides that are apparently constitutive. One of these fractions was pure and presented a 2.1 kDa peptide which had its primary structure, composed by 18 residues, completely elucidated by “de novo” and N-terminal sequencing (SGYLPGKEYVYKYKGVF). This linear peptide was named longipin. The synthetic peptide presented antimicrobial activity against *Escherichia coli*

and *Micrococcus luteus* bacteria and *Candida albicans* and *C. tropicalis* yeasts, in addition to the absence of hemolytic activity at the highest concentration used (100 μ M). It was shown that longipin preferentially binds to large unilamellar vesicles (LUVs), constituted by anionic phospholipids (POPG), that mimics the membrane surface of microbe cells. The peptide binding to LUVs composed, in 1:1 molar ratio, by POPG and POPC (zwitterionic) causes dye leakage (carboxyfluorescein) from their inside. This peptide in solution or in the presence of POPC solely containing mimic system is mostly unstructured. However, upon its binding to POPG:POPC 1:1, it adopts β and intermolecular aggregates amyloid-like fibrils structures.

Key words: harvestman. antimicrobial peptides. arachnids immune system. “de novo” sequencing. large unilamellar vesicles. infrared spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Modos de ação de peptídeos antimicrobianos capazes de provocar poros na bicamada fosfolipídica. 32**
- Figura 2- Modo de ação proposto para os agregados moleculares formados por monômeros do peptídeo antimicrobiano plantaricina A. 33**
- Figura 3- Macho adulto de *Acutisoma longipes* sobre um pedaço de casca de árvore..... 38**
- Figura 4- Detalhe da articulação coxae-trocanter e de um hemócito do opilião..... 39**
- Figura 5- Estrutura dos fosfolipídios utilizados para a preparação das vesículas artificiais. 53**
- Figura 6- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE do extrato ácido de hemócitos eluído em 40% de ACN da coluna Sep-Pak®. 60**
- Figura 7- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da fração ALH40%-20 (A) e espectros de massas (B e C) das frações ativas obtidas. 61**
- Figura 8- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE dos componentes do plasma de opiliões eluídos em 80% de ACN da coluna Sep-Pak®..... 63**
- Figura 9- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por CLAE das frações ALP80%-1 (A), ALP80%-2 (B) e ALP80%-5 (C) e espectros de massas (D a G) das frações ativas obtidas. 65**
- Figura 10- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE do plasma de opiliões eluídos em 40% de ACN da coluna Sep-Pak®. 66**
- Figura 11- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por CLAE das frações ALP40%-2 (A), ALP40%-11 (B) e ALP40%-37 (C) e espectros de massas (D a G) das frações ativas obtidas..... 68**
- Figura 12- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-41 (A) e análises por MALDI-ToF/MS (inserida em A) e por LC-ESI/MS (B a E) da fração ativa..... 70**
- Figura 13- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-46 (A) e análise por LC-ESI/MS (B a D) da fração ativa. 72**
- Figura 14- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-53 (A) e análise por LC-ESI/MS (B a D) da fração ativa. 74**

Figura 15- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-44 (A) e análises por MALDI-ToF/MS (A) da fração ativa.....	76
Figura 16- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 702,2 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da.	79
Figura 17- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 1.012,6 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da.	80
Figura 18- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 449,1 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da.	81
Figura 19- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 849,2 Da obtido a partir da digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da.	83
Figura 20- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 862,22 Da obtido a partir da digestão enzimática com endoprotease Glu-C/tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da.	85
Figura 21- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 2.125,08 Da presente na fração com atividade antimicrobiana ALP40%-44_12.	87
Figura 22- Comparação entre os espectros de DIC dos peptídeos de 2.125,08 (azul) e 2.153,32 (verde) Da encontrados na fração ALP40%-44_12.	88
Figura 23- Análise por LC-ESI-MS dos fragmentos obtidos após acetilação e digestão enzimática por endoprotease Glu-C da longipina.	90
Figura 24- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 933,18 Da obtido após acetilação e digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.125,08 Da.	92
Figura 25- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 1.419,6 Da obtido após acetilação e digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.125,08 Da.	94
Figura 26- Alinhamento das heme-lipoproteínas dos carrapatos <i>Dermacentor variabilis</i> e <i>Amblyomma americanum</i> com o peptídeo sequenciado do opilião <i>Acutisoma longipes</i>.	96
Figura 27- Purificação por CLAE do material bruto obtido da síntese química em fase sólida da longipina e avaliação da fração LS-T7 por MALDI-ToF/MS.	97

Figura 28- Análise por CLAE para avaliação do grau de pureza do peptídeo sintético obtido na fração LS-T7 da purificação dos produtos da síntese.	99
Figura 29- Comparação entre os espectros de DIC da longipina nativa (azul) e sintética (verde).	100
Figura 30- Fluorescência dos filtrados de soluções de longipina 20 μM incubadas durante 30 min com vesículas formadas por POPG ou POPC na relação 1:50 (mol:mol) P/L em NaCl 10 mM.	103
Figura 31- Titulação da longipina (20 μM) com vesículas unilamelares.	104
Figura 32- Influência da força iônica do meio na ligação da longipina a LUVs compostas por POPG:POPC 1:1.	106
Figura 33- Ensaio de supressão da fluorescência do peptídeo, em solução ou na presença de LUVs, a concentrações crescentes de acrilamida.	108
Figura 34- Ensaio de alteração da permeabilidade de vesículas em NaCl 80 mM.	110
Figura 35- Ensaio de alteração da permeabilidade de vesículas em NaCl 10 mM/sacarose 140 mM.	111
Figura 36- Comparação dos espectros deconvoluídos da região amida I' da longipina.	113
Figura 37- Espectros originais com as bandas ajustadas da longipina em solução ou na presença de sistema mimético multilamelar.	115

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Íons presentes nos espectros de DIC dos fragmentos obtidos após tratamento enzimático com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. 82
- Tabela 2-** Íons presentes nos espectros de DIC dos fragmentos obtidos após tratamento enzimático com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da. 86
- Tabela 3-** Fragmentos internos presentes no espectros de DIC do fragmento N-terminal obtido após acetilação e digestão com endoprotease Glu-C da longipina. 95
- Tabela 4-** Estrutura primária e outros parâmetros moleculares da longipina. 95
- Tabela 5-** Espectro de atividade e intervalo da CMI da longipina sintética. 101
- Tabela 6-** Valores da constante de ligação aparente (K_b) e de F/FO máxima ($F/FO_{\text{máx}}$) obtidos pela equações das curvas ajustadas na titulação da longipina com LUVs. 105
- Tabela 7-** Valores da constante de ligação aparente (K_b) e de F/FO máxima ($F/FO_{\text{máx}}$) obtidos pela equações das curvas ajustadas na titulação da longipina com LUVs em diferentes forças iônicas do meio. 106
- Tabela 8-** Valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e das equações de retas obtidas no ensaio de supressão de fluorescência da longipina em dois intervalos de concentrações de acrilamida considerados: 0-0,3 e 0,4-0,7 M. 107
- Tabela 9-** Frequências assinaladas das estruturas secundárias presentes obtidas após ajuste nos espectros originais na região amida I'. 115
- Tabela 10-** Proporções (%) de estruturas secundárias da longipina em solução (D_2O) e na presença de MLVs compostas por POPC ou POPG:POPC 1:1 obtidas pela área das bandas após o ajuste nos espectros originais na região amida I'. 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs: absorvância

ACN: acetonitrila

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

CF: carboxifluoresceína

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMI: concentração mínima inibitória

D₂O: água deuterada

Da: daltons

DBU: 1,8-diazacyclo [5.4.0] undec-7-ene

DIC: dissociação induzida por colisão

DMF: dimetilformamida

DTT: ditioneitol

E_{col} : energia de colisão

EDT: 1,2-etaneditiol

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

ESI: *electrospray ionization* (ionização por eletrospray)

F : intensidade de fluorescência

F_0 : intensidade de fluorescência inicial

Gln: glutamina

Glu: ácido glutâmico

Gly: glicina

Ile: isoleucina

K_{sv} : constante de Stern-Volmer

K_b : constante de ligação aparente

LC: *liquid chromatography* (cromatografia líquida)

Leu: leucina

LPS: lipopolissacarídeos

LUVs: *large unilamellar vesicles* (vesículas unilamelares grandes)

Lys: lisina

Lys^{AC}: ϵ -acetil-lisina

MALDI: *matrix assisted laser desorption ionization* (ionização e desorção a laser assistida por matriz)

Met^{ox}: metionina oxidada

MLVs: *multilamellar vesicles* (vesículas multilamelares)

MS: *mass spectrometry* (espectrometria de massas)

m/z: razão entre massa e carga

NMF: N-metilmorfolina

PAMs: peptídeos antimicrobianos

PC: fosfatidilcolina

Phe: fenilalanina

pIA: plantaricina A

POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

POPG: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)]

Pro: prolina

^{AC}Ser: serina com a região N-terminal modificada por um radical acetil

Ser: serina

TBTU: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio-tetrafluoroborato

TFA: ácido trifluoracético

ToF: *time of flight* (tempo de voo)

Tyr: tirosina

Val: valina

λ : comprimento de onda

λ_{em} : comprimento de onda de emissão

λ_{ex} : comprimento de onda de excitação

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Ácido aspártico	D
Ácido glutâmico	E
Asparagina	N
Fenilalanina	F
Glicina	G
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Prolina	P
Serina	S
Tirosina	Y
Valina	V

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo Geral	37
2.2	Objetivos Específicos	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Coleta dos Animais e Extração da Hemolinfa	38
3.2	Fracionamento da Hemolinfa	40
3.2.1	Fracionamento do Conteúdo dos Hemócitos	40
3.2.2	Fracionamento do Conteúdo do Plasma.....	41
3.3	Bioensaios	42
3.3.1	Microorganismos.....	42
3.3.2	Ensaio de Atividade Antimicrobiana	42
3.3.3	Ensaio de Atividade Hemolítica	43
3.4	Espectrometria de Massas	44
3.4.1	Avaliação do Grau de Pureza e Massas Moleculares dos Peptídeos	45
3.4.2	Redução e Alquilação	46
3.4.3	Sequenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos.....	46
3.4.3.1	<i>Digestão Enzimática</i>	47
3.4.3.2	<i>Acetilação dos Peptídeos</i>	48
3.4.3.3	<i>Sequenciamento “de novo”</i>	48
3.5	Sequenciamento N-terminal	49
3.6	Busca em Bancos de Dados e Alinhamento	50
3.7	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida	50
3.7.1	Materiais e Reagentes.....	50
3.7.2	Acoplamento dos Resíduos e Desproteção do Grupo Fmoc	50
3.7.3	Desproteção e Clivagem.....	51
3.7.4	Purificação do Peptídeo Sintético	52

3.7.5	Avaliação do Grau de Pureza	52
3.7.6	Cálculo da Concentração do Peptídeo Sintético.....	52
3.8	Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes	53
3.9	Ensaio de Ligação do Peptídeo a Vesículas	54
3.10	Ensaio de Permeabilidade das Vesículas.....	55
3.11	Supressão da Fluorescência do Peptídeo	56
3.12	Espectroscopia de Infravermelho	57
4	RESULTADOS	59
4.1	Frações Ativas da Hemolinfa	59
4.1.7	Peptídeos dos Hemócitos	59
4.1.8	Peptídeos do Plasma.....	62
4.2	Sequenciamento “De novo”	77
4.2.1	Produtos da Digestão com Tripsina	78
4.2.2	Produtos da Digestão com Endoprotease Glu-C/Tripsina ..	82
4.2.3	Cadeia Polipeptídica Completa	86
4.2.4	Diferenciação entre Resíduos de Lys e Gln.....	89
4.3	Sequenciamento N-terminal	95
4.4	Síntese Química da Longipina	96
4.4.1	Purificação dos Produtos de Síntese	96
4.4.2	Avaliação do Grau de Pureza	98
4.4.3	Espectros de DIC da Longipina Nativa e Sintética.....	99
4.5	Atividade Antimicrobiana e Hemolítica da Longipina Sintética.....	101
4.6	Ligação da Longipina a Vesículas Unilamelares Grandes	102
4.6.1	Ensaio com Filtros Amicon - 100 kDa.....	102
4.6.2	Titulação da Longipina com LUVs	103
4.6.3	Influência da Força Iônica do Meio	105
4.6.4	Supressão da Fluorescência da Longipina	106
4.6.5	Alteração da Permeabilidade da Bicamada.....	108
4.7	Análise Conformacional da Longipina	111

5	DISCUSSÃO	118
6	CONCLUSÕES	137
	REFERÊNCIAS.....	138
	ANEXO- Sequenciamento "de novo" do peptídeo de 2.125,08 Da presente na fração com atividade antimicrobiana ALP40%-44_12.....	152

1 INTRODUÇÃO

Os artrópodes são animais com ampla distribuição geográfica adaptados a sobreviver em virtualmente todos os ambientes terrestres. Esse grupo surgiu há 600 milhões de anos, no início do período Pré-Cambriano, e hoje estima-se que existam mais de 1 milhão de espécies viventes. Sua sobrevivência e a enorme diversidade devem-se à adaptação a diferentes ambientes, às vantagens na competição com outras espécies, à excepcional capacidade reprodutora, à eficiência na execução de suas funções e à resistência a substâncias tóxicas (BRUSCA e BRUSCA, 2003). A conquista de diferentes habitat provavelmente está relacionada também à capacidade de se defenderem contra diversos tipos de microorganismos e parasitas pois muitos artrópodes vivem em ambientes onde esses microorganismos são abundantes. É, portanto, evidente que esses invertebrados possuam um sistema imunológico eficiente capaz de combater esses microorganismos potencialmente perigosos (BARRAVIERA, 1994).

Durante a muda, os artrópodes ficam sujeitos a uma série de perigos como a ruptura acidental da cutícula e a consequente perda da hemolinfa, assim como o ataque de parasitas e infecção por fungos e bactérias. Sendo assim, eles apresentam mecanismos de defesa imune muito bem elaborados, que contribuem para a sua sobrevivência (FOELIX, 1996).

O sistema imune dos invertebrados se diferencia do dos vertebrados pela falta das imunoglobulinas – moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores. Somente a imunidade inata, reconhecida como um mecanismo mais primitivo, está presente nos invertebrados e foi conservada ao longo da evolução, sendo que atualmente é encontrada em todos os representantes do reino animal (HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006). Já o sistema imune dos vertebrados é constituído tanto pela imunidade inata como pela parte adaptativa (HOFFMANN et al., 1999). Esta última é considerada como um mecanismo mais derivado (surgiu mais recentemente na evolução) da resposta imune que apareceu há 450 milhões de anos em peixes mandibulados (HOFFMANN, 2004).

Portanto, a falta de uma resposta imune específica contra patógenos nos invertebrados estaria também ligada à ausência de memória imunológica (HOFFMANN, 2003). No entanto, já foi verificado que em copépodos (KURTZ e FRANZ, 2003) e gafanhotos (LITTLE; HULTMARK; READ, 2005) ocorre uma diminuição na porcentagem de indivíduos infectados após o segundo desafio se este somente for realizado com o mesmo patógeno do primeiro desafio, evidenciando a presença de memória imunológica e possivelmente uma resposta específica contra os microorganismos invasores. O mecanismo da memória imunológica foi verificado em *Anopheles gambiae* infectados com o protozoário causador da malária *Plasmodium sp*, que provoca o contato da microbiota do intestino do mosquito com as células epiteliais, levando à diferenciação dos hemócitos. Essa diferenciação é responsável pelo aparecimento de memória imunológica de longa duração contra o protozoário (RODRIGUES et al., 2010).

O sistema imune inato dos invertebrados envolve reações celulares e humorais coordenadas que atuam na eliminação dos microorganismos invasores. As reações humorais são responsáveis pela ativação da cascata da coagulação e da profenoloxidase, enquanto as reações celulares podem envolver eventos de fagocitose e liberação de moléculas ativas como os peptídeos antimicrobianos (PAMs).

A cascata da coagulação tem por finalidade a produção de uma proteína insolúvel (coagulina) a partir de coagulogênio, levando à formação de uma substância gelatinosa que tem importante papel no aprisionamento de microorganismos invasores, bem como evitar o extravasamento da hemolinfa após lesão na cutícula dos animais. Essa cascata foi bem caracterizada no límulo *Tachypleus tridentatus* (IWANAGA, 1993; IWANAGA e LEE, 2005), sendo disparada pelo contato de proteínas liberadas no plasma com lipopolissacarídeos (LPS) ou β -1,3-glucana, constituintes da membrana de bactérias Gram-negativas e leveduras, respectivamente.

Foi verificado que essa cascata desempenha um importante papel na imunidade da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana* e junto com a secreção de PAMs são os principais mecanismos disparados nesse aracnídeo após infecção (FUKUZAWA et al., 2008).

Quando o número de bactérias é elevado ou quando outros parasitas maiores (protozoário e helmintos) provocam a infecção, os hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em volta dos organismos invasores, provocando a morte destes por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas liberadas dentro dos nódulos (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio). Este processo chamado de melanização é uma resposta à invasão de parasitas nos invertebrados, em especial nos artrópodes, devido à ação da enzima fenoloxidase, que faz parte de um complexo sistema de proteases, proteínas de reconhecimento e inibidores de proteases presentes na cascata da profenoloxidase. O disparo dessa cascata, assim como da coagulação, é desencadeado por componentes de origem microbiana (CERENIUS e SODERHALL, 2004; SODERHALL e CERENIUS, 1998) e tem como produto final a formação de melanina a partir de quinonas. Sua importância *in vivo* no combate de microorganismos invasores já foi demonstrada em insetos mutantes nos quais estão ausentes genes de proteínas envolvidas nessa cascata (CERENIUS; LEE; SODERHALL, 2008).

As reações celulares são carregadas pelos hemócitos, células circulantes da hemolinfa, e atuam de várias maneiras. As bactérias, por exemplo, podem ser fagocitadas e mortas por essas células (GREENBERG e GRINSTEIN, 2002). Em límulos, foi verificado que, quando em contato com componentes da parede de ou da membrana de microorganismos, também ocorre a rápida liberação do conteúdo granular dos hemócitos. Os grânulos grandes armazenam fatores de coagulação, inibidores de proteases, lectinas e proteínas antimicrobianas. Os grânulos pequenos armazenam pelo menos seis peptídeos antimicrobianos diferentes (IWANAGA et al., 1994) que podem ter ação direta contra os agentes invasores.

Os hemócitos circulantes na hemolinfa podem ser atraídos quimiotaticamente ao local da injúria, liberando PAMs para a eliminação dos patógenos. Em experimentos *in vivo* e *in vitro*, verificou-se que os hemócitos da aranha *A. gomesiana* são atraídos quimicamente por LPS ou leveduras, sendo que os últimos também provocam a desgranulação das células em ensaios *in vivo* (FUKUZAWA et al., 2008).

Além de importante papel na ação direta contra os microorganismos invasores, os PAMs podem também provocar respostas que modulam a inflamação causada, por exemplo, pela liberação de moléculas constituintes dos microorganismos na circulação dos animais. Esse cenário, então, assemelha-se ao que ocorre na resposta imune inata de mamíferos (HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006). Os peptídeos antimicrobianos podem também desempenhar importante papel na interface entre a resposta imune inata e a adaptativa, dando suporte à diferenciação de certas linhagens celulares e alterando a liberação de citocinas específicas que irão polarizar a resposta adaptativa (BROWN e HANCOCK, 2006).

O PAMs LL-37, por exemplo, presente em humanos, pode se ligar a moléculas de microorganismos e impedir que estas estimulem uma resposta exagerada dos macrófagos na liberação de citocinas e potencialmente reduzir o desenvolvimento de uma septicemia em infecções moderadas. Foi demonstrado também que esse peptídeo pode promover a super expressão de genes relacionados a quimiocinas e seus receptores, que podem contribuir para migração de células do sistema imune para o local da infecção (SCOTT et al., 2002). Demonstrando, dessa maneira, o seu papel modulador da resposta imune inata.

A expressão de PAMs em diferentes organismos pode ser tanto constitutiva como induzida por infecção ou estímulos inflamatórios causados pelo desafio com bactérias, fungos ou moléculas constituintes da parede celular desses organismos, como lipopolissacarídeos (LPS), β -1,3-glucana e peptídeoglicano (HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Na aranha caranguejeira *A. gomesiana* foi purificada a gomesina, um potente peptídeo antimicrobiano constitutivamente expresso nos hemócitos composto por 18 resíduos de aminoácidos (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000) cuja estrutura secundária é estabilizada por duas pontes de dissulfeto (MANDARD et al., 2002). Esse peptídeo, armazenado na forma de um propeptídeo em certos grânulos dos hemócitos (LORENZINI et al., 2003b), provavelmente sofre processamento enzimático após injúria para que o peptídeo na sua forma ativa seja liberado no local da infecção (FUKUZAWA

et al., 2008). E na aranha araneomorfa *Cupiennius salei* foi verificada a expressão constitutiva de defensinas em diversos tecidos, inclusive nos hemócitos, de animais não infectados (BAUMANN et al., 2010).

Foram também isolados e caracterizados três PAMs da hemolinfa de escorpiões não desafiados da espécie *Androctonus australis*: a androctonina, a buthinina e um peptídeo similar a defensinas de insetos (EHRET-SABATIER et al., 1996).

Na hemolinfa do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram caracterizados dois PAMs ricos em cisteína: a microplusina, encontrada no plasma e uma defensina presente nos hemócitos. Esses dois peptídeos apresentaram padrões de expressão similares nos tecidos do animal (FOGAÇA et al., 2004).

Nos hemócitos do límulo *T. tridentatus* foram isolados os peptídeos taquiplesina, taquistatinas, taquicitinas e defensinas que se encontram armazenados no interior de grânulos pequenos e possuem potente atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos (IWANAGA, 2002).

No bivalve *Mytilus edulis* foram isolados da sua hemolinfa quatro peptídeos antimicrobianos constitutivamente expressos nos hemócitos, pois não houve diferenças nos níveis de expressão entre animais desafiados e não desafiados. A presença de peptídeos antimicrobianos constitutivamente expressos nesses animais indica que essa condição no invertebrados possa ser primitiva se comparada ao complexo sistema de reconhecimento e indução da expressão de PAM presentes nos invertebrados superiores (CHARLET et al., 1996).

Portanto, os trabalhos supracitados que demonstraram a presença constitutiva de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa dos aracnídeos (aranhas, escorpião e carrapato) e limulídeos (grupos que pertencem à classe Chelicerata) apontam para a provável presença de moléculas também constitutivamente expressas nos demais animais representantes do grupo dos quelicerados. Essa hipótese também pode ser apoiada na especulação de Charlet et al. (1996) com relação à ancestralidade da expressão constitutiva de PAMs comparada com a indução após injúria presente nos invertebrados superiores, como em insetos, tendo ainda em vista que a origem dos

quelicerados é anterior à dos insetos, datando do início do Ordoviciano há 445 milhões de anos (DUNLOP, 2010), enquanto fósseis de insetos datam de 390 milhões de anos atrás, no final do Devoniano (EDGECOMBE, 2010). Desta forma, torna-se intrigante a determinação do mecanismo da resposta imune inata com relação à expressão de peptídeos antimicrobianos (se constitutivos ou induzidos) presentes nos animais dos mais diversos grupos de artrópodes, dentre eles os quelicerados e os aracnídeos.

Em insetos holometábolos, a expressão dos peptídeos antimicrobianos é induzida após injúria séptica. O principal órgão produtor é o corpo gorduroso, de onde são secretados na hemolinfa permitindo a rápida difusão pelo corpo do animal e podendo atingir concentrações de 1 a 100 μM . Essa faixa de concentração é justamente a encontrada em ensaios *in vitro* que caracterizam a concentração mínima inibitória (CMI) da maioria dos peptídeos antimicrobianos. A CMI é a concentração mínima da molécula a causar 100% da inibição do crescimento do microorganismo e para a maioria dos PAMs está dentro da ordem de μM (LEMAITRE e HOFFMANN, 2007; SHAI, 2002).

O corpo gorduroso é o principal órgão produtor de PAMs nos insetos holometábolos, enquanto nos heterometábolos esse papel é desempenhado pelos hemócitos (BULET e STOCKLIN, 2005). Em contraste com a grande maioria dos estudos realizados com insetos, foi verificado que no cupim *Pseudocanthotermes spiniger* ocorre a presença constitutiva do peptídeo antimicrobiano termicina em grânulos dos hemócitos e na glândula salivar. Esse peptídeo apresentou elevada atividade antifúngica. Visto que os cupins costumam recobrir os ovos com saliva, esse peptídeo pode ter importante papel na proteção dos embriões contra fungos patogênicos (LAMBERTY et al., 2001).

O atual conhecimento sobre a imunidade inata em insetos baseia-se principalmente nos mecanismos do sistema imune presentes na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. A expressão de PAMs nesse organismo pode ser induzida por duas vias de sinalização distintas capazes de reconhecer componentes da parede celular ou da membrana de microorganismos (BULET e STOCKLIN, 2005; LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

A via do receptor *Toll*, presente na membrana das células do corpo gorduroso, é desencadeada pelo reconhecimento de componentes da membrana plasmática de leveduras – como β -1,3-glucana – ou da parede de bactérias Gram-positivas – como peptidoglicano – e culmina na ativação de fatores de transcrição para a síntese de peptídeos antimicrobianos ativos contra esses microorganismos (ex. drosomicina). A via IMD, por sua vez, é desencadeada pelo reconhecimento de componentes da membrana de bactérias Gram-negativas, levando à expressão de peptídeos ativos contra esses microorganismos (ex. diptericina) nas células do corpo gorduroso que são liberados na circulação para combater os patógenos invasores (FERRANDON et al., 2007; LEMAITRE e HOFFMANN, 2007).

Mutantes das moscas para proteínas envolvidas na sinalização da via *Toll* apresentaram diminuição na expressão do peptídeo antifúngico drosomicina, maior suscetibilidade e menor taxa de sobrevivência a infecções causadas por fungos (LEMAITRE et al., 1996). Demonstrando, assim, a importância *in vivo* desse peptídeo antimicrobiano no combate a infecções.

Mais recentemente, Haine et al. (2008) realizaram ensaios *in vivo* com larvas do besouro *Tenebrio molitor*. Eles evidenciaram que os peptídeos antimicrobianos induzidos após a infecção possuem papel importante na inibição do crescimento de bactérias resistentes que sobreviveram à primeira linha de defesa do sistema imune (ex. fagocitose e cascata da profenoloxidase), já que a máxima atividade antimicrobiana da hemolinfa dos animais é atingida após a eliminação de quase todos os microorganismos. Dessa maneira, também fica evidenciado o importante papel de outras linhas de defesa do sistema imune inato nos insetos (como a cascata da coagulação e da profenoloxidase), que não a ação direta de PAMs, para a eliminação de microorganismos invasores.

Os PAMs desempenham importante papel na proteção de organismos multicelulares contra microorganismos potencialmente perigosos, sendo expressos em altas concentrações nos tecidos epiteliais. Dessa maneira, funcionam como uma importante barreira de defesa na eliminação de

microorganismos que estão constantemente em contato com esses tecidos (ZASLOFF, 2002).

Camundongos *knockout* para o gene Cramp que expressa um peptídeo antimicrobiano da família das catelicidinas em tecidos epiteliais mostraram alta suscetibilidade a infecções causadas por bactérias do gênero *Streptococcus*. A infecção causada pela bactéria provocou úlceras necróticas maiores na pele dos camundongos mutantes comparadas aos selvagens (NIZET et al., 2001). Ainda neste trabalho foi mostrado que uma cepa mutante de *Streptococcus* resistente à ação da catelicidina *in vitro* apresentou maior patogenicidade em camundongos selvagens, demonstrando o papel essencial desempenhado por esse peptídeo na imunidade dos animais.

Como visto, os PAMs são importantes componentes do sistema imune inato. São moléculas anfipáticas, geralmente catiônicas, carregadas com 2 a 9 cargas positivas (elevado valor de pI) e compostas por 9 a 100 resíduos de aminoácidos podendo ser agrupadas de acordo com suas propriedades físicas, químicas e estruturais. Ao contrário de suas propriedades físicas semelhantes, esses peptídeos catiônicos não possuem muitas homologias com relação a suas sequências. Muitos são lineares com tendência a formar estruturas em α -hélice, folhas- β pregueada ou ambas em contato com membranas lipídicas ou possuem pontes de cisteína em sua estrutura. Podem ainda ser classificados com relação à riqueza de determinado resíduo presente na sequência como prolina, triptofano, histidina e glicina (BROGDEN, 2005; BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004). Alguns são cíclicos devido à presença de uma ou mais pontes de dissulfeto ou tioéter que se mostram importantes para manutenção de suas atividades contra microorganismos (FAZIO et al., 2006). Apesar da grande maioria dos PAMs serem catiônicos, alguns mostram-se aniônicos a pH neutro, como no caso da microplusina isolada de carrapatos (FOGAÇA et al., 2004). Sua atividade também difere da maioria dos peptídeos catiônicos e está relacionada ao sequestro de íons Cu^{2+} , já que os resíduos de histidina presentes em sua sequência estão envolvidos na capacidade da molécula de quelar íons divalentes (SILVA et al., 2009).

Peptídeos antimicrobianos são componentes do sistema imune de virtualmente todas as formas de vida (HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006). Podem ser encontrados tanto em invertebrados como nos vertebrados, protozoários, procariotos e plantas (BULET; STOCKLIN; MENIN, 2004).

Em humanos, já foi isolada uma grande variedade de PAMS, sendo eles: α e β defensinas, catelicidina e histatinas. A catelicidina LL-37, que é originada a partir da clivagem da região C-terminal da proteína CAP18, expressa em leucócitos e diferentes tecidos epiteliais, possui atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas além de papel modulador da resposta imune (DE SMET e CONTRERAS, 2005).

Os peptídeos antimicrobianos isolados de diferentes insetos são agrupados em diferentes classes e possuem características similares entre si. Podem ser lineares, estabilizados por pontes de cisteína, pertencer à família das defensinas ou serem ricos em resíduos de Pro (BULET e STOCKLIN, 2005).

Desde a caracterização dos primeiros peptídeos antimicrobianos constituintes do sistema imune de artrópodes, isolados nos anos 80 da larva de *Hyalophora cecropia* e nomeados cecropinas A e B (STEINER et al., 1981), muitos outros PAMs foram caracterizados de diversos organismos. Atualmente existem 1.216 peptídeos experimentalmente validados quanto às suas atividades antimicrobianas (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>).

Foram descritos peptídeos antimicrobianos capazes de matar bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos (filamentosos e leveduras), vírus e protozoários. Ainda com relação a seu espectro de atividade, os PAMs podem ser divididos em: hemolíticos (aqueles que além da atividade antimicrobiana possuem atividade contra células de mamíferos) e não hemolíticos (SHAI, 2002). A seletividade dessas moléculas está principalmente relacionada à diferença de cargas presente na superfície das células. Enquanto as células de microorganismos possuem uma grande quantidade de fosfolípidios aniônicos na superfície de suas células, conferindo uma carga total negativa, as células de mamíferos possuem uma superfície celular zwitteriônica, com carga total neutra (MATSUZAKI, 2009).

Acredita-se que o mecanismo de ação mais comum dos PAMs que leva à morte dos microorganismos se dá através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que provocaria o extravasamento do conteúdo celular, inviabilizando a sobrevivência do organismo (ANDREU e RIVAS, 1998; HANCOCK e LEHRER, 1998).

Os mecanismos de interação dos peptídeos catiônicos com os fosfolipídios da membrana e o modo como afetam sua estruturação podem ser estudados pela interação dessas moléculas com membranas modelo, utilizando-se técnicas de difração de raios-X, fluorescência, ressonância magnética, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e dicroísmo circular (BROGDEN, 2005).

Os peptídeos em solução são atraídos para a superfície da membrana por forças eletrostáticas devido à atração entre as cargas positivas dos peptídeos e as negativas presentes na superfície da membrana. Encontram-se ligados paralelamente à superfície da membrana em concentrações que não excedem a relação peptídeo/lipídeo (P/L) limite. Se a concentração de peptídeo excede a P/L limite, os peptídeos passam a se ligar perpendicularmente à membrana e se inserem no core hidrofóbico da mesma (HUANG, 2000). A mudança na orientação do peptídeo está intimamente relacionada à concentração da molécula na qual são observados os primeiros sinais de aumento da permeabilidade (LEE et al., 2008).

Com relação ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática foram propostos três modos de ação (figura 1) pelos quais os peptídeos catiônicos podem interferir no empacotamento dos fosfolipídios da bicamada e formar poros (BROGDEN, 2005):

- formação de poro toroidal – o interior do poro na membrana é formado pelos peptídeos e pela cabeça polar fosfolipídios que foram induzidos a adotar uma curvatura mais positiva, ambos estão com suas partes hidrofílicas voltadas para o lúmen do poro (figura 1A);
- modelo *barrel stave*– o poro na membrana é formado somente pelos peptídeos, que ficam com suas partes hidrofílicas voltadas para o interior do poro enquanto suas partes hidrofóbicas ficam

alinhadas com as caudas dos fosfolipídios localizados na região periférica do poro (figura 1B);

- modelo *carpet* – ocorre a desestruturação da membrana plasmática, onde os peptídeos ficam orientados paralelamente à bicamada lipídica formando uma camada contínua ou “tapete” que pode levar à formação de micelas (figura 1C).

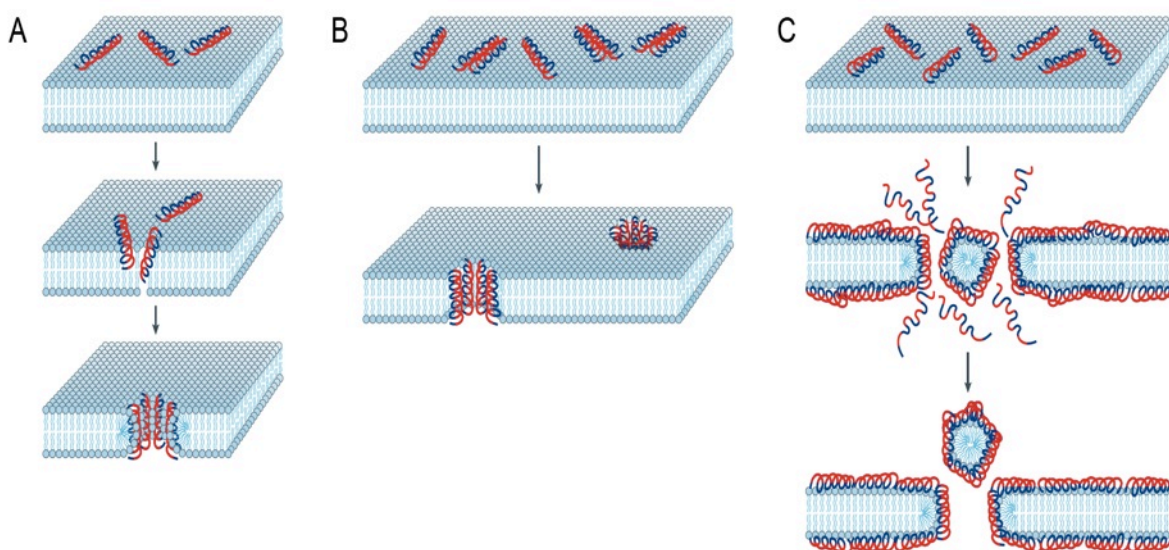


Figura 1- Modos de ação de peptídeos antimicrobianos capazes de provocar poros na bicamada fosfolipídica. Modelo de poro toroidal (A). Modelo do poro *barrel stave* (B). Modelo *carpet* (C). As regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dos peptídeos estão representadas em vermelho e azul, respectivamente.
FONTE: Brogden (2005).

A formação de um poro toroidal pela melitina, um potente peptídeo antimicrobiano isolado do veneno de abelhas, foi evidenciada por difração de nêutrons, enquanto a alameticina mostrou-se capaz de formar um poro do tipo *barrel stave*. Como o último é um peptídeo com carga total neutra, não ocorre repulsão coulômbica entre os monômeros que formam o poro, permitindo a grande proximidade entre eles. Já para a melitina, que possui carga positiva, a repulsão entre seu monômeros só possibilitaria a formação de um poro do tipo toroidal (YANG et al., 2001).

Mais recentemente foram descritos outros mecanismos moleculares na interação peptídeo-membrana que levam ao aumento da permeabilidade da bicamada.

Foi demonstrado que a plantaricina A (pIA) é capaz de formar agregados moleculares semelhantes a fibras amiloides na presença de vesículas compostas por fosfolipídios negativamente carregados (ZHAO et al., 2006). No mesmo trabalho, ainda foi sugerido que a inserção desses agregados na bicamada em uma estrutura anfipática, de modo a permitir a interação da parte hidrofóbica com o core da bicamada e a parte hidrofílica voltada para as cabeças polares dos fosfolipídios, promove uma curvatura positiva dos fosfolipídios, formando uma abertura na bicamada em forma de fenda (figura 2).

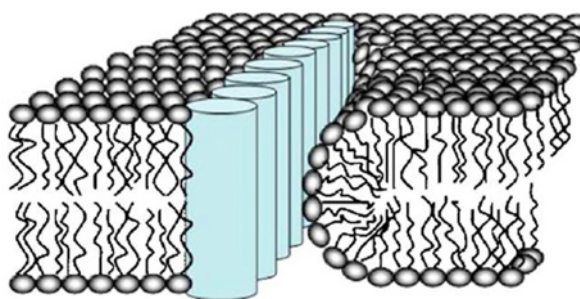


Figura 2- Modo de ação proposto para os agregados moleculares formados por monômeros do peptídeo antimicrobiano plantaricina A. Ocorre a formação de uma fenda na bicamada fosfolipídica.

FONTE: Zhao et al. (2006).

A cateslitina é um peptídeo originado pela clivagem enzimática da cromogranina A (proteína presente em grânulos no interior de células endócrinas e neuroendócrinas) que apresenta atividade antimicrobiana a baixas concentrações da ordem de μM e é capaz de penetrar nas células de fungos e leveduras (BRIOLAT et al., 2005). A interação desse peptídeo com membranas artificiais compostas por fosfolipídios de cabeça polar aniônica, assim como a pIA, desencadeia a formação de agregados intermoleculares. No entanto, foi especulado que esses agregados, em contato com a superfície da membrana, promovem a formação de domínios mais espessos e rígidos da bicamada enriquecidos com fosfolipídios negativos. Nesse sentido, a passagem do peptídeo, bem como o extravasamento de marcadores do seu interior poderiam ocorrer através dos defeitos de fase localizados na região entre os domínios mais espessos, ricos em fosfolipídios negativos e os domínios mais finos da bicamada (JEAN-FRANÇOIS et al., 2008).

Peptídeos antimicrobianos também podem agir sobre alvos intracelulares, inibindo a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, atividades enzimáticas e a síntese da parede celular (BROGDEN, 2005; HALE e HANCOCK, 2007; NICOLAS, 2009). Como exemplo, é possível citar a capacidade da buforina II de atravessar a membrana plasmática da célula e interagir com partes do DNA e moléculas de RNA, o que rapidamente causa a morte dos microorganismos (PARK; KIM; KIM, 1998). Foi verificado que ocorre a translocação desse peptídeo através da bicamada de membranas modelo sem que haja um extravasamento acentuado de marcadores fluorescentes aprisionados no interior das vesículas (KOBAYASHI et al., 2000).

O surgimento de microorganismo patogênicos ao homem e resistentes a antibióticos, atualmente empregados no combate a doenças infecciosas, torna necessário o constante desenvolvimento de novas drogas no combate a esses agentes (LOHNER e STAUDEGGER, 2001).

A aplicação terapêutica de PAMs ou o desenvolvimento de moléculas cujo modo de ação assemelha-se aos peptídeos antibióticos é motivada pelo potencial dessas moléculas, que podem agir na: modulação da resposta imune, neutralização de compostos tóxicos e ação direta contra microorganismos patogênicos (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006). Uma das etapas necessárias para o desenvolvimento de peptídeos antibióticos no combate a doenças infecciosas é a produção em grande escala desses compostos a custos reduzidos (ROSSI et al., 2008).

O profundo conhecimento do papel desempenhado pelos PAMs na regulação da imunidade inata dos hospedeiros pode possibilitar o desenvolvimento de terapias alternativas para o combate de infecções (HANCOCK e SAHL, 2006).

Especula-se que devido ao modo de ação mais comum dos peptídeos antimicrobianos (aumento da permeabilidade da membrana plasmática), o aparecimento de resistência a essas moléculas é um fenômeno improvável de ocorrer (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006; ROSSI et al., 2008). Mas alguns trabalhos demonstram que o surgimento de resistência contra a ação de peptídeos antimicrobianos em bactérias Gram-positivas está relacionado à modificação da composição de suas paredes celulares com relação à

presença de ácidos teicoicos (KOPRIVNJAK et al., 2008; KOVACS et al., 2006; PESCHEL et al., 1999). No entanto, esses componentes da parede celular desempenham importante papel na virulência dos microorganismos. Cepas geneticamente modificadas de *Streptococcus pneumoniae* com ausência de ácidos teicoicos na parede celular apresentaram baixa patogenicidade em estudo com modelos murino (GEHRE et al., 2009).

Tendo em vista que a evolução tratou de selecionar uma vasta diversidade de PAMs com estruturas e sequências variadas que coevoluiram com os mecanismos de defesas desenvolvidos pelas bactérias para evitar a ação desses peptídeos (PESCHEL e SAHL, 2006), estudos que abordam a caracterização de novas moléculas ativas presentes nos diversos grupos de animais podem trazer contribuições valiosas no conhecimento de seus variados modos de ação, bem como dos mecanismos adotados por bactérias resistentes. Esses tipos de estudos também podem contribuir para o conhecimento de novas moléculas cujo modo de ação possa inspirar o desenvolvimento de antibióticos que ajam de modo alternativo ao das drogas atuais.

A ordem Opiliones é um grupo grande e diversificado, representado por aproximadamente 5.000 espécies descritas. Seus representantes estão distribuídos em quase todos os climas do mundo incluindo regiões subárticas, sendo mais abundantes na América do sul e no sudeste asiático. Pertencem ao filo Arthropoda e ao subfilo Queliceriformes que teve sua origem nos antigos mares do período Cambriano, há mais ou menos 500 milhões de anos (BRUSCA e BRUSCA, 2003). Fósseis contendo órgãos preservados de animais da ordem Opiliones são datados do Devoniano (DUNLOP et al., 2003). Como os opiliões pertencem a uma ordem de animais que surgiram há muito tempo na história evolutiva, provavelmente devem possuir um sistema imunológico eficiente que lhes confere vantagens que permitiram sua persistência na Terra até os tempos atuais.

São animais que possuem um prossoma dividido em um proterossoma e dois segmentos livres que se juntam na lateral com o opistossoma segmentado. Muitas espécies possuem um corpo pequeno, mas geralmente com longas pernas, sendo que o 2º par possui função sensorial. Sua dieta

alimentar consiste de vários pequenos invertebrados e de animais e plantas mortas, sendo, portanto, generalistas e saprofágicos. Esses animais são uns dos poucos aracnídeos capazes de ingerir partículas sólidas de alimento – mais um motivo pelo qual é interessante o estudo de seu sistema imunológico, já que se alimentam de matéria em decomposição que pode estar infestada por fungos e bactérias. Opiliões são encontrados em áreas úmidas, encharcadas, árvores, poças de florestas densas, cavernas e grutas. São os únicos aracnídeos cujos machos possuem um pênis para realizar a transferência de esperma – primeiro grupo na história evolutiva dos animais que desenvolveu um órgão para a transferência direta de espermatozoides (BRUSCA e BRUSCA, 2003; PINTO-DA-ROCHA; MACHADO; GIRIBET, 2007).

Esses aracnídeos possuem um mecanismo de defesa contra predadores formado por um par de glândulas repugnatórias que se abrem na lateral do corpo e liberam uma substância composta por quinonas e/ou fenóis dotada de um forte odor (MACHADO, 2002).

Nos nefrócitos da hemolinfa do opilião *Leiobunum rotundum* tratados e não tratados com a bactéria *Micrococcus luteus*, foi demonstrada a presença de uma lisozima que pode ter importante papel no combate a esses microorganismos (ZANGER, 1995). No entanto, estudos sobre o sistema imune de opiliões são escassos e, aqueles que objetivassem a caracterização de PAMs constituintes da sua imunidade, inexistentes.

O conhecimento da biodiversidade de moléculas antimicrobianas – dentre elas os PAMs – nos vários grupos de artrópodes pode ser importante para se entender o sistema imunológico de uma maneira mais ampla, possibilitando também compreender as relações existentes entre os vários sistemas, bem como suas origens na evolução dos animais (SILVA, 2000).

Nesse contexto, o presente trabalho se propôs a purificar e caracterizar peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa do opilião *Acutisoma longipes*, visto que não há registros de estudos desse tipo realizados com animais da ordem Opiliones, a qual pertencem os opiliões.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo de moléculas ativas presentes em opiliões, que podem ser constituintes do seu sistema imunológico, através da purificação e caracterização de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa dos animais para a compreensão mais ampla da imunidade de aracnídeos e dos artrópodes em geral. Para tanto, foi utilizado o opilião *Acutisoma longipes* como modelo experimental .

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade do sistema imune do opilião *A. longipes* com relação aos peptídeos antimicrobianos constitutivamente presentes na sua hemolinfa;
- Elucidar a estrutura primária de um peptídeo com atividade antimicrobiana purificado do plasma dos animais;
- Sintetizar o peptídeo por meio de síntese química em fase sólida;
- Determinar o espectro de ação do peptídeo sintético;
- Verificar a interação do peptídeo sintético com membranas modelo;
- Avaliar as mudanças conformacionais do peptídeo em diferentes sistemas miméticos de membranas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta dos Animais e Extração da Hemolinfa

Os exemplares do opilião *Acutisoma longipes* (Gonyleptidae; Opiliones) (figura 3) de ambos sexos em diferentes estágios do desenvolvimento foram coletados em grutas nos arredores da “Pedra Grande” na cidade de Atibaia (São Paulo, Brasil) sob Licença Permanente para coleta de material zoológico nº 11024-3 - IBAMA e Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético nº 001/2008. Os animais coletados eram prontamente acondicionados em geladeiras térmicas com bolsas de gelo afim de se evitar a morte pela variação brusca de temperatura em dias muito quentes (fato observado em algumas coletas realizadas).



Figura 3- Macho adulto de *Acutisoma longipes* sobre um pedaço de casca de árvore.

Os opiliões foram mantidos em cativeiro sob condições assépticas e alimentados com larvas de *Tenebrio molitor* por pelo menos 7 dias antes da extração de sua hemolinfa.

A extração da hemolinfa foi feita através de punção na articulação coxae-trocanter, previamente limpas com etanol 100%, do último par de pernas (figura 4) de opiliões não desafiados e previamente resfriados (3 min a -20 °C), utilizando-se seringas hipodérmicas apirogênicas de 1 mL. Dessa

maneira, era esperado que a hemolinfa extravasasse e a gotícula formada era coletada na seringa. Para evitar a desgranulação dos hemócitos e, conseqüentemente, a coagulação da hemolinfa, a punção foi realizada na presença de um tampão de citrato de sódio (NaCl 0,45M; glicose 0,1M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM; pH 4,2) no interior da seringa e o máximo de hemolinfa coletada não ultrapassou a proporção de 2:1 ($v_{\text{hemolinfa}}/v_{\text{tampão}}$) (SÖDERHÄLL e SMITH, 1983). O volume final de hemolinfa extraído de aproximadamente 150 animais foi de 1,5 mL.

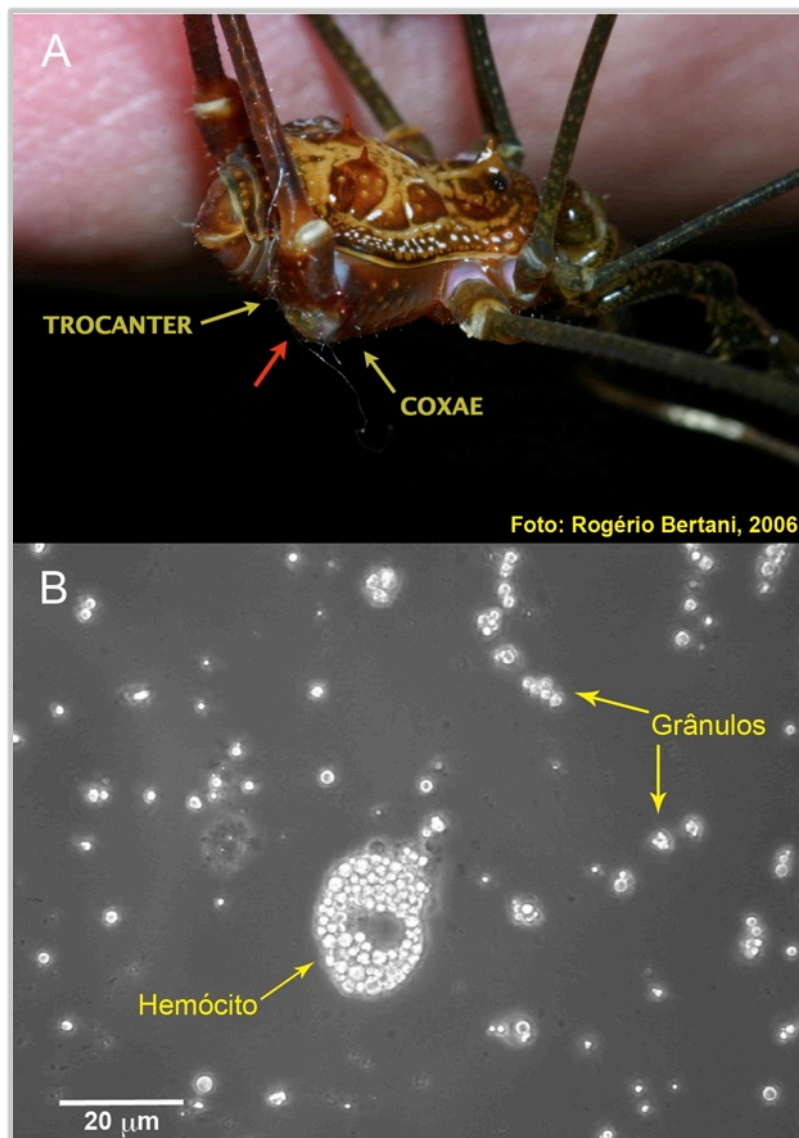


Figura 4- Detalhe da articulação coxae-trocater e de um hemócito do opilião. Articulação coxae-trocater do último par de pernas por onde a hemolinfa foi puncionada. A seta vermelha indica o local pelo qual a punção foi realizada (A). Hemócito contendo grânulos no seu interior visualizado ao microscópio ótico de fluorescência Zeiss Axiophot com aumento de 600X. Grânulos são também visualizados fora das células (B).

3.2 Fracionamento da Hemolinfa

A hemolinfa em tampão de citrato de sódio foi centrifugada a 800 x g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante, contendo o material do plasma, foi separado do *pellet* de hemócitos para que seus conteúdos pudessem ser analisados separadamente.

O material do plasma foi concentrado em uma centrífuga a vácuo RVT-400 (Savant Instruments, EUA) e os hemócitos lavados em tampão de citrato de sódio e centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 °C para o descarte do sobrenadante.

3.2.1 Fracionamento do Conteúdo dos Hemócitos

O *pellet* de hemócitos foi concentrado a vácuo, ressuspensionado em 1,5 mL de ácido acético 2 M e homogeneizado em aparato de Dounce. Esta preparação foi mantida sob agitação em banho de gelo durante 30 min. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16.000 x g durante 30 min a 4 °C, foi concentrado em centrífuga a vácuo e ressuspensionado em água acidificada (ácido trifluoracético [TFA] 0,05%). Este extrato ácido de hemócitos foi aplicado em uma coluna descartável Sep-Pak® Plus tC18 (Waters, Milford, MA, EUA) equilibrada previamente em água acidificada (TFA 0,05%). O material adsorvido na resina, após a passagem de 5 mL de H₂O/TFA 0,05%, foi eluído em soluções de 5%, 40% e 80% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,05% com o objetivo de pré-purificar o material em estudo.

As frações eluídas a 40% e 80% de ACN foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspensionadas em 1 mL de água acidificada e submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se uma coluna Vydac® (Grace, Deerfield, IL, EUA) de fase reversa semipreparativa C18 (5µm, 250 mm × 10 mm) em gradientes lineares de 2 a 60% e 20 a 80% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046%, respectivamente, durante 120 min sob fluxo de 1,5 mL/min. A absorbância (Abs) foi monitorada a um comprimento de onda de 225 nm ($\lambda = 225$ nm) em um equipamento UFLC Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japão). Todos os picos

foram coletados manualmente, concentrados em centrífuga a vácuo e reconstituídos em 100 μ L de água Milli-Q para serem utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana (ver 3.3.2).

As frações ativas foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por CLAE, utilizando-se agora uma coluna Vydac® de fase reversa analítica C18 (250 mm \times 4,6 mm) em gradientes lineares otimizados de acetonitrila em água acidificada, durante 60 min sob fluxo de 1,0 mL/min. Os gradientes utilizados nesta etapa de purificação possuíam um incremento de 0,17% de ACN/min e foram baseados na % de ACN na qual as frações foram eluídas na primeira etapa de CLAE. Todos os picos foram coletados e novamente utilizados para o ensaio de atividade antimicrobiana após serem concentrados em centrífuga a vácuo e reconstituídos em 50 μ L de água Milli-Q.

3.2.2 Fracionamento do Conteúdo do Plasma

O plasma dos opiliões, após concentrado em centrífuga a vácuo, foi ressuspenso em 30 mL de água acidificada. O pH foi ajustado para 3,3 e a solução mantida sob agitação constante em banho de gelo durante 30 min. O sobrenadante, obtido por centrifugação a 16.000 x g durante 30 min a 4 °C, foi concentrado em centrífuga a vácuo e ressuspenso em água acidificada. Este extrato ácido do plasma foi aplicado em três colunas descartáveis Sep-Pak® Plus tC18 em série equilibradas previamente em H₂O/TFA 0,05%. O material adsorvido na resina, após a passagem de 12 mL de H₂O/TFA 0,05%, foi eluído em soluções de 5%, 40% e 80% de acetonitrila (ACN) em TFA 0,05% com o objetivo de pré-purificar o material em estudo.

As frações eluídas a 40% e 80% de ACN foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspenso em 1 mL de água acidificada e submetidas a etapas de CLAE seguindo os mesmos procedimentos, tanto para o fracionamento da amostra quanto para a avaliação da atividade antimicrobiana, adotados para o fracionamento do extrato ácido de hemócitos (ver 3.2.1).

Para o cálculo da porcentagem de ACN nas quais as diferentes frações foram eluídas, foi descontado o tempo do volume morto (tempo que a solução de ACN/H₂O leva para atingir a coluna) do tempo de eluição de cada fração.

3.3 Bioensaios

3.3.1 Microorganismos

Escherichia coli SBS 363 (Gram-negativa) e *Micrococcus luteus* A270 (Gram-positiva) foram obtidas da coleção do Instituto Pasteur, Paris. *Candida albicans* (MDM8) foi obtida da Coleção do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC14502 (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 (Gram-positivas) obtidas junto ao *American Type Culture Collection* (ATCC). As leveduras, isolados clínicos (agentes de candidíase) obtidos por intermédio da Dra. Mirian A. F. Hayashi (Depto. Farmacologia/UNIFESP) e depositados na coleção do Instituto Oswaldo Cruz: *Candida albicans* IOC 4558 e *C. tropicalis* IOC 4560

3.3.2 Ensaio de Atividade Antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) das frações obtidas pelo fracionamento da hemolinfa de opiliões, foi utilizado o ensaio de inibição de crescimento em meio líquido (BULET et al., 1993). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços com uma alíquota de 10 ou 20 µL das frações ativas e 90 ou 80 µL do microorganismo no meio de cultivo e em fase logarítmica de crescimento, na concentração final de 10⁵ céls/mL para bactérias e 10⁴ céls/mL para leveduras em cada poço.

As leveduras (10⁴ céls/mL) foram ressuspendidas em um meio de crescimento contendo dextrose de batata na concentração 12 g/L (“Potato Dextrose Broth” - Difco™, Houston, EUA; *half strength*) e bactérias (10⁵

células/ml) foram ressuspensas em meio de cultura pobre em nutrientes (PB: peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,4). A medida de absorvância ($\lambda = 595$ nm) da cultura, após 18 horas de incubação a 30°C, foi realizada em um leitor de microplacas Victor 3 (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, EUA) com o intuito de avaliar a turbidez do meio. A concentração mínima inibitória (CMI) foi expressa como intervalo de concentrações **[x]-[y]**, onde **x** é a máxima concentração do peptídeo testada na qual os microorganismos apresentaram crescimento e **y** é a menor concentração que causou 100% de inibição do crescimento.

O espectro de atividade antimicrobiana bem como o intervalo da concentração mínima inibitória (CMI) do peptídeo sintético foi determinado contra os microorganismos citados (ver 3.3.1). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a determinação do intervalo da CMI, o peptídeo foi testado em diluições seriadas de 100 a 0,1 μ M.

3.3.3 Ensaio de Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica do peptídeo sintético foi testada contra eritrócitos humanos em placa de 96 poços com fundo em “U”. O sangue coletado na presença de um tampão de citrato de sódio (150 mM; pH 7,4) foi centrifugado por 15 min a 700 x g, lavado três vezes e ressuspendido em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4). A solução do peptídeo num volume de 50 μ L foi testada em duplicata a concentrações de 100 a 0,1 μ M em diluições seriadas adicionando-se mais 50 μ L de uma solução 4% (v/v) de eritrócitos em PBS. A placa foi centrifugada por 5 min a 700 x g após ter sido incubada por uma hora a 37 °C. Aliquotas (2 μ L) do sobrenadante foram usadas para a medida de absorvância ($\lambda = 414$ nm) em um espectrofotômetro NanoVue (GE Helthcare, Fairfield, CT, EUA). As medidas de absorvância do sobrenadante para 0 e 100% de hemólise foram obtidas com 50 μ L da solução 4% de hemácias em 50 μ L de PBS e Triton X-100 0,1%, respectivamente. O valor da absorvância a 414 nm da hemácias em PBS e Triton X-100 0,1% foram determinados pela média de seis dentre oito amostras diferentes das quais foram excluídos

o maior e o menor valor obtido (modificado de HAO et al., 2009). A porcentagem de hemólise do peptídeo foi calculada pela fórmula:

$$\%hemólise = \frac{Abs_{414nm} \text{ da solução com peptídeo} - Abs_{414nm} \text{ em PBS}}{Abs_{414nm} \text{ em Triton 0,1\%} - Abs_{414nm} \text{ em PBS}} \times 100 \quad (1)$$

Foi utilizado um comprimento de onda de 414 nm pois este foi o pico de absorbância da solução após o rompimento dos eritrócitos em Triton 0,1%. Este comprimento de onda é semelhante ao pico de Abs da cadeia α oxigenada da hemoglobina em solução ($\lambda = 413,7$ nm), segundo dados de Sugita (1975).

3.4 Espectrometria de Massas

A técnica de espectrometria de massas em diferentes equipamentos foi utilizada para determinar:

- as massas moleculares dos peptídeos presentes nas frações ativas obtidas após as etapas de purificação do material da hemolinfa (ver 3.4.1);
- a composição de massas das frações, fornecendo, portanto, evidências do grau de pureza da amostra (ver 3.4.1);
- a eficiência das etapas de acoplamento e desproteção na síntese química de peptídeos em fase sólida (ver 3.4.1);
- a presença de pontes de dissulfeto nos peptídeos purificados (ver 3.4.2);
- a estrutura primária dos peptídeos antimicrobianos (ver 3.4.3).

3.4.1 Avaliação do Grau de Pureza e Massas Moleculares dos Peptídeos

Para avaliar o grau de pureza e as massas moleculares dos peptídeos presentes nas frações ativas obtidas do fracionamento da hemolinfa, e para confirmar etapas de acoplamento e desproteção dos Fmoc-aminoácidos durante a síntese química de peptídeos em fase sólida, foram utilizadas as técnicas de MALDI-ToF/MS (*matrix assisted laser desorption ionization – time of flight/mass spectrometry*) ou LC-ESI/MS (*liquid chromatography-electrospray ionization/mass spectrometry*)

A espectrometria de massas por MALDI-ToF foi realizada em um equipamento Etnan MALDI-ToF/Pro (Amershan Biosciences, Suécia) operando em modo *reflectron* (para valores de massa/carga [m/z] até 10.000) e positivo (detecção de íons positivamente carregados).

As análises foram feitas utilizando-se 0,35 μL das frações com atividade antimicrobiana ou 0,35 μL das amostras contendo os peptídeos sintéticos. Após a evaporação do solvente (H_2O ou $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1) da amostra em temperatura ambiente, foram adicionados 0,35 μL da matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1). E após a evaporação do solvente da matriz (± 20 min), o slide com as amostras em duplicata foram aplicados no equipamento.

Os espectros finais foram obtidos após o acúmulo de 200 espectros simples ou após 5 min de análise, iniciando-se com 34% de energia do laser, e posteriormente calibrados. A calibração do equipamento era realizada com um padrão de peso molecular contendo os peptídeos angiotensina II e P_{14}R (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com massas moleculares monoisotópicas de 1.045,53 e 1.532,86 Da, respectivamente.

A técnica de LC-ESI/MS foi feita em um equipamento LCQ Duo® (Thermo Finningan, EUA) acoplado a um sistema de cromatografia líquida em micro-escala Ultimate (Dionex/LC Packings, Sunnyvale, CA, EUA) com coluna em capilar de vidro empacotadas com resina C18, seguindo métodos desenvolvidos por Assunção (2005). Foi utilizado um gradiente linear de 5 a 80% de $\text{ACN}/\text{ácido fórmico}$ 0,1% durante 30 min sob fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras, ressuspendidas e aplicadas em 10 μL de $\text{H}_2\text{O}/\text{ácido fórmico}$

0,1%, foram analisadas com o equipamento operando em modo positivo e previamente calibrado com cafeína (m/z 192,5), acetato de L-MRFA (m/z 524,3) e Ultramark (m/z 1022, 1122, 1222, 1322, 1422, 1522, 1622, 1722, 1822 e 1922). Os espectros foram coletados e analisados no software Xcalibur 2.0 (Thermo Electron, EUA). A deconvolução dos valores de m/z para a obtenção das massas moleculares dos peptídeos foi realizada no software MagTran 1.02 (ZHANG e MARSHALL, 1998) ou MassAnalyzer 1.03 (Amgen, Thousand Oaks, CA, EUA).

3.4.2 Redução e Alquilação

A presença de pontes de dissulfeto nos peptídeos purificados da hemolinfa pode ser avaliada pela redução e alquilação dos resíduos de Cys presentes nas moléculas.

Uma alíquota de 8 μL do peptídeo foi dissolvida em 20 μL de NH_4HCO_3 0,4 M contendo ureia 8 M. A essa solução adicionou-se 5 μL de ditioneitol (DTT) 45 mM e a amostra foi mantida a 50 °C durante 15 min. Após seu resfriamento em temperatura ambiente, foram adicionados 5 μL de iodoacetamida 100 mM e a solução foi incubada por 15 min em temperatura ambiente protegida da luz. O produto foi concentrado em centrífuga a vácuo, dessalinizado em colunas Zip Tip® C18 (em 3.4.3.1, § 4) e analisado por MALDI-ToF/MS (modificado de STONE e WILLIAMS, 1996).

3.4.3 Sequenciamento dos Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos purificados da hemolinfa dos opiliões foram clivados com diferentes enzimas digestivas para facilitar o sequenciamento “de novo”, visto que os fragmentos da digestão produzem espectros de fragmentação mais simples quando comparados aos da cadeia peptídica completa. Além de espectros mais simples, a clivagem enzimática fornece informações sobre os resíduos de aminoácidos presentes nas moléculas que são especificamente reconhecidos pela enzima.

Para a elucidação completa da estrutura primária de um dos peptídeos purificados foram necessários a obtenção de espectros de fragmentação (MS/MS) da cadeia polipeptídica completa, a modificação química dos resíduos de Lys (lisina) e também o sequenciamento parcial da região N-terminal por degradação de Edman (ver 3.5).

3.4.3.1 Digestão Enzimática

Foram utilizadas para a digestão dos peptídeos as enzimas tripsina bovina T 1426 (Sigma-Aldrich) e endoprotease Glu-C V8 P6181 (Sigma-Aldrich) que clivam, respectivamente, na região C-terminal de Lys ou Arg e Glu ou Asp.

Na digestão enzimática com endoprotease Glu-C V8 (Sigma-Aldrich), uma alíquota de 8 µL da amostra foi seca e ressuspensa em 100 µL de NH₄HCO₃ 100 mM (pH 7,8) e adicionado 50 ng da enzima. Em tampão de bicarbonato de amônio pH 7,8 a enzima cliva preferencialmente as ligações peptídicas com resíduos de Glu. Essa solução foi incubada por 8 ou 18 horas a 37 °C e, após esse período, adicionado 100 µL de TFA 0,1% com o intuito de diminuir a atividade enzimática.

Para o tratamento enzimático com tripsina, uma alíquota de 8 µL da amostra foi seca e ressuspensa em 160 µL de NH₄HCO₃ 80 mM contendo ureia 1,5 M (pH 7,5) e adicionado 100 ng da enzima. A solução foi incubada por 18 horas a 37 °C e, após esse período, adicionado 160 µL de TFA 0,1% com o intuito de baixar a atividade enzimática.

Na digestão enzimática com endoprotease Glu-C e tripsina, o peptídeo foi inicialmente tratado com a primeira enzima, os produtos dessalinizados em colunas Zip Tip® C18 e digeridos posteriormente com tripsina seguindo as metodologias acima descritas.

Após a clivagem enzimática, as amostras foram secas, ressuspensas em 40 µL de TFA 0,05% e aplicadas em colunas Zip Tip® C18 (Applied Biosystems) para a dessalinização antes de serem submetidas a análises por espectrometria de massas. A coluna foi previamente lavada com 10 µL de ACN 100% (3X) e equilibrada com TFA 0,05% (10X) antes da adsorção das

moléculas na resina pela passagem de 10 μL da amostra por 10 vezes na coluna. As moléculas adsorvidas foram lavadas com 10 μL de TFA 0,05% (10X) e eluídas em 10 μL de ACN/ H_2O 1:1.

3.4.3.2 Acetilação dos Peptídeos

A diferenciação entre os resíduos de Lys (128,09 Da) e Gln (128,06 Da) através do sequenciamento “de novo” é possível somente em equipamentos de espectrometria de massas com alto poder de resolução devido à pequena diferença de massas entre esse dois resíduos, $\Delta_m = 0,036$ Da (STANDING, 2003). Portanto, optou-se por diferenciar esses dois resíduos através da modificação química de Lys através do protocolo de acetilação proposto por Samgina et al. (2010): uma alíquota de 5 μL da fração contendo o peptídeo foi seca, ressuspendida em 20 μL de NH_4HCO_3 50 mM e adicionado 50 μL de uma solução de anidrido acético/metanol (1:3 v/v). A mistura foi incubada por uma hora a temperatura ambiente, seca em centrífuga a vácuo.

O peptídeo acetilado foi então submetido a digestão enzimática com endoprotease Glu-C (em 3.4.3.1, § 2) e os produtos de digestão, analisados por espectrometria de massas do tipo LC-Q-ToF-MS/MS.

3.4.3.3 Sequenciamento “de novo”

A estrutura primária dos peptídeos presentes nas frações com atividade antimicrobiana foi determinada por meio da técnica de sequenciamento “de novo” (CANTÚ et al., 2008; SEIDLER et al., 2010) dos seus espectros de fragmentação obtidos por ESI-Q-ToF/MS (*electrospray ionization-quadrupole-time of flight/mass spectrometry*) em um equipamento Q-ToF Micro™ ou Q-ToF Ultima™ API (Micromass, UK) acoplado a uma fonte de cromatografia líquida em nanoescala nanoACQUITY UltraPerformance LC® (Waters).

Os produtos da digestão enzimática dos peptídeos (ver 3.4.3.1) foram ressuspendidos em 20 μL em ACN/ H_2O 1:1 com ácido fórmico 0,1% e submetidos a análise por infusão direta sob fluxo de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ em uma

seringa de 50 μL (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão (E_{col}) contra gás inerte (argônio) para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados no sequenciamento. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após 1,5 min de aquisição.

Os espectros de fragmentação dos produtos de acetilação (ver 3.4.3.2) e dos peptídeos não digeridos, ressuspendidos em 10 μL de H_2O /ácido fórmico 0,1%, foram analisados por LC-Q-ToF-MS/MS. Um volume de 4,5 μL da amostra foi carregado automaticamente em uma coluna capilar com resina C18 nanoACQUITY (Waters) HSS T3 (1.8 μm , 150 μm x 100 mm) e as moléculas eluídas em um gradiente linear de 5 a 80% de ACN em ácido fórmico 0,1% durante 20 min. As E_{col} utilizadas em cada tipo de análise foram baseadas no trabalho de Mouls et al. (2007).

Os espectros de dissociação induzida por colisão (DIC) contra moléculas de gás inerte (Ar) foram deconvoluídos com a ferramenta MaxEnt3 (disponível no software MaxLynx 4.1) para que os íons com mais de uma carga fossem convertidos em monocarregados. A interpretação desses espectros processados foi realizada com a ajuda do tutorial disponível em: <http://www.ionsource.com>. O assinalamento dos valores de m/z correspondentes às séries $-y$ e $-b$ foi feita com o auxílio o aplicativo “Peptide Sequencing” (MassLynx 4.1-Waters). Para se confirmar o sequenciamento dos peptídeos foi feita uma comparação entre os espectros de fragmentação normalizados das moléculas nativas e sintéticas utilizando-se o software mMass 3.9 (STROHALM et al., 2010).

3.5 Sequenciamento N-terminal

O peptídeo antimicrobiano purificado foi submetido a degradação de Edman em um sequenciador automático de pulso líquido PE 491 (Applied Biosystems), utilizando instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado com 5 μL da fração que apresentou atividade antimicrobiana obtida após a segunda etapa de CLAE (em 3.2.1, § 3).

3.6 Busca em Bancos de Dados e Alinhamento

O peptídeo sequenciado foi submetido a buscas por similaridades com outras proteínas em bancos de dados públicos utilizando-se o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com a ferramenta *protein blast* e o algoritmo PSI-BLAST e em banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

O alinhamento do peptídeo com as proteínas similares resultantes da busca em bancos de dados foi realizado com o programa ClustalX.

3.7 Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

3.7.1 Materiais e Reagentes

A resina Fmoc-Phe-2-cloro-tritil, os Fmoc-aminoácidos (Ser, Tyr e Glu com grupo tert-butil e Lys com grupo Boc na proteção das cadeias laterais) e o sal utilizado no acoplamento dos resíduos O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio-tetrafluoroborato (TBTU) foram adquiridos da Novabiochem Inc. (Darmstadt, Alemanha).

Ácido trifluoracético (TFA), 1,2-etaneditiol (EDT), 1,8-diazacyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU), tioanisol e N-metilmorfolina (NMF) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Morfolina e éter metílico foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O solvente dimetilformamida (DMF) foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil) e fenol da Merck.

3.7.2 Acoplamento dos Resíduos e Desproteção do Grupo Fmoc

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) do peptídeo antimicrobiano foi realizada manualmente adotando-se procedimentos da tecnologia Fmoc (AMBLARD et al., 2006), cujo grupo protetor da parte N-terminal de cada aminoácido é o 9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). Foi

utilizada na SPFS 50 mg da resina Fmoc-Phe-2-cloro-tritil, com grau de substituição 0,43 mmol/g.

A desproteção dos resíduos foi feita com DMF/morfolina 1:1 (2 × 20 min) ou DMF/DBU 98:2 (2 × 7 min) a partir da Val₁₀, visto os longos tempos de desproteção já descritos na desproteção do grupo Fmoc desse resíduo em algumas sequências (KENT, 1988; TICKLER; BARROW; WADE, 2001). Cada etapa de acoplamento foi realizada com o Fmoc-aminoácido (com 5 vezes de excesso) em 460 µL de DMF/NMF (67:13) e 40 mg de TBTU durante 2 horas e agitando a mistura a cada 15 min. Entre os passos de desproteção e acoplamento, a resina foi lavada (5 × 1 min) com 1 mL de DMF. Cada etapa da síntese química foi verificada por teste de ninidrina ou por MALDI-ToF/MS retirando-se uma pequena amostra da resina (aproximadamente 5 grãos).

As cadeias peptídicas onde a etapa de acoplamento não foi verificada na análise por espectrometria de massas foram bloqueadas por meio da acetilação da região N-terminal, adicionando-se 1 mL de uma solução anidrido acético/NMF/DMF (10:20:70) por 20 min seguida de uma etapa de lavagem com DMF (5 × 1 min).

Na análise por MALDI-ToF/MS, as cadeias polipeptídicas foram clivadas da resina com TFA por 5 min e a solução foi seca com N₂ antes de ser analisada no equipamento (ver 3.4.1).

3.7.3 Desproteção e Clivagem

A proteção das cadeias laterais dos resíduos e a clivagem dos produtos finais de síntese da resina foram realizadas por 12 horas em 1 mL de uma solução TFA/fenol/H₂O/tioanisol/EDT 82,5:5:5:5:2,5 v/v. A solução foi filtrada e a resina lavada com 1 mL de TFA (2 X) antes da concentração com jato de N₂ a baixa pressão. O produto da síntese foi precipitado, adicionando-se 10 mL de éter metílico e resfriado em gelo por 10 min antes de ser centrifugado a 2.500 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o material bruto submetido a purificação por CLAE (ver 3.6.4).

3.7.4 Purificação do Peptídeo Sintético

O material bruto da síntese precipitado em éter metílico foi ressuspendido em 1 mL de DMF e submetido a CLAE com uma coluna preparativa Shim-pak PREP-ODS (5 μ m, 20 mm \times 250 mm, Shimadzu) sob um fluxo de 8 mL/min em um equipamento com bombas LC8 (Shimadzu). Foi utilizado um gradiente linear de 5 a 80% de ACN/TFA 0,1% em H₂O/TFA 0,1% durante 60 min e a absorvância monitorada a um λ = 214 nm para a coleta manual dos picos. As frações coletadas foram analisadas por MALDI-ToF/MS para se verificar qual continha o peptídeo de interesse e liofilizadas para a obtenção do material seco.

3.7.5 Avaliação do Grau de Pureza

O produto da síntese química (20 μ g) contendo o peptídeo, obtido da purificação do material bruto (em 3.7.4), foi submetido a CLAE utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa Shim-pak VP-ODS (5 μ M, 4,6 mm \times 250 mm, Shimadzu) sob um fluxo de 1 mL/min em um equipamento UFLC Prominence (Shimadzu). Foi utilizado um gradiente linear de 15 a 40% de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 28 min e a absorvância monitorada a λ = 225 nm para a coleta manual dos picos. As frações foram coletadas e analisadas por ESI/MS para verificar qual continha o peptídeo de interesse.

O grau de pureza da amostra foi estabelecido pela relação entre a área do pico contendo o material de interesse e a soma das áreas de todos os picos do cromatograma. As áreas foram calculadas com o auxílio do software LC Solutions (Shimadzu), que acompanha o equipamento, com a linha de base acertada em 0 (zero) mAbs.

3.7.6 Cálculo da Concentração do Peptídeo Sintético

A concentração do peptídeo sintético em solução foi, inicialmente, baseada na massa do material medida em uma balança analítica APX-200

(Denver Instruments, Bohemia, NY, EUA) e, posteriormente, corrigida pela lei de Lambert-Beer (NELSON; LEHNINGER; COX, 2000):

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (2)$$

onde **A** é a Abs em $\lambda = 280$ nm; ε é o coeficiente de extinção molar em $\lambda = 280$ nm; **l** o espaço óptico percorrido pela luz e **c** a concentração da molécula.

A absorvância da amostra foi medida num espectrofotômetro NanoVue (GE Helthcare) com espaço óptico de 0,5 mm. O coeficiente de extinção molar do peptídeo foi calculado segundo fórmula proposta por Pace et al. (1995):

$$\varepsilon = N(\text{Trp}) \times \text{Ext}(\text{Trp}) + N(\text{Tyr}) \times \text{Ext}(\text{Tyr}) + N(\text{Cistina}) \times \text{Ext}(\text{Cistina}) \quad (3)$$

onde ε é o coeficiente de extinção molar em $\lambda = 280$ nm; **N** é o número de resíduos; **Ext** é o coeficiente de extinção molar dos resíduos que possuem absorvância a 280 nm [$\text{Ext}(\text{Trp}) = 5.500$; $\text{Ext}(\text{Tyr}) = 1.490$; $\text{Ext}(\text{Cistina}) = 125$].

3.8 Preparação de Vesículas Unilamelares Grandes

As vesículas unilamelares grandes (LUVs, *large unillamellar vesicles*) ou lipossomas, foram preparadas com diferentes proporções dos fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (POPG) (Avanti Polar Lipds, Alabaster, AL, EUA). A parte polar de POPC é zwitteriônica, enquanto a parte polar em POPG é negativamente carregada (figura 5).

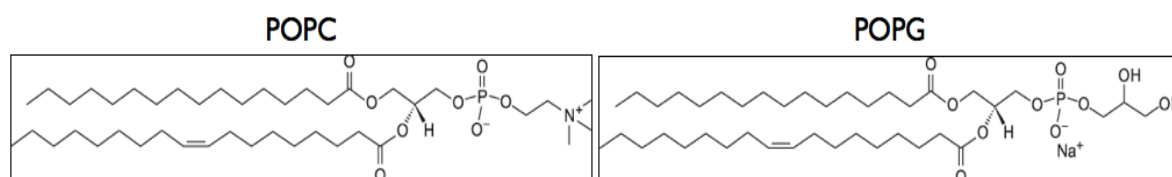


Figura 5- Estrutura dos fosfolipídios utilizados para a preparação das vesículas artificiais. Em POPC a região polar é zwitteriônica e em POPG a parte polar é aniônica.

Os fosfolipídios foram pesados em tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) e dissolvidos em 300 μ L de uma solução clorofórmio/metanol ($\text{HCCl}_3/\text{MeOH}$) 2:1. A solução foi seca sob jato de N_2 a baixa pressão de modo que os fosfolipídios ficassem aderidos à parede interna do tubo e o material mantido “overnight” sob vácuo dentro de uma campânula. Os fosfolipídios foram então ressuspensos, sob forte agitação, em solução de diferentes concentrações (1, 10, 50, 80 e 200 mM) de NaCl e submetidos a 5 ciclos de choques térmicos entre nitrogênio líquido e banho a 40 °C. O material foi então aplicado em um extrusor (Avestin, Ottawa, Canada) contendo duas membranas de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro (Whatman, UK) e extruído 20 vezes (HOPE et al., 1985)

As vesículas extruídas em solução de carboxifluoresceína (CF; Sigma Aldrich) 80 mM utilizadas para no ensaio de permeabilidade (ver 2.10) foram submetidas a filtração em uma coluna, montada manualmente com resina Sephadex® G-75 (Sigma Aldrich) e previamente equilibrada em NaCl 80 mM ou NaCl 10 mM/sacarose 140 mM. As vesículas foram filtradas com uma dessas duas soluções com o intuito de eliminar parte da carboxifluoresceína não aprisionada no interior dos lipossomas e de modificar a força iônica do meio.

3.9 Ensaios de Ligação do Peptídeo a Vesículas

O peptídeo sintético foi incubado durante 30 min a temperatura ambiente com LUVs constituídas por POPC ou POPG na razão peptídeo/lipídio (*P/L*) 1:50 (mol:mol) em volume final de 300 μ L de NaCl 10 mM. As soluções foram colocadas na parte superior de filtros com poros de limite de peso molecular de 100 kDa Amicon Ultra-0,5 mL com membrana Ultracell-100 (Millipore, Billerica, MA, EUA) e filtradas por centrifugação a 4.000 x g durante 10 min. Uma solução contendo somente o peptídeo 20 μ M foi filtrada para ser utilizada como controle negativo de ligação às vesículas. Esses ensaios foram feitos em duplicata.

A detecção do peptídeo na solução filtrada foi avaliada por espectroscopia de fluorescência do estado estacionário em comprimento de

onda de 275 nm para excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$) e 302 nm para emissão ($\lambda_{\text{em}} = 302 \text{ nm}$); possibilitada pela propriedade intrínseca de fluorescência dos resíduos de Tyr presentes na sequência. As medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro SLM Aminco 4800C (Jovin Yvon Horiba, Tóquio, Japão).

Foi realizada a titulação do peptídeo sintético a 20 μM em NaCl 10 mM utilizando-se concentrações crescentes de vesículas formadas por diferentes proporções de POPC e POPG, monitorando-se a fluorescência da molécula ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}} = 302 \text{ nm}$). A concentração do peptídeo utilizada foi determinada pela concentração mínima da molécula a apresentar uma intensidade de fluorescência suficiente para a molécula ser detectada com o intuito de economizar material para os demais ensaios.

As vesículas foram sendo adicionadas à solução contendo o peptídeo a partir de uma solução estoque à concentração de 2, 4, 8 ou 30 mM de lipídios dependendo da relação P/L pretendida. Foram adquiridos os valores de fluorescência nas relações 1:0, 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 de P/L (mol:mol). Os valores foram expressos pela relação F/FO , onde F e FO são valores arbitrários de fluorescência na ausência e na presença de vesículas, respectivamente. A equação obtida da curva exponencial de ajuste dos pontos foi utilizada para a determinação da constante de ligação aparente (K_b) peptídeo-membrana (HUACHACA, 2007). A K_b é o inverso da concentração de lipídios correspondente ao ponto médio entre F/FO_{inicial} e $F/FO_{\text{máx}}$.

Para verificar a influência da força iônica do meio na ligação peptídeo a membranas, medidas de fluorescência da molécula foram adquiridas em concentrações crescentes de vesículas compostas por POPG:POPC 1:1 em soluções 20 μM do peptídeo com quatro diferentes concentrações de NaCl: 1, 10, 50 e 200 mM.

3.10 Ensaio de Permeabilidade das Vesículas

As vesículas carregadas com carboxifluoresceína 80 mM em NaCl 80 mM ou NaCl 10 mM/sacarose 140 mM (em 3.8, § 3) num volume de 160 μL foram utilizadas num ensaio para se verificar a capacidade do peptídeo sintético de alterar a permeabilidade da bicamada fosfolipídica. Elas foram

monitoradas por fluorescência durante 50 min nos comprimentos de onda de excitação e emissão da carboxifluoresceína (CF): $\lambda_{em} = 474$ nm e $\lambda_{ex} = 518$ nm. Durante esse período de monitoramento, em aproximadamente 200 s adicionou-se 40 μ L da solução do peptídeo em NaCl 80 mM ou NaCl 10 mM/sacarose 140 mM aos 160 μ L da solução de vesículas. Em 42 min foi adicionado Triton X-100 a uma concentração final de 0,1% (v/v). com o intuito de se obter a máxima intensidade de fluorescência para a normalização entre 0 e 1 dos valores obtidos. Como controle positivo foi utilizada melitina, um potente peptídeo antimicrobiano isolado do veneno de abelha formador de poros em membranas miméticas (LEE et al., 2008; YANG et al., 2001), a uma concentração de 20 μ M. Como controle negativo, 40 μ L de NaCl 80mM ou NaCl 10 mM/sacarose 140 mM foram adicionados à solução de vesículas no tempo 200 s.

A proximidade das moléculas de CF numa solução 80 mM dentro das vesículas artificiais faz com que elas atuem como supressoras de fluorescência. A alteração da permeabilidade da bicamada fosfolipídica pode provocar o extravasamento dessas moléculas para o meio externo, abaixando sua concentração e, conseqüentemente, aumentando a fluorescência da solução pela diminuição do efeito supressor.

3.11 Supressão da Fluorescência do Peptídeo

A fluorescência do peptídeo (20 μ M) foi adquirida em solução 10 mM de NaCl a concentrações crescentes de acrilamida – molécula supressora de fluorescência – na ausência e na presença de LUVs formadas por POPG ou POPG:POPC 1:1 na concentração de 1 mM de fosfolipídios (razão molar *P/L* de 1:50). A acrilamida foi adicionada nesse ensaio a partir de uma solução estoque com concentração 3 M.

A adição de uma molécula supressora de fluorescência na solução contendo um fluoróforo pode ser quantitativamente analisada pela equação de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006):

$$F0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4)$$

onde $F0/F$ é a relação entre a fluorescência da molécula (fluoróforo) na ausência ($F0$) e na presença (F) do supressor; K_{SV} é a constante de Stern-Volmer; $[Q]$ é a concentração da molécula supressora de fluorescência.

Nota-se que a equação descreve uma reta na qual a inclinação é dada pela constante (K_{SV}), e os valores de abscissas e ordenadas são dados por $[Q]$ e $F0/F$, respectivamente. Portanto, quanto maior a inclinação da reta maior será o valor de K_{SV} e, como o valor de F encontra-se no denominador, maior também será o efeito de supressão de fluorescência.

3.12 Espectroscopia de Infravermelho

As estruturas secundárias do peptídeo sintético em solução ou na presença de vesículas multilamelares (MLVs – *multilamellar vesicles*) foram analisadas por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier em um equipamento Nicolet Nexus 6700 (Thermo).

O sistema mimético de vesículas multilamelares foi formado pela evaporação do solvente ($\text{HCCl}_3/\text{MeOH}$ 2:1) contendo os fosfolipídios dissolvidos na proporção desejada. O peptídeo sintético (0,6 mg) foi ressuspenso em 70 μL água deuterada (D_2O) com NaCl 10 mM a uma relação final de 1:20 (mol:mol) P/L e adicionado ao filme de fosfolipídios. Para a obtenção dos espectros foram colocados 20 μL da amostra em pastilhas de CaF_2 com espaçadores de teflon de 75 μm . A troca de deutério-hidrogênio completa do peptídeo foi verificada pela diminuição do pico na frequência 1.550 cm^{-1} (BLOUT; DE LOZE; ASADOURIAN, 1961). O equipamento foi purgado com N_2 seco durante 1 hora antes da aquisição dos dados para eliminar o vapor d'água e a temperatura da célula mantida em 25 °C.

Os espectros finais foram obtidos pela média de 100 espectros individuais com resolução de 2 cm^{-1} e subtraídos na região amida I' (1700 – 1600 cm^{-1}) do espectro obtido do tampão (10 mM NaCl em D_2O) a fim de

eliminar sua contribuição. A composição de bandas foi determinada pela deconvolução de Fourier e assinaladas no espectros originais (não deconvoluídos) para o ajuste da contribuição de cada uma delas.

A deconvolução de Fourier dos espectros sem a contribuição do solvente foi realizada no software fornecido com o equipamento (Omic 5.1 Software) com valores de 18 cm^{-1} para largura de bandas e fator $k = 2$ para estreitamento de linha.

A linha de base nos espectros originais foi previamente ajustada entre os valores de 1.690 e 1.600 cm^{-1} . O ajuste das bandas nesses espectros por distribuição gaussiana foi realizado pelos mesmos procedimentos descritos por Arrondo e Goði (1999) com auxílio do programa PeakFit 4.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA), exceto pelo fato de que foi permitido aos parâmetros de altura, largura e posição da banda variarem, nessa ordem, um de cada vez (DECCA et al., 2007), até que os ajustes atingissem um valor de coeficiente de regressão linear (r^2) $\geq 0,995$. Se ainda assim $r^2 < 0,998$, um último passo de ajuste permitindo a variação simultânea da altura e largura das bandas para obtenção do $r^2_{\text{final}} \geq 0,998$.

As estruturas secundárias das moléculas em α -hélice, folha- β , volta- β e desordenada foram assinaladas de acordo com resultados publicados por Byler e Susi (1986). A porcentagem de cada estrutura foi obtida pela relação entre a área de cada banda ajustada e a soma da área de todas as bandas do espectro.

4 RESULTADOS

4.1 Frações Ativas da Hemolinfa

Os peptídeos antimicrobianos presentes nos hemócitos e no plasma de 1,5 mL de hemolinfa de opiliões não desafiados foram analisados separadamente. Após o fracionamento do material dos dois constituintes da hemolinfa em duas etapas de CLAE (ver 3.2.1 e 3.2.2), foi verificada a existência de frações com atividade anti-*M. luteus*, capaz de inibir o crescimento do microorganismo, compostas por peptídeos de diferentes massas moleculares.

4.1.1 Peptídeos dos Hemócitos

As moléculas presentes no extrato ácido dos hemócitos foram submetidas inicialmente a extração em fase sólida utilizando-se coluna C18 Sep-Pak®. Duas das frações obtidas, eluídas a 40 e 80% de ACN, foram então submetidas a CLAE utilizando-se uma coluna semipreparativa (ver 3.2.1). As frações obtidas nas cromatografias foram coletadas manualmente e avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus* A270. Nenhuma fração obtida após a CLAE do material eluído a 80% de ACN da coluna Sep-Pak® apresentou atividade antimicrobiana.

Foi possível fracionar o material eluído a 40% de ACN da coluna Sep-Pak® após a primeira etapa de CLAE em um gradiente linear de 2 a 60% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 120 min (figura 6). Detectou-se atividade anti-*M. luteus* (capaz de inibir o crescimento do microorganismo) na fração eluída em 40 min a aproximadamente 18% de ACN: **ALH40%-20** (figura 6). A fração foi nomeada em alusão à espécie de opilião (*Acutisoma longipes* ⇒ **AL**), o componente da hemolinfa do qual foi obtida (hemócitos Sep-Pak 40% ⇒ **H40%**) e o número do pico coletado do cromatograma.

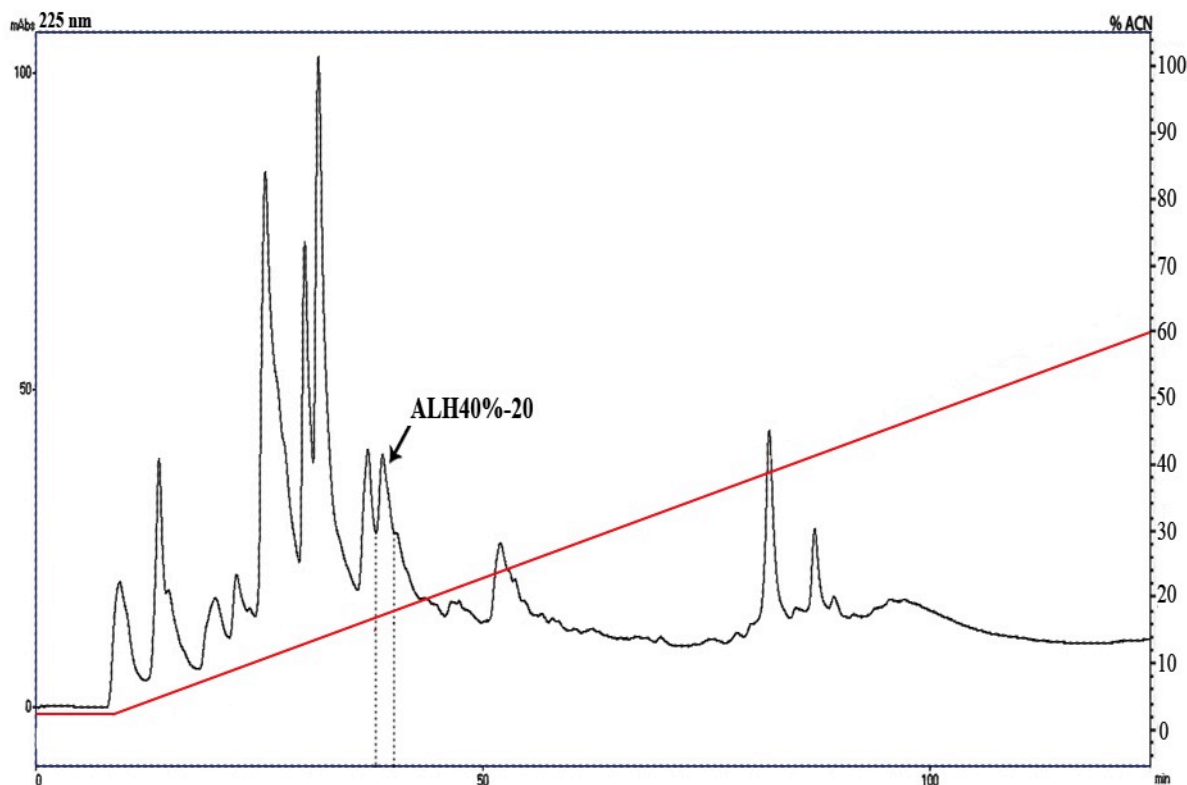


Figura 6- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE do extrato ácido de hemócitos eluído em 40% de ACN da coluna Sep-Pak®. Foi utilizada uma coluna Vydac C18 semipreparativa (250 mm × 10 mm) com um gradiente linear de 2 a 60% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 120 min sob fluxo de 1,5 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e os picos coletados manualmente. A seta indica a fração (**ALH40%-20**) que apresentou atividade antimicrobiana (anti-*M. luteus*).

Com o intuito de purificar a molécula com atividade antimicrobiana, a fração **ALH40%-20** foi submetida a uma segunda etapa de CLAE utilizando-se uma coluna analítica sob um gradiente linear otimizado de 11 a 21% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min (figura 7A) a um fluxo de 1 mL/min. O cromatograma mostrou a presença de diversos picos, evidenciando uma composição complexa de moléculas e a impureza da fração **ALH40%-20**.

Todos os picos foram coletados manualmente e as frações obtidas, utilizadas para o ensaio de atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus*. Duas frações (**ALH40%-20_6** e **ALH40%-20_8**) eluídas em 21 e 24 min a 12,8 e 13,4% de ACN, respectivamente, apresentaram atividade capaz de inibir o crescimento bacteriano (figura 7A).

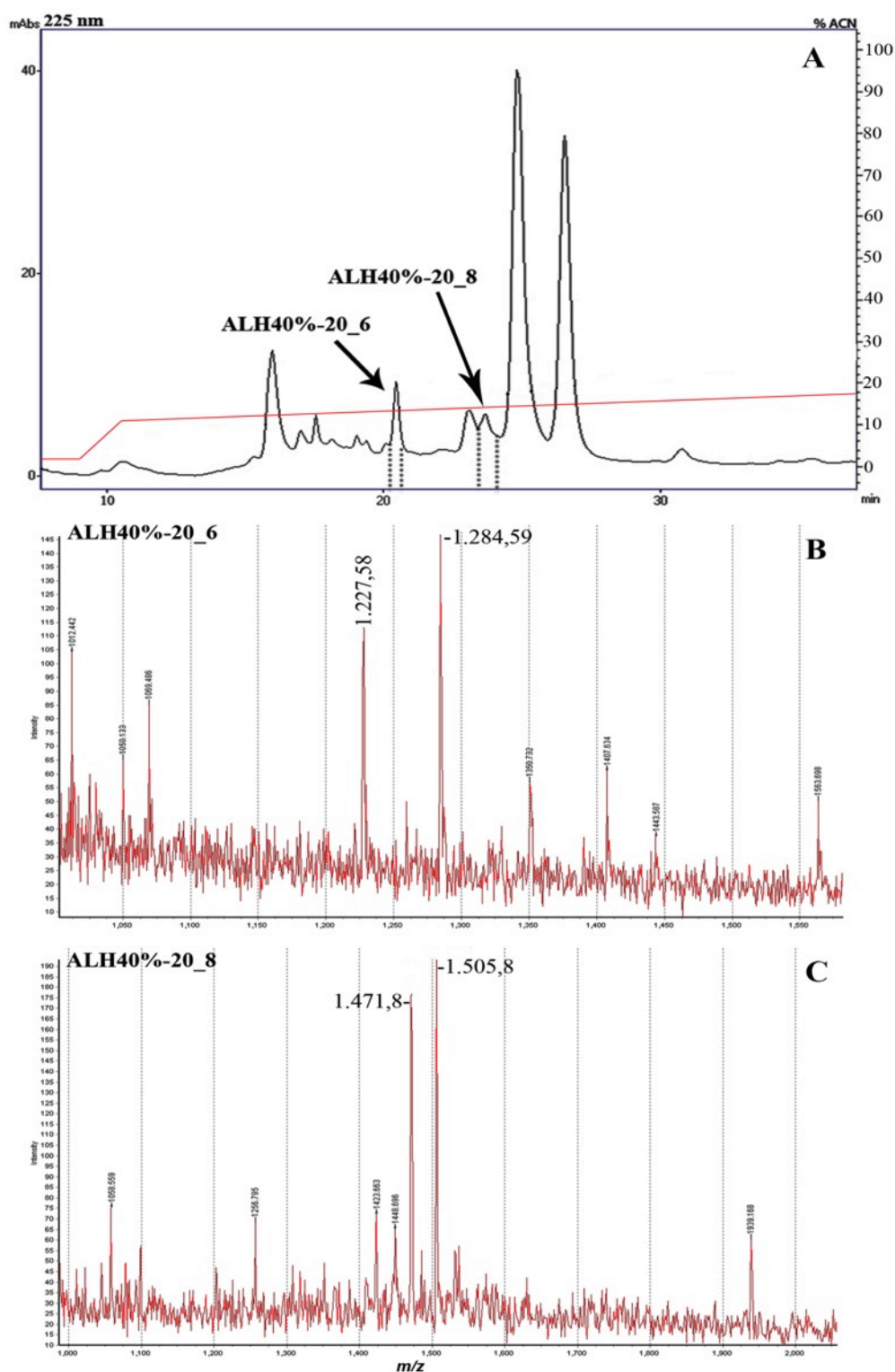


Figura 7- Cromatograma da segunda etapa de purificação por CLAE da fração ALH40%-20 (A) e espectros de massas (B e C) das frações ativas obtidas. A fração com atividade anti-*M. luteus* ALH40%-20 (figura 6) obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE do extrato ácido de hemócitos foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 11 a 21% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e os picos coletados manualmente. As setas indicam as frações (ALH40%-20_6 e ALH40%-20_8) que apresentaram atividade anti-*M. luteus*. Os espectros de massas das frações ativas ALH40%-20_6 (B) e ALH40%-20_8 (C), obtidos por MALDI-ToF, apresentaram diversos valores de *m/z*, evidenciando a presença de muitos peptídeos e consequentemente, a impureza das amostra.

As frações ativas foram avaliadas quanto à pureza e valores de massa das moléculas presentes. O espectro de massas da fração **ALH40%-20_6** obtido por MALDI-ToF apresentou oito valores de m/z entre 1.011 e 1.552 (figura 7B), evidenciando a impureza da amostra devido à presença de peptídeos com diferentes massas moleculares e a necessidade de outra etapa de purificação. Dois peptídeos de 1.226,58 e 1.283,59 Da apresentaram valores de m/z mais intensos no espectro, possivelmente devido à maior concentração dessas moléculas na solução.

O espectro de massas da fração **ALH40%-20_8** apresentou sete valores de m/z entre 1.058 e 1.939 (figura 7C), evidenciando a impureza da fração e a necessidade de outro passo de purificação. Dois peptídeos com massas moleculares de 1.470,8 e 1.504,8 Da apresentaram valores de m/z com maior intensidade.

Os valores de m/z diferem em +1 Da dos valores de massa molecular, pois os peptídeos detectados apresentam-se positivamente carregados com um próton (H^+).

4.1.2 Peptídeos do Plasma

As moléculas presentes no extrato do plasma de opiliões, obtido com TFA, foram inicialmente submetidas a extração em fase sólida utilizando-se coluna C18 Sep-Pak®. Duas das frações obtidas, eluídas a 40 e 80% de ACN, foram submetidas a uma primeira etapa de CLAE utilizando-se uma coluna semipreparativa (ver 3.2.2). As frações obtidas nas cromatografias foram coletadas manualmente e avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus* A270.

O material eluído a 80% de ACN da coluna Sep-Pak® foi fracionado após a primeira etapa de CLAE em um gradiente linear de 20 a 80% de ACN/TFA 0,046% em H_2O /TFA 0,046% durante 120 min (figura 8). Detectou-se a presença de atividade anti-*M. luteus* (capaz de inibir o crescimento do microorganismo) em sete frações: **ALP80%-1**, **ALP80%-2**, **ALP80%-3**, **ALP80%-5**, **ALP80%-13**, **ALP80%-16** e **ALP80%-25** (figura 8). As frações foram nomeadas em alusão à espécie de opilião (*Acutisoma*

longipes ⇒ **AL**), o componente da hemolinfa do qual foi obtida (plasma Sep-Pak 80% ⇒ **P80%**) e o número do pico coletado durante a cromatografia.

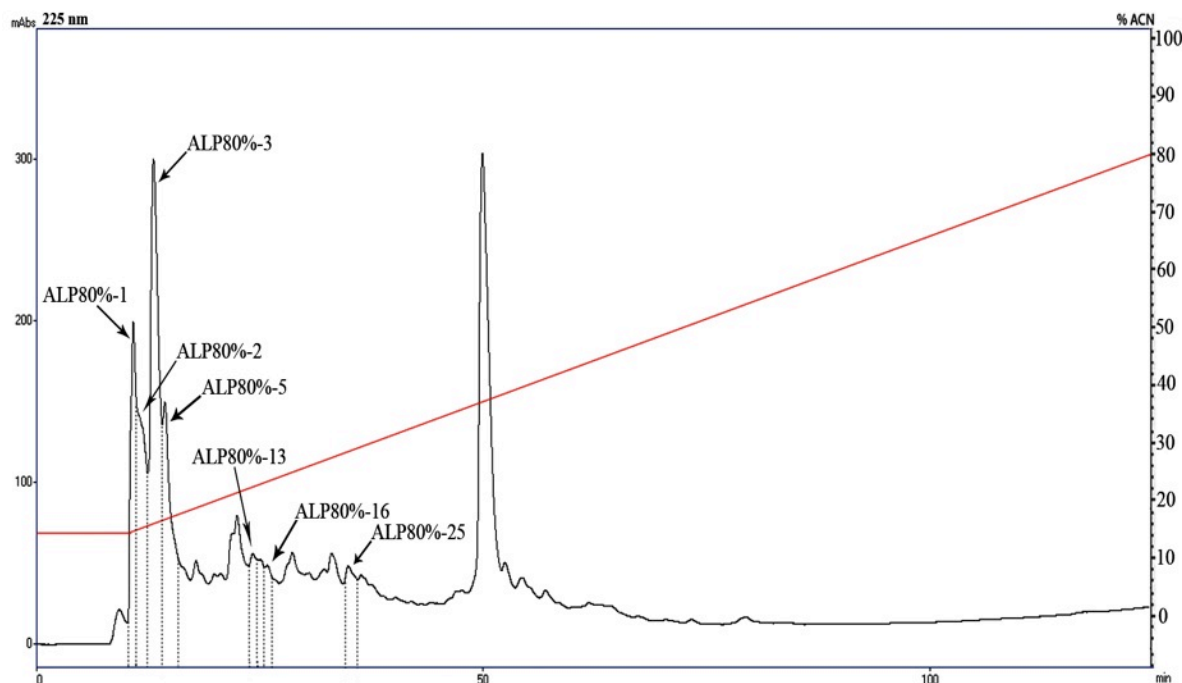


Figura 8- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE dos componentes do plasma de opiliões eluídos em 80% de ACN da coluna Sep-Pak®. Foi utilizada uma coluna Vydac C18 semipreparativa (250 mm × 10 mm) com um gradiente linear de 20 a 80% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 120 min sob fluxo de 1,5 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e os picos coletados manualmente. As setas indicam as frações que apresentaram atividade antimicrobiana (anti-*M. luteus*).

As frações ativas obtidas após a primeira etapa de purificação foram submetidas a outro passo de purificação por CLAE, utilizando-se uma coluna analítica sob gradientes lineares otimizados de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min a um fluxo de 1 mL/min.

A segunda etapa de CLAE das frações **ALP80%-1**, **ALP80%-2** e **ALP80%-5** (figura 9A, B e C), eluídas, respectivamente, a 23, 23,4 e 24,6% de ACN, evidenciou a existência de diversos picos nos cromatogramas e, conseqüentemente, a impureza das frações. Todos os picos foram coletados manualmente e avaliados quanto à presença de atividade antimicrobiana contra a bactéria *M. luteus*. Foi detectada atividade capaz de inibir o crescimento do microorganismo nas frações **ALP80%-1_12** (figura 9A), **ALP80%-2_6** (figura 9B), **ALP80%-2_7** (figura 7B) e **ALP80%-5_11** (figura 9C), eluídas, respectivamente, a 17,3, 17,6, 17,7 e 19,4% de ACN. Essas

frações ativas foram analisadas por MALDI-ToF/MS para avaliar as massas das moléculas presentes bem como o grau de pureza do material. Todos os espectros apresentaram valores de m/z superiores a 1.000, possivelmente devido à natureza proteica das moléculas presentes nas frações.

O espectro de massas da fração **ALP80%-1_12** (figura 9D), eluída a 17,3% de ACN mostrou a presença de cinco peptídeos com massas moleculares entre 1.766,9 e 2.931,25 Da e, conseqüentemente, a impureza da amostra. O peptídeo de 1.862,9 Da apresentou o valor de m/z com maior intensidade no espectro devido, possivelmente, à sua maior concentração na fração.

O espectro de massas da fração **ALP80%-2_6** (figura 9E), eluída a 17,6% de ACN apresentou valores de m/z referentes a três peptídeos com massas moleculares de 1.569,8, 1.862,8 e 2.121 Da. No espectro da fração **ALP80%-2_7** (figura 9F) foi possível verificar a presença de dois peptídeos com 1.550,9 e 2.125,1 Da.

A fração **ALP80%-5_11**, eluída a 19,5% de ACN apresentou espectro de massas com três valores de m/z mais intensos referentes a peptídeos com massas moleculares de 2.125,06, 2.193,12 e 2.882,03 Da (figura 9G).

Todas as frações ativas obtidas após a segunda etapa de purificação por CLAE do material de plasma de opiliões eluído a 80% de ACN das colunas Sep-Pak® apresentaram-se impuras após análise por espectrometria de massas. Portanto, torna-se necessário outro passo de purificação do material para isolar o peptídeo com atividade antimicrobiana da fração.

Após as frações ativas **ALP80%-3**, **ALP80%-13**, **ALP80%-16** e **ALP80%-25** terem sido submetidas a uma segunda etapa de purificação (dado não apresentado), não foi possível detectar atividade antimicrobiana em nenhuma das frações coletadas de cada cromatografia.

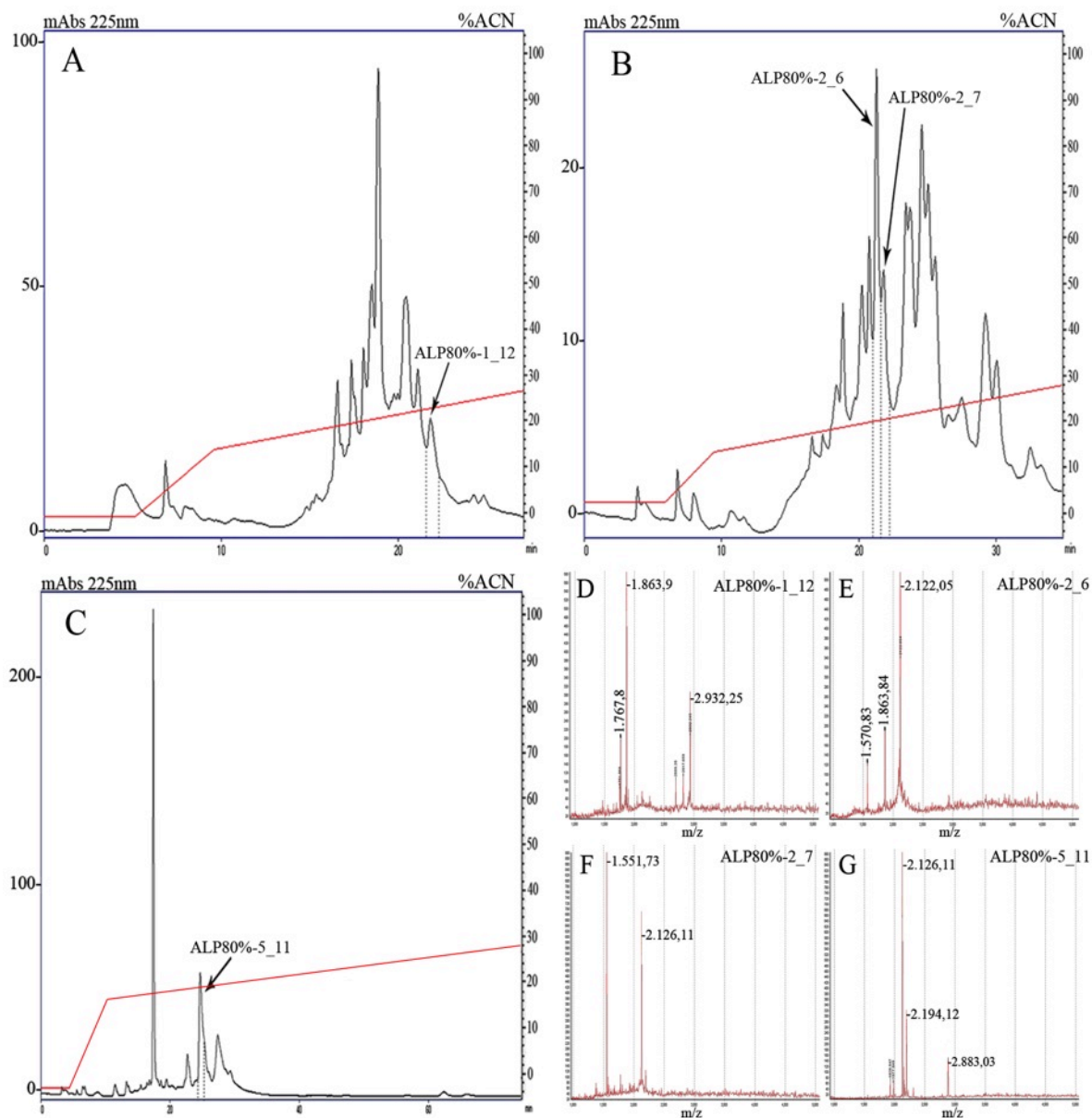


Figura 9- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por CLAE das frações ALP80%-1 (A), ALP80%-2 (B) e ALP80%-5 (C) e espectros de massas (D a G) das frações ativas obtidas. As frações com atividade anti-*M. luteus* obtidas após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 80% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 8) e submetidas a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 16 a 26% (A), 17 a 27% (B) e 18 a 28% (C) de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. As setas indicam as frações coletadas que apresentaram atividade anti-*M. luteus*. Os espectros de massas das frações ativas **ALP80%-1_12 (D)**, **ALP80%-2_6 (E)**, **ALP80%-2_7 (F)** e **ALP80%-5_11 (G)**, obtidos por MALDI-ToF, apresentaram valores de *m/z* referentes a moléculas de natureza proteica e evidenciaram a impureza das amostras.

O material eluído a 40% de ACN da coluna Sep-Pak® foi fracionado em uma primeira etapa de CLAE sob um gradiente linear de 2 a 60% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 120 min (figura 10). O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado com todas as frações

coletadas, e foi observada atividade anti-*M. luteus* em sete delas: **ALP40%-2**, **ALP40%-11**, **ALP40%-37**, **ALP40%-41**, **ALP40%-44**, **ALP40%-46** e **ALP40%-53** (figura 10). As frações foram nomeadas em alusão à espécie de opilião (*Acutisoma longipes* ⇒ **AL**), o componente da hemolinfa do qual foi obtida (plasma Sep-Pak 40% ⇒ **P40%**) e o número do pico coletado durante a cromatografia.

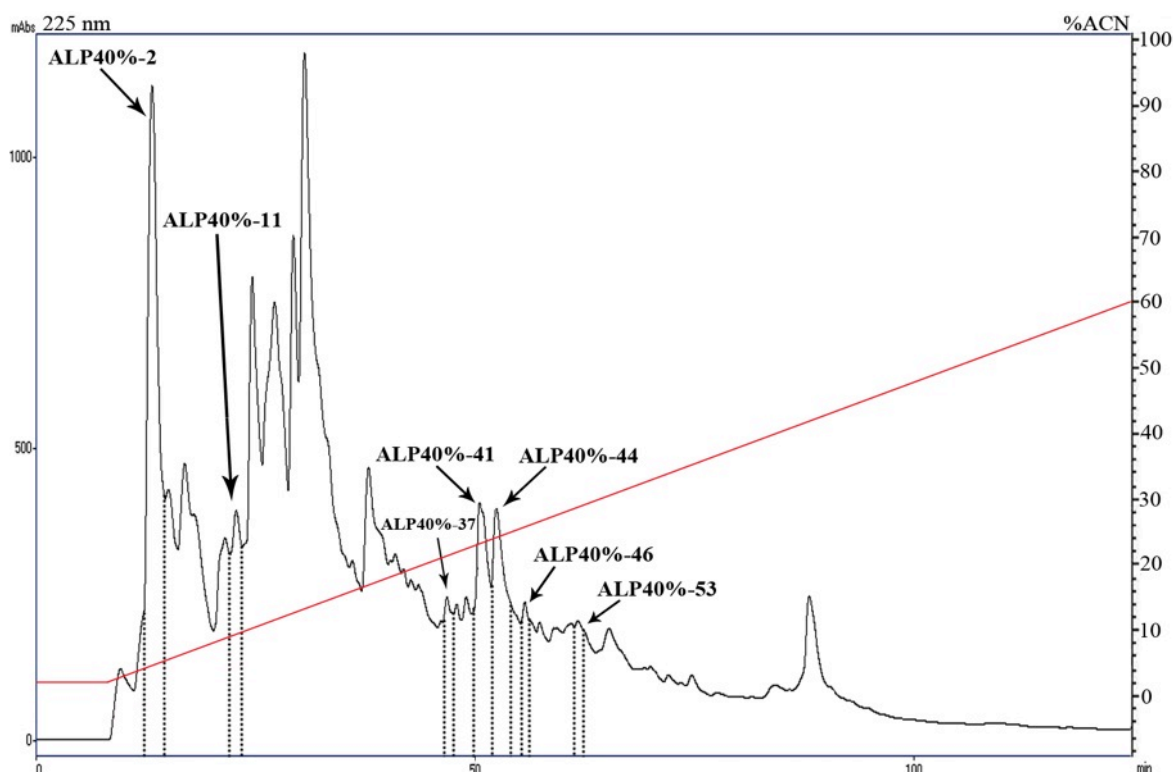


Figura 10- Cromatograma da primeira etapa de purificação por CLAE do plasma de opiliões eluídos em 40% de ACN da coluna Sep-Pak®. Foi utilizada uma coluna Vydac C18 semipreparativa (250 mm × 10 mm) com um gradiente linear de 20 a 80% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 120 min sob fluxo de 1,5 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e os picos coletados manualmente. As setas indicam as frações que apresentaram atividade antimicrobiana (anti-*M. luteus*).

Cada uma das frações ativas foi submetida a uma segunda etapa de purificação por CLAE utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa sob gradientes lineares otimizados de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min a um fluxo de 1 mL/min.

As frações **ALP40%-2**, **ALP40%-11** e **ALP40%-37**, eluídas a 7, 11 e 22% de ACN na primeira etapa de purificação foram submetidas a uma segunda etapa de purificação por CLAE sob gradientes lineares de 0 a 10%, 4 a 14% e 15 a 25%, respectivamente, de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA

0,046%. Os materiais foram fracionados, evidenciando a presença de diferentes moléculas nas amostras, e a presença de atividade anti-*M. luteus* foi detectada nas frações **ALP40%-2_0** (figura 11A), **ALP40%-11_0** (figura 11B) e **ALP40%-37_14** (figura 11C), eluídas a 0, 5 e 17,3% de ACN, após a coleta manual e teste de atividade antimicrobiana dos picos coletados.

O espectro de massas da fração **ALP40%-2_0** indicou a presença de três peptídeos com massas moleculares de 1.572,58, 1.865,37 e 2.124,39 Da (figura 11D). A fração **ALP40%-11_0** apresentou moléculas com massas moleculares inferiores a 1.000 Da, destacando-se as de 727,48 e 966,68 Da (figura 11E). O espectro de MALDI-ToF/MS da fração **ALP40%-37_14** mostrou a presença de peptídeos com massas moleculares de 1.143,49, 1.820,76, 2.214,9 e 2.682,2 (figura 11F). Todas essas frações mostraram-se impuras após a segunda etapa de CLAE por fase reversa, sendo necessária uma outra etapa de purificação para o isolamento das moléculas ativas.

Após a segunda etapa de purificação por CLAE da fração **ALP40%41**, eluída a 24% de ACN na primeira etapa, foi possível fracionar o material e detectar atividade anti-*M. luteus* apenas na fração **ALP40%-41_12**, eluída com 19,1% de ACN (figura 12A). O espectro de MALDI-ToF/MS dessa fração apresentou dois peptídeos com massas moleculares de 2.212,58 e 2.341,88 Da (figura 12A inserida).

A análise dessa fração por LC-ESI/MS também confirmou a presença desses dois peptídeos em espectros obtidos a partir da combinação de espectros individuais do cromatograma total de íons (CTI) do intervalo 19-21,9 min (figura 12B).

Os valores de m/z dos diferentes estados de ionização estão relacionados ao número de cargas presentes numa molécula e, dessa maneira, podem ser deconvoluídos no valor de sua massa molecular, já que o aparelho detecta a relação entre massa e carga (m/z) e a ionização por *electrospray* confere múltiplas cargas às moléculas.

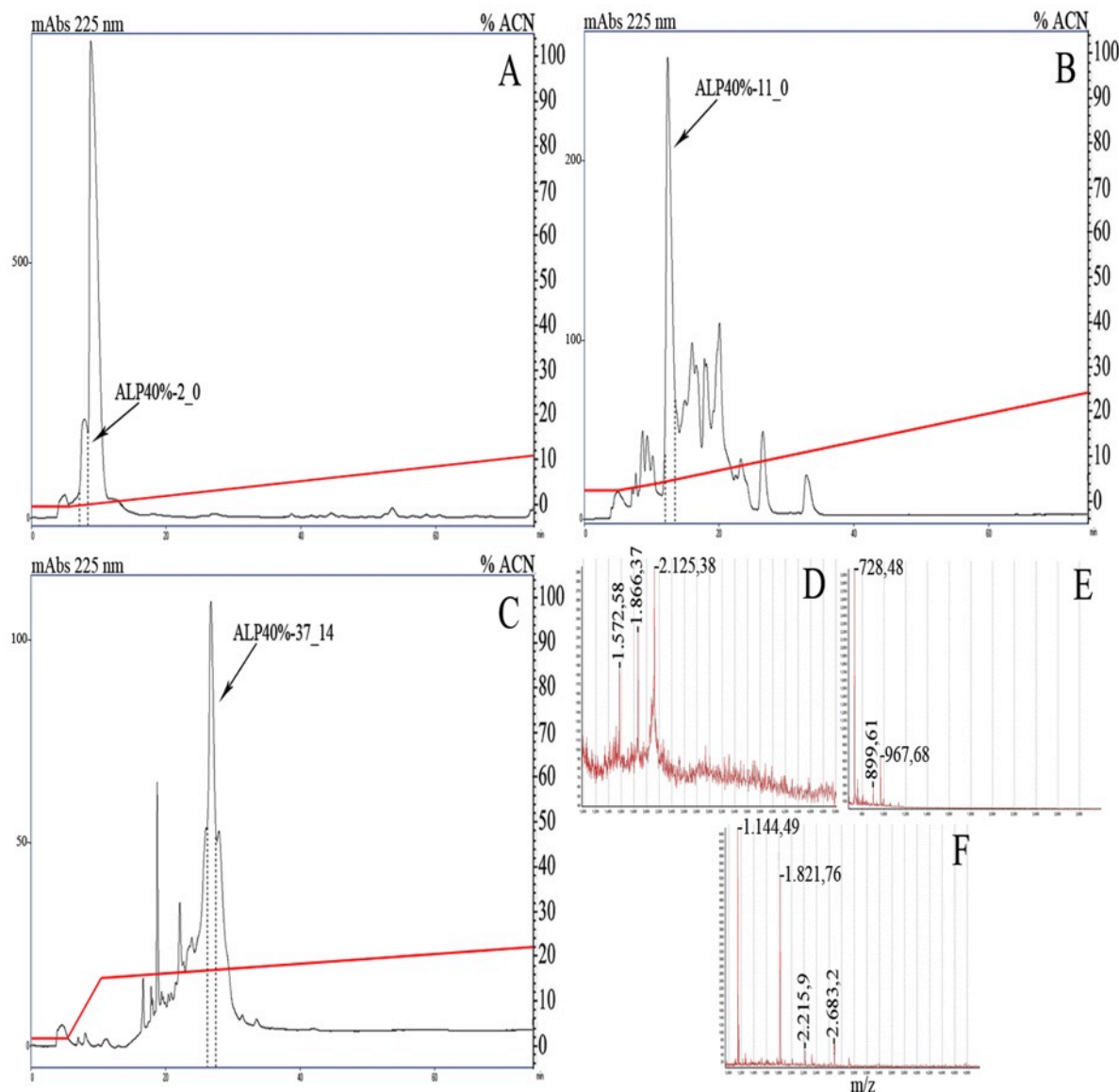


Figura 11- Cromatogramas da segunda etapa de purificação por CLAE das frações ALP40%-2 (A), ALP40%-11 (B) e ALP40%-37 (C) e espectros de massas (D a G) das frações ativas obtidas. As frações com atividade anti-*M. luteus* obtidas após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 40% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 10) foram submetidas a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 0 a 10% (A), 4 a 14% (B) e 15 a 25% (C) de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min. A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. As setas indicam as frações coletadas que apresentaram atividade anti-*M. luteus*. Os espectros de massas das frações ativas **ALP40%-1_0 (D)**, **ALP40%-11_0 (E)** e **ALP40%-37_14 (F)**, obtidos por MALDI-ToF, apresentaram valores de *m/z* referentes a moléculas de natureza proteica e evidenciaram a impureza das amostras.

Os espectros individuais combinados do intervalo de tempo marcado com um traço vermelho no CTI (19,1-19,6 min) mostrou três valores de *m/z* referentes aos íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, *m/z* 1.107,4), três ($[M+3H]^{3+}$, *m/z* 738,85) e quatro ($[M+4H]^{4+}$, *m/z* 554,38) cargas de um peptídeo com 2.212,42 Da de massa molecular (figura 12C). Os valores de *m/z* no espectro

do intervalo marcado com um traço azul (20,9-21,5 min) foram deconvoluídos para um peptídeo com 2.341,4 Da de massa molecular, pois estão relacionados aos seu íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, m/z 1.171,84), três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 781,78) e quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 586,71) cargas (figura 12D).

A combinação de espectros do intervalo marcado em verde (21,8-22,5 min) (figura 12E) mostrou a presença de um peptídeo com massa molecular de 2.292 Da, não observado no espectro de MALDI-ToF da fração, cujos íons com duas, três e quatro cargas possuem valores de m/z de 1.147,27, 765,36 e 574,19, respectivamente. Neste espectro podemos observar também a presença de outros valores menos intensos de m/z que foram deconvoluídos em outras massas moleculares (dado não apresentado).

A análise por espectrometria de massas da fração ativa **ALP40%-41_12** evidenciou, portanto, a impureza da amostra devido à presença de dois peptídeos, com massas moleculares de 2.212 e 2341 Da, com maior intensidade de sinal e um de 2.292 Da com sinal menos intenso, possivelmente por estar em menor concentração na amostra.

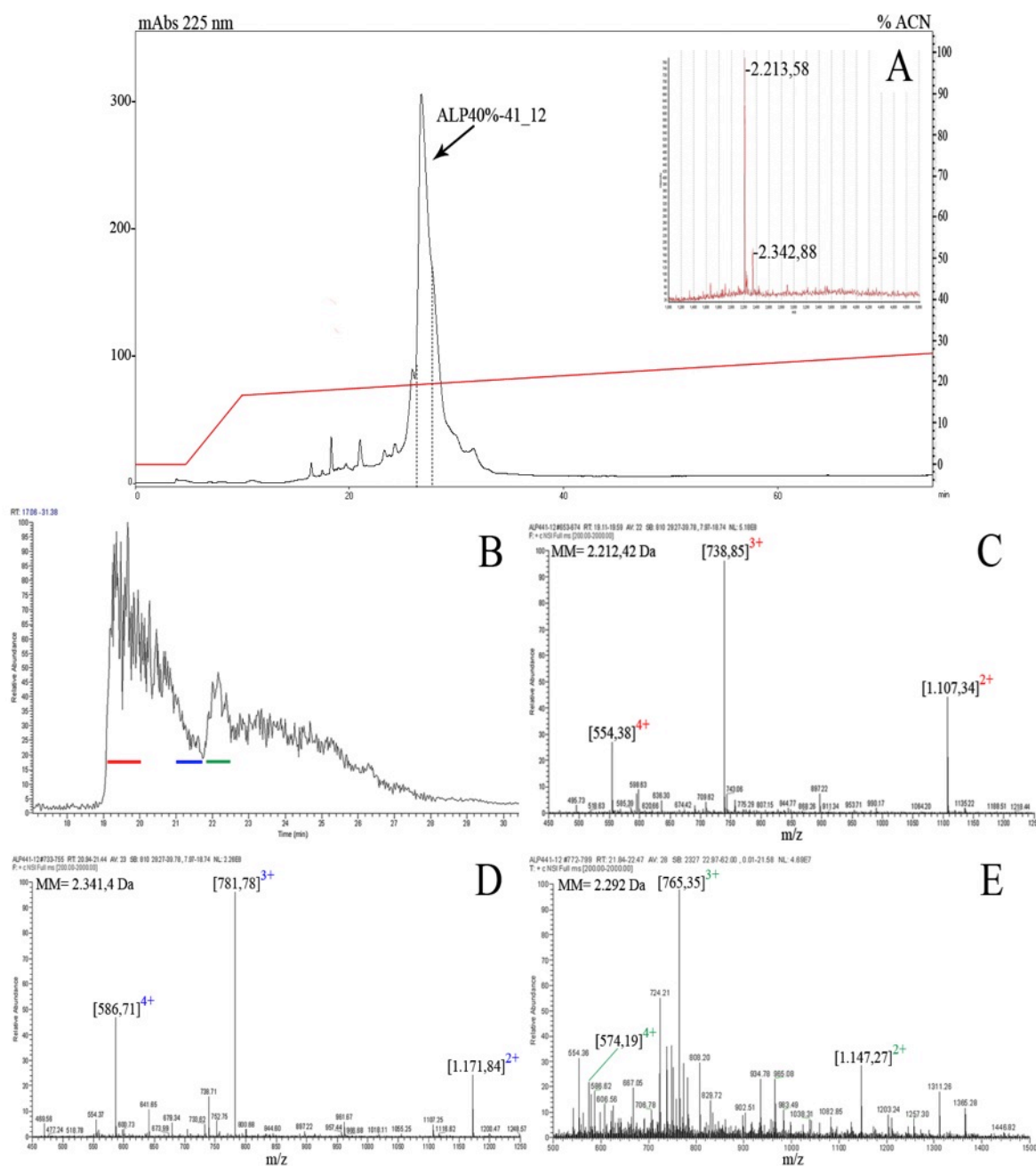


Figura 12- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-41 (A) e análises por MALDI-ToF/MS (inserida em A) e por LC-ESI/MS (B e E) da fração ativa. A fração com atividade anti-*M. luteus* ALP40%-41 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 40% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 10) foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 17 a 27% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min (A). A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. A seta indica a fração ALP40%-41_12 que apresentou atividade anti-*M. luteus* (A) cujo espectro de MALDI-ToF/MS mostrou a presença de dois peptídeos com massas moleculares de 2.212,58 e 2.341,88 Da (inserida em A). Os espectros combinados dos intervalos vermelho (C) e azul (D) do cromatograma total de íons dessa fração (B), obtido por LC-ESI/MS, mostraram a presença dos íons com duas, três e quatro cargas dos peptídeos de 2.212,42 Da (C) e 2.341,88 Da (D), detectados na análise por MALDI-ToF/MS. O espectro combinado do intervalo verde (E) do cromatograma de íons mostra também a presença de um peptídeo de 2.292 Da na fração ALP40%-41_12, evidenciado pela detecção dos seus íons com duas, três e quatro cargas.

A fração **ALP40%-46**, eluída a 26% de ACN na primeira etapa de purificação, foi fracionada numa segunda etapa de purificação por CLAE utilizando-se uma coluna analítica sob um gradiente linear de 19 a 29% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min (figura 13A). O ensaio de inibição de crescimento microbiano dos picos coletados evidenciou a presença de atividade anti-*M. luteus* somente na fração **ALP40%-46_13**, eluída a 22,1% de ACN (figura 13A).

As moléculas constituintes dessa fração não foram detectadas por MALDI-ToF/MS. Contudo, foi possível determinar as massas moleculares dos peptídeos presentes na fração **ALP40%-46_13** por LC-ESI/MS. O CTI da análise apresentou dois picos principais formados pelo intervalo de tempo marcado com um traço vermelho (24,4-25,6 min) e pelo intervalo marcado com um traço azul (26,6-28,7 min) (figura 13B).

A combinação dos espectros do intervalo em vermelho (figura 13C) mostrou a presença de valores de m/z referentes aos íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, m/z 1.285,88), três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 857,76) e quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 643,74) cargas que foram deconvoluídos em um peptídeo com 2.570,8 Da de massa molecular.

No espectro combinado do intervalo de tempo em azul (figura 13D) foi possível determinar a massa molecular de um peptídeo com 2.188,04 Da cujos íons dupla e triplamente carregados possuem valores de m/z iguais a 1.094,73 e 730,36, respectivamente. Além de um peptídeo de 3.012,5 Da, evidenciado pela presença dos seu íons com três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 1.005,4) e quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 754,44) cargas.

A análise por espectrometria de massas da fração **ALP40%-46_13**, ativa contra a bactéria *M. luteus* evidenciou a impureza da amostra devido à presença de diferentes peptídeos e a necessidade de outra etapa de purificação para o isolamento da molécula ativa.

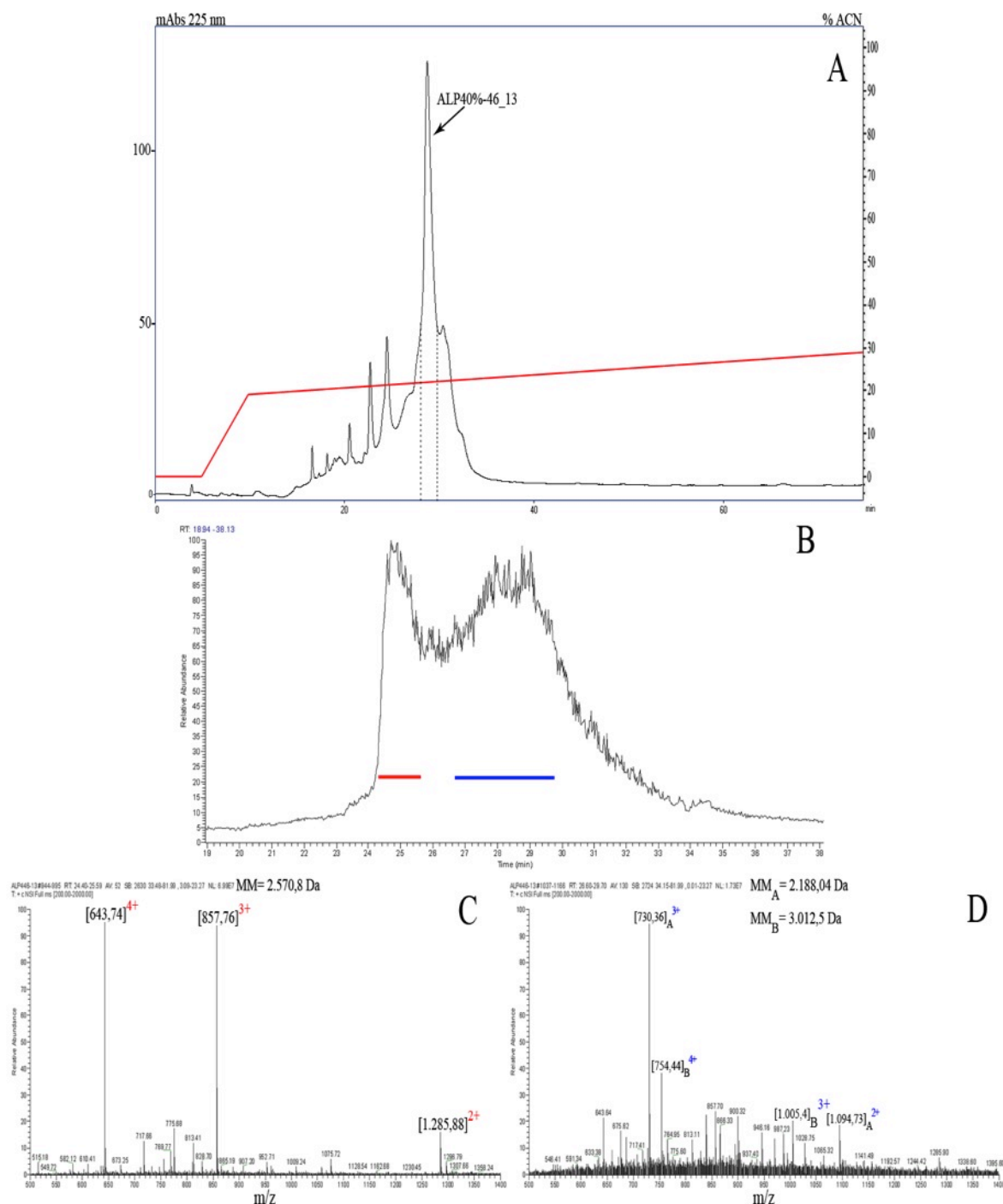


Figura 13- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-46 (A) e análise por LC-ESI/MS (B a D) da fração ativa. A fração com atividade anti-*M. luteus* ALP40%-46 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 40% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 10) foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 19 a 29% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min (A). A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. A seta indica a fração **ALP40%-46_13** que apresentou atividade anti-*M. luteus* (A). Os espectros combinados dos intervalos vermelho (C) e azul (D) do cromatograma total de íons desta fração (B), obtido por LC-ESI/MS, mostraram a presença dos íons em diferentes estados de ionização de peptídeos com 2.570,8 Da (C) e 2.188,04 e 3.012,5 Da (D) de massa molecular.

A fração **ALP40%-53**, eluída a 29% de ACN na primeira etapa de purificação, foi fracionada numa segunda etapa de purificação por CLAE utilizando-se uma coluna analítica sob um gradiente linear de 22 a 32% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min (figura 14A). O ensaio de inibição de crescimento microbiano dos picos coletados evidenciou a presença de atividade anti-*M. luteus* somente na fração **ALP40%-53_10**, eluída a 24,8% de ACN (figura 14A).

O CTI da análise por LC-ESI/MS da fração ativa apresentou duas regiões principais formadas pelo intervalo de tempo marcado com um traço vermelho (28-30,5 min) e com um traço azul (30,8-32 min) (figura 14B).

A combinação dos espectros obtidos no intervalo de tempo em vermelho (figura 14C) apresentou diversos valores de m/z devido à grande variedade de moléculas presentes nessa fração. No entanto, foi possível deconvoluir alguns desses valores em massas moleculares de três peptídeos distintos: um com 2.616,6 Da, devido à presença dos seus íons com três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 873,08) e quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 655,14); outro com 902,52 Da, devido à presença do seu íon monocarregado ($[M+H]^+$, m/z 903,52); e o último com massa 6.697,1 Da, evidenciado pelos seus íons com quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 1.675,13) e cinco ($[M+5H]^{5+}$, m/z 1.340,63) cargas.

No espectro combinado do intervalo de tempo azul (figura 14D) foi possível verificar a presença de um peptídeo de 1.348,04 Da na fração, evidenciado pelos seus íons com duas ($[M+2H]^{2+}$, m/z 675,03) e uma ($[M+H]^+$, m/z 1.348,59) carga.

Os diferentes peptídeos presentes na fração com atividade anti-*M. luteus* **ALP40%-53_10** evidenciam a necessidade de uma outra etapa de purificação para o isolamento da molécula ativa.

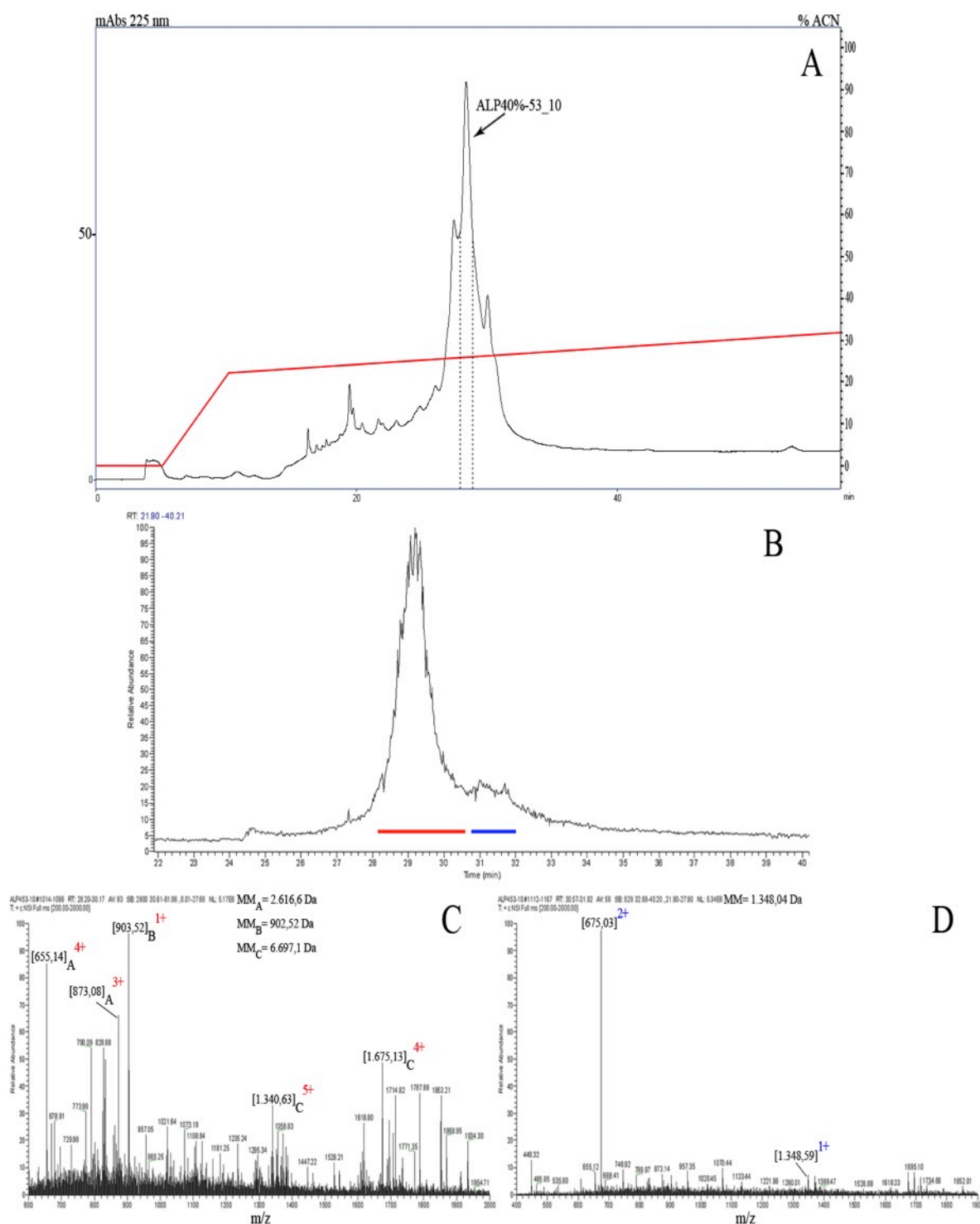


Figura 14- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-53 (A) e análise por LC-ESI/MS (B a D) da fração ativa. A fração com atividade anti-*M. luteus* ALP40%-53 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 40% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 10) foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 22 a 32% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min (A). A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. A seta indica a fração ALP40%-53_10 que apresentou atividade anti-*M. luteus* (A). Os espectros combinados dos intervalos vermelho (C) e azul (D) do cromatograma total de íons desta fração, obtido por LC-ESI/MS, mostraram a presença dos íons em diferentes estados de ionização de peptídeos com 2.616,6, 902,52 e 6.697,1 Da (C) e 1.348,04 Da (D) de massa molecular.

A fração **ALP40%-44**, eluída a 25% de ACN na primeira etapa de purificação, foi fracionada numa segunda etapa de purificação por CLAE utilizando-se uma coluna analítica sob um gradiente linear de 18 a 28% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min (figura 15A). O ensaio de inibição de crescimento microbiano dos picos coletados evidenciou a presença de atividade anti-*M. luteus* somente na fração **ALP40%-44_12**, eluída a 20% de ACN (figura 15A).

O espectro de massas dessa fração, obtido por MALDI-ToF/MS, apresentou valores de m/z em 2.125,9 e 2.147,9. Estes valores, que diferem em 22 Da, podem ser referentes a somente um peptídeo com 2.124,9 Da de massa molecular carregado com um próton ($[M+H]^+ = 2.125,9$ Da) ou com um aduto de sódio ($[M+Na]^+ = 2.147,9$ Da) (figura 15B). Os padrões isotópicos, com picos espaçados em 1 Da, apresentados por ambos valores de m/z no espectro (figura 15B inserida), evidenciaram que os íons são monocarregados e possibilitaram confirmar a massa molecular do peptídeo presente na fração.

Dentre todas as frações com atividade antimicrobiana encontradas após a segunda etapa de purificação por CLAE do material da hemolinfa dos opiliões, a fração **ALP40%-44_12** foi a única a mostrar-se pura, ou seja, constituída por somente um peptídeo com 2.124,9 Da de massa molecular. Portanto, os próximos experimentos foram realizados com o intuito de caracterizar sua estrutura primária através das técnicas de sequenciamento “de novo” por espectrometria de massas e sequenciamento N-terminal por degradação de Edman.

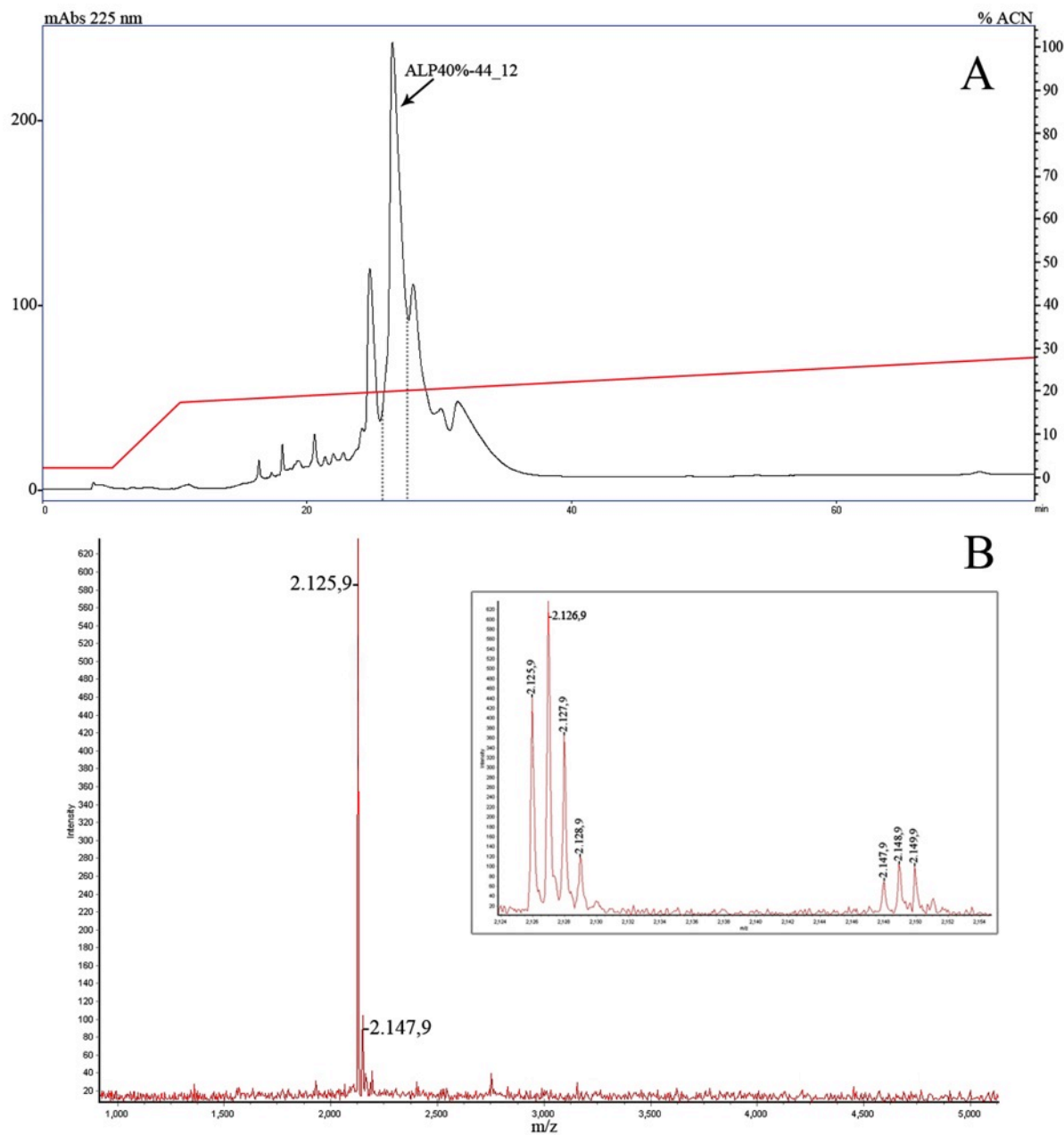


Figura 15- Cromatograma da segunda etapa de purificação da fração ALP40%-44 (A) e análises por MALDI-ToF/MS (B) da fração ativa. A fração com atividade anti-*M. luteus* ALP40%-44 obtida após a primeira etapa de purificação por CLAE do material plasma de opiliões eluído a 40% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 10) foi submetida a uma segunda etapa de purificação com uma coluna Vydac C18 analítica (250 mm × 4,6 mm) sob um gradiente linear de 18 a 28% de ACN/TFA 0,046% em H₂O/TFA 0,046% durante 60 min e fluxo de 1,0 mL/min (A). A absorbância foi monitorada a 225 nm e todos os picos coletados manualmente. A seta indica a fração ALP40%-44_12 que apresentou atividade anti-*M. luteus* (A). O espectro de MALDI-ToF/MS da fração (B) mostrou a presença de dois valores de *m/z* referentes a um peptídeo de massa molecular 2.124,9 Da carregado com um próton ([M+H]⁺= 2.125,9 Da) ou com um aduto de sódio ([M+Na]⁺= 2.147,9 Da). Os padrões isotópicos de ambos valores de *m/z* (inserida em B) evidenciaram que os íons são monocarregados pois os picos encontraram-se espaçados em 1 Da.

4.2 Sequenciamento “De novo”

O peptídeo de 2.124,9 Da presente na fração com atividade anti-*M. luteus* **ALP40%-44_12** foi submetido à técnica de sequenciamento “de novo” (ver 3.4.3.3) para a elucidação de sua estrutura primária.

A técnica de sequenciamento “de novo” é baseada na interpretação dos fragmentos de um peptídeo gerados pela quebra de uma de suas ligações peptídicas após dissociação induzida por colisão (DIC) contra moléculas de um gás inerte (He ou Ar). Os fragmentos que contêm a parte N-terminal da molécula são da série “*b*” e aqueles que possuem a parte C-terminal do peptídeo são da série “*y*” (ROEPSTORFF e FOHLMAN, 1984). Logo, a diferença de massa entre fragmentos adjacentes de uma mesma série corresponde à massa do resíduo de aminoácido presente naquela posição da molécula. Desta maneira é possível sequenciar um peptídeo de massa molecular conhecida por meio dessa técnica e quanto maior for a variedade de fragmentos *-y* e *-b* gerados por um peptídeo, mais simples e confiável será a determinação de sua estrutura primária. No entanto, através dessa técnica, não é possível diferenciar resíduos com massas muito semelhantes, como Lys e Gln ou os resíduos isobáricos (mesma massa molecular) Leu e Ile. Outro tipo de informação adquirida no espectro de fragmentação pode ser a composição de aminoácidos do peptídeo, obtida pela presença dos imônios e seus íons relacionados na região de baixos valores de *m/z* do espectro (FALICK et al., 1993).

Com o intuito de facilitar a interpretação do espectro de fragmentação da cadeia peptídica completa, também foram adquiridos espectros de MS/MS dos produtos de digestão enzimática do peptídeo por tripsina ou por endoprotease Glu-C (ver 3.4.3.1). Para diferenciar os resíduos de Lys e Gln, optou-se pela modificação química da molécula através da acetilação de resíduos de Lys (ver 3.4.3.2).

4.2.1 Produtos da Digestão com Tripsina

Após o tratamento enzimático do peptídeo com tripsina (em 3.4.3.1, § 3) foi possível determinar parcialmente, pela interpretação dos espectros de MS/MS, a sequência dos resíduos de aminoácidos de três fragmentos obtidos com massas moleculares de 720,2 (figura 16), 1.012,26 (figura 17) e 449,1 Da (figura 18).

O melhor espectro de fragmentação para o sequenciamento “de novo” da molécula de 720,2 Da foi obtido pela dissociação induzida por colisão com energias (E_{col}) em diferenças de potenciais de 15 e 20 V do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 361,1) (figura 16A).

O assinalamento de todos os íons da série $-y$ desse fragmento (figura 16A) permitiu a determinação parcial de sua estrutura primária, constituída por sete resíduos: Ser₁-Gly₂-Tyr₃-Ile/Leu₄-Pro₅-Gly₆-Lys/Gln₇. Além dos valores de m/z referentes aos íons da série $-y$ (em vermelho, figura 16A), que apresentaram abundâncias relativas superiores a 10%, foram encontrados os íons $-b_2$ (145,02), $-a_2$ (117,04), $-b_3$ (308,04) e $-b_4$ (421,09) (em azul, figura 16A).

Na região de baixos valores de m/z (figura 16B) do espectro foram observados os imônios dos resíduos de Ser (60), Pro (70), Ile/Leu (86) e Tyr (136) e íons relacionados ao imônio de Lys/Gln (129 e 84). Nessa mesma região podemos ainda observar valores de m/z referentes a alguns fragmentos internos (quando ocorre quebra de duas ligações peptídicas) do peptídeo: Pro-Gly (155,04), Ile/Leu-Pro (211,09), Gly-Tyr (221,04) e Tyr-Ile/Leu (277,08).

Apesar da molécula ter sido obtida a partir da digestão com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da, não se pode afirmar que o último resíduo é uma Lys, pois este pode ser um fragmento com a parte C-terminal do peptídeo. A diferença entre sua massa molecular monoisotópica teórica (720,38 Da) e a aferida (702,2 Da) foi de 0,18 Da.

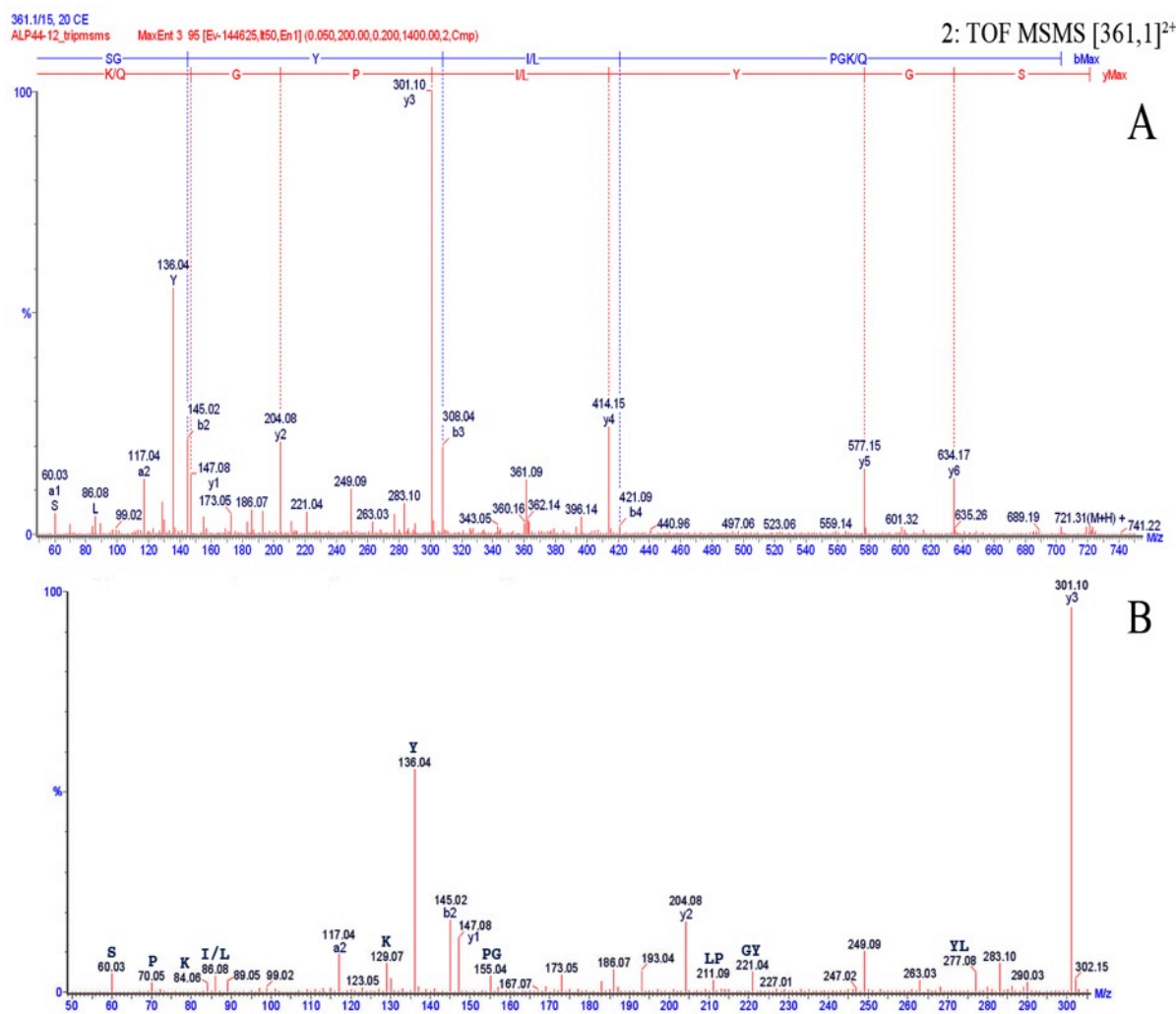


Figura 16- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 702,2 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 e 20 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 361,1). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: **Ser-Gly-Tyr-Ile/Leu-Pro-Gly-Lys/Gln**. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como alguns fragmentos internos formados por dipeptídeos.

O espectro de fragmentação mais informativo para o sequenciamento “de novo” da molécula de 1.012,26 Da foi obtido pela dissociação induzida por colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 507,13) com *E.col* numa diferença de potencial de 20 V (figura 17A).

Foi possível assinalar todos os íons da série $-y$ (vermelho), com exceção do $-y_2$, desse peptídeo (figura 17A), o que permitiu determinar parcialmente sua estrutura primária constituída por nove resíduos de aminoácidos, dos quais os sete primeiros correspondem à sequência do fragmento de 720,2 Da: Ser₁-Gly₂-Tyr₃-Ile/Leu₄-Pro₅-Gly₆-Lys/Gln₇-Glu₈-Tyr₉. Foram

também encontrados os íons $-b_2$ (145,02), $-a_2$ (117,04), $-b_3$ (308,04), $-a_3$ (280,06), $-b_4$ (421,09), $-a_4$ (393,11), $-b_6$ (575,13), $-a_6$ (547,29) e $-b_8$ (832,28).

Na região de baixos valores de m/z (figura 17B) do espectro foram observados os imônios dos resíduos de Ser (60), Pro (70), Ile/Leu (86) e Tyr (136) e íons relacionados ao imônio de Lys/Gln (129 e 84). Nessa mesma região podemos ainda observar valores de m/z referentes a alguns fragmentos internos do peptídeo: Pro-Gly (155,05), Gly-Lys/Gln (186,12), Gly-Tyr (221,04), Lys/Gln-Glu (258,08) e Pro-Gly-Lys/Gln (283,11).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (1.012,49 Da) e aferida (1.012,26 Da) desse fragmento foi de 0,23 Da.

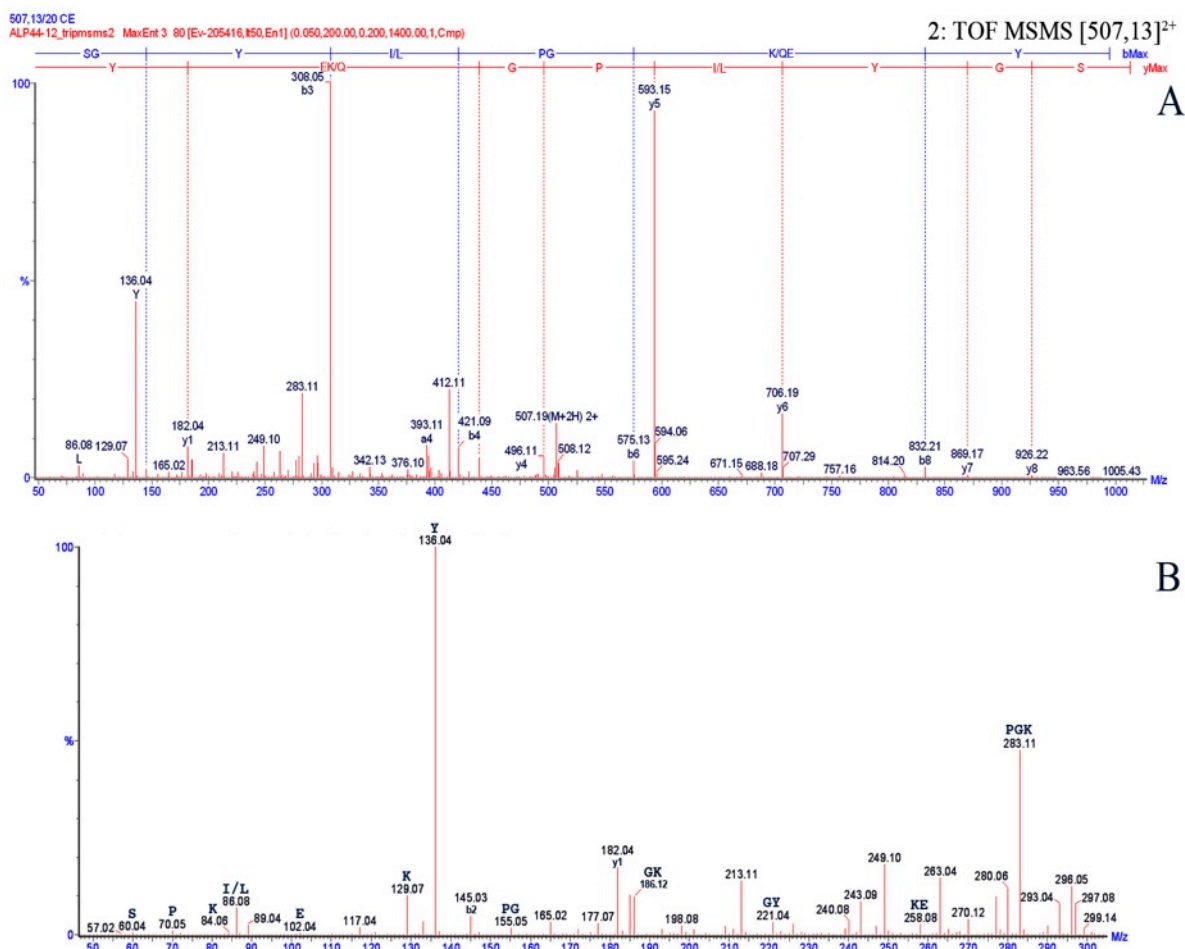


Figura 17- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 1.012,6 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferença de potencial de 20 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 507,13). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: **Ser-Gly-Tyr-Ile/Leu-Pro-Gly-Lys/Gln-Glu-Tyr**. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como alguns fragmentos internos formados por di e tripeptídeos.

O espectro de DIC do íon monocarregado do fragmento de 449,1 Da ($[M+H]^+$, m/z 450,1) foi obtido sob E_{col} em diferenças de potenciais de 15 e 25 V (figura 18A).

A interpretação do espectro de fragmentação (figura 18) dessa molécula possibilitou o assinalamento de todos os íons do série $-y$ (vermelho), além dos íons $-b_2$ (186,08), $-b_3$ (285,11) e $-a_3$ (257,1), de um peptídeo com quatro resíduos de aminoácidos: Gly₁-Lys/Gln₂-Val₃-Phe₄.

Na região de baixos m/z foram observados o imônio de Val (72) e íons relacionados ao resíduo de Lys/Gln (129 e 84).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (449,26 Da) e a aferida (449,1 Da) desse fragmento foi de 0,16 Da.

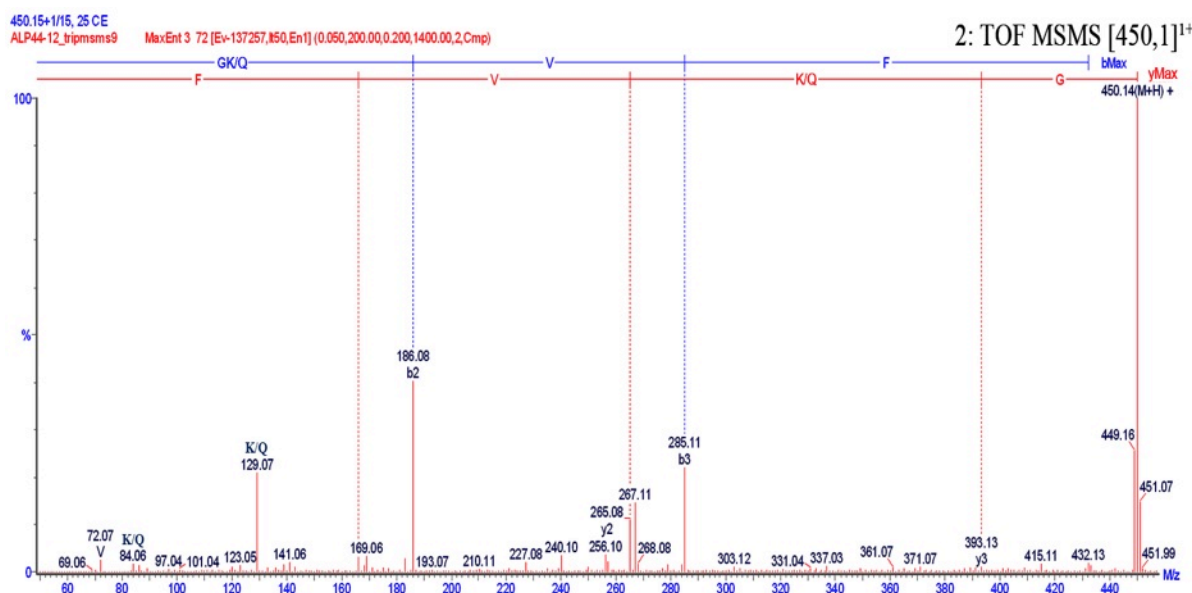


Figura 18- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 449,1 Da obtido a partir da digestão enzimática com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. O espectro de DIC do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 e 25 V na célula de colisão do seu íon monocarregado ($[M+H]^+$, m/z 450,1). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: **Gly-Lys/Gln-Val-Phe**. Na região de baixos valores de m/z estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência.

Os valores de m/z presentes nos espectros de DIC que possibilitaram determinar e confirmar a estrutura primária dos fragmentos obtidos após o tratamento enzimático com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da estão apresentados na **tabela 1**.

Tabela 1- Íons presentes nos espectros de DIC dos fragmentos obtidos após tratamento enzimático com tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. Valores de m/z entre parênteses.

Estrutura primária	Massa Teórica ^a (Da)	Massa Aferida (Da)	Série -y	Séries -b e -a	Íons relacionados	Fragmentos internos
SGY I /LPGK/Q	720,38	720,2	-y ₁ (147,08)		S (60)	
			-y ₂ (204,08)	-b ₂ (145,02)	P (70)	PG (155,08)
			-y ₃ (301,1)	-a ₂ (117,04)	I/L (86)	I/LP (211,14)
			-y ₄ (414,15)	-b ₃ (308,04)	K/Q (129 e 84)	GY (221,04)
			-y ₅ (577,15)	-b ₄ (421,09)	Y (136)	YI/L (277,08)
			-y ₆ (634,17)			
SGY I /LPGK/QEY	1.012,49	1.012,26	-y ₁ (182,04)	-b ₂ (145,02)	S (60)	PG (155,05)
			-y ₃ (439,1)	-b ₃ (308,05)	P (70)	GK/Q (196,12)
			-y ₄ (496,11)	-a ₃ (280,06)	I/L (86)	GY (221,04)
			-y ₅ (593,15)	-b ₄ (421,09)	E (102)	K/QE (258,08)
			-y ₆ (706,19)	-a ₄ (393,11)	K/Q (129 e 84)	PGK/Q (283,11)
			-y ₇ (869,17)	-b ₅ (575,13)	Y (136)	PGK/QE (412,11)
			-y ₈ (926,22)	-b ₈ (832,21)		LPGK/QE (525,3)
						YLPKG/QE (688,18)
GK/QVF	449,26	449,1	-y ₁ (166,06)	-b ₂ (186,08)	V (72)	
			-y ₂ (265,08)	-b ₃ (285,11)	K/Q (129 e 84)	----
			-y ₃ (393,13)	-a ₃ (257,1)		

---- íons ausentes no espectro;

a- calculada no software MassLynx 4.1.

4.2.2 Produtos da Digestão com Endoprotease Glu-C/Tripsina

Após o tratamento enzimático do peptídeo com endoprotease Glu-C ou endoprotease Glu-C/tripsina (em 3.4.3.1, § 2 e 4) foi possível determinar parcialmente, pela interpretação dos espectros de MS/MS, a sequência dos resíduos de aminoácidos de dois fragmentos gerados com massas moleculares de 849,2 (figura 19) e 862,22 Da (figura 20).

O melhor espectro de fragmentação para o sequenciamento “de novo” da molécula de 849,2 Da foi obtido pela dissociação do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 425,6) em *Ecol* a diferenças de potenciais de 15 e 35 V (figura 19A).

O assinalamento de todos os íons da série -y desse fragmento (figura 19A) permitiu a determinação parcial de sua estrutura primária, constituída por oito resíduos: Ser₁-Gly₂-Tyr₃-**Ile/Leu**₄-Pro₅-Gly₆-**Lys/Gln**₇-Glu₈. Além dos valores de m/z referentes aos íons da série -y (vermelho), foram encontrados os íons -b₂ (145,02), -a₂ (117,04), -b₃ (308,04), -b₄ (421,09), -a₄ (393,1) e -b₅ (518,24) (azul).

Na região de baixos valores de m/z (figura 19B) do espectro foram observados os imônios dos resíduos de Ser (60), Pro (70), Ile/Leu (86), Tyr (136) e Glu (102) e íons relacionados ao imônio de Tyr (91) e Lys/Gln (129 e 84). Nessa mesma região podemos ainda observar alguns íons referentes a fragmentos internos do peptídeo: Pro-Gly (155,04), Gly-Tyr (221,04), Tyr-Ile/Leu (277,08) e Pro-Gly-Lys/Gln (283,1).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (849,42 Da) e a aferida (849,2 Da) desse fragmento foi de 0,22 Da.

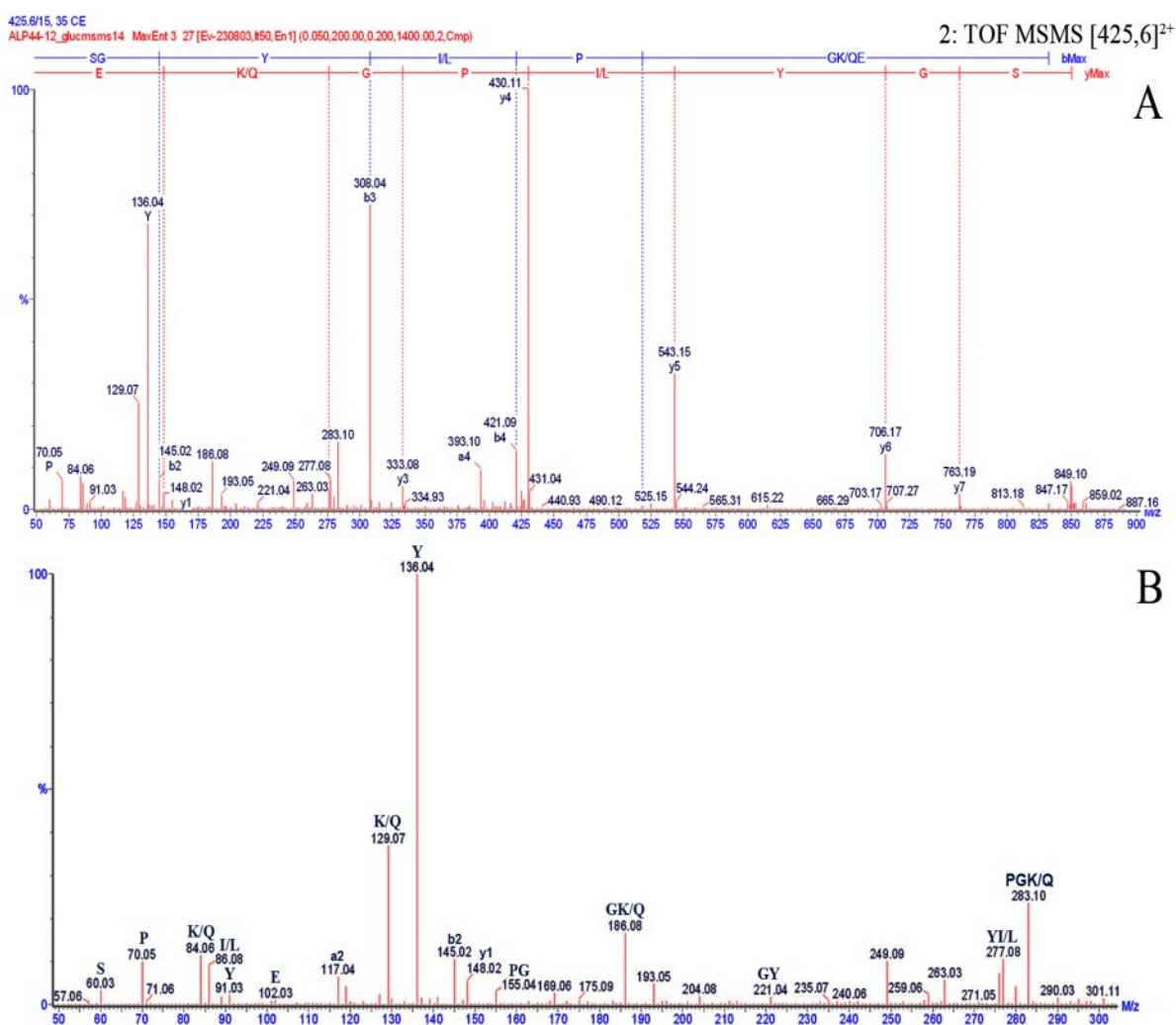


Figura 19- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 849,2 Da obtido a partir da digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 e 35 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 425,6). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: **Ser-Gly-Tyr-Ile/Leu-Pro-Gly-Lys/Gln-Glu**. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como alguns fragmentos internos formados por di e tripeptídeos.

O espectro de DIC do fragmento de 862,22 Da foi obtido pela dissociação do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 432,11) em E_{col} a diferenças de potenciais de 15 e 32 V (figura 20A).

A interpretação do seu espectro de fragmentação permitiu a elucidação parcial da estrutura primária desse peptídeo através do assinalamento de todos os íons das séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), à exceção dos íons $-b_1$ e $-b_3$ (figura 20A). Este fragmento de 862,22 Da obtido pela clivagem com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da mostrou-se composto por seis resíduos de aminoácidos: Tyr₁-Val₂-Tyr₃-Lys/Gln₄-Tyr₅-Lys/Gln₆.

Na região de baixos valores de m/z (figura 20B) do espectro foram observados os imônios dos resíduos de, Val (72), Lys/Gln (101), Phe (120) e Tyr (136) e íons relacionados ao imônio de Phe (91) e Lys/Gln (129 e 84). Nessa mesma região é possível ainda observar a presença do íon relacionado ao fragmento interno Lys/Gln-Tyr (292,08).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (862,46 Da) e aferida (862,22 Da) desse fragmento foi de 0,24 Da.

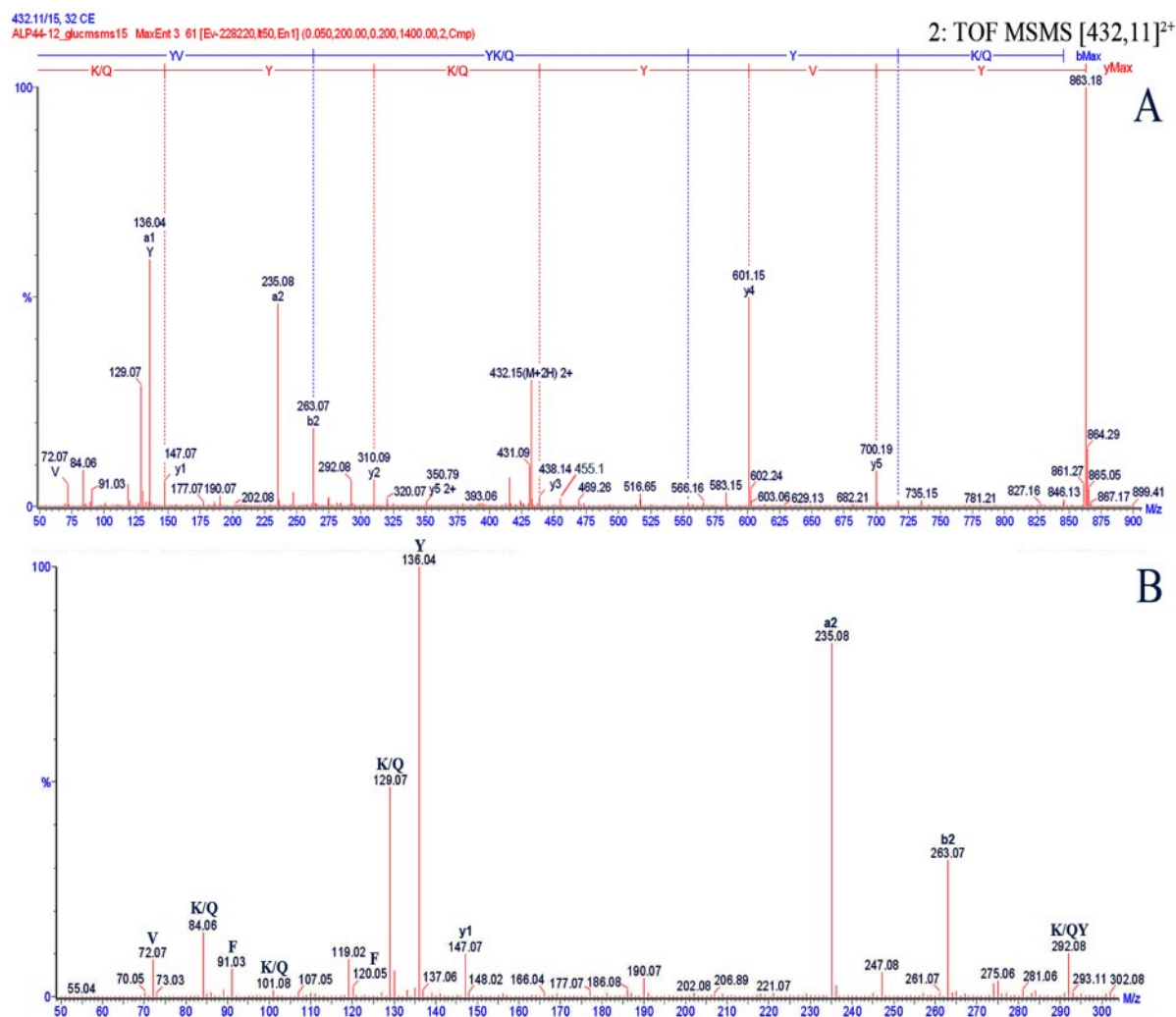


Figura 20- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 862,22 Da obtido a partir da digestão enzimática com endoprotease Glu-C/tripsina do peptídeo de 2.124,9 Da. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 e 32 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 432,11). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: **Tyr-Val-Tyr-Lys/Gln-Tyr-Lys/Gln**. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como o fragmento interno Lys/Gln-Tyr.

Os valores de m/z presentes nos espectros de DIC que possibilitaram determinar e confirmar a estrutura primária dos fragmentos obtidos após o tratamento enzimático com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da estão apresentados na **tabela 2**.

Tabela 2- Íons presentes nos espectros de DIC dos fragmentos obtidos após tratamento enzimático com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.124,9 Da. Valores de m/z entre parênteses.

Estrutura primária	Massa Teórica ^a (Da)	Massa Aferida (Da)	Série -y	Séries -b e -a	Imônios ou íons relacionados	Fragmentos internos
SGYI/LPGK/QE	849,42	849,2	-y ₁ (148,02)	-b ₂ (145,06)	S (60)	PG (155,08)
			-y ₂ (276,09)	-a ₂ (117,04)	P (70)	GK/Q (186,08)
			-y ₃ (333,08)	-b ₃ (308,04)	I/L (86)	GY (221,04)
			-y ₄ (430,11)	-b ₄ (421,09)	K/Q (129 e 84)	YI/L (277,08)
			-y ₅ (543,15)	-b ₅ (518,18)	E (102)	PGK/Q (283,1)
			-y ₆ (706,17)	-b ₃ (703,17)	Y (136)	LPGK/Q (396,08)
			-y ₇ (763,19)			GYI/LP (431,05)
YVYK/QYK/Q	862,46	862,22	-y ₁ (147,07)	-b ₂ (263,07)	V (72)	
			-y ₂ (310,09)	-a ₂ (235,08)	K/Q (101, 129 e 84)	K/QY (292,08)
			-y ₃ (438,14)	-b ₄ (554,17)	F (120 e 91)	YK/QY (455,1)
			-y ₄ (601,15)	-b ₅ (717,22)	Y (136)	
			-y ₅ (700,19)			

a- calculada no software MassLynx 4.1.

4.2.3 Cadeia Polipeptídica Completa

Foi verificado por MALDI-ToF/MS que não houve um incremento de massa no peptídeo de 2.124,9 Da presente na fração **ALP40%-44_12** após ter sido reduzido e alquilado com iodoacetamida (ver 3.4.2), evidenciando assim a ausência de resíduos de Cys na molécula (dado não apresentado).

O sequenciamento “de novo” da cadeia polipeptídica completa (sem clivagem enzimática) foi realizado pela interpretação do espectro de DIC do seu íon carregado com quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,27) e com o auxílio da estrutura primária dos fragmentos de digestão enzimática com tripsina (ver 3.2.1) ou endoprotease Glu-C (ver 3.2.2) do peptídeo (figura 21A e ANEXO). Todos os íons da série -y (vermelho) foram assinalados, além dos íons -b₂ (145,07), -a₂ (117,07), -b₃ (308,13), -a₃ (280,13), -b₄ (421,23), -a₄ (393,24), -b₆ (575,31), -a₆ (547,3), -b₇ (703,44) e -b₈ (832,46). Foi possível verificar também a presença de diversos fragmentos internos (ANEXO) destacando-se os que possuem uma Pro N-terminal, visto a tendência de ocorrer quebra da ligação peptídica nessa região do resíduo durante a fragmentação do peptídeo por dissociação induzida por colisão (VAISAR e URBAN, 1996).

Na região de baixos valores de m/z (figura 21B) do espectro foram observados os imônios dos resíduos de, Ser (60), Pro (70), Val (72), Ile/Leu (86), Phe (120) e Tyr (136) e íons relacionados ao imônio de Phe (91) e

Lys/Gln (129 e 84). Nessa mesma região é possível ainda observar a presença do íon relacionado ao fragmento interno Lys/Gln-Tyr (292,08).

O peptídeo sequenciado foi nomeado longipina em alusão ao epíteto do opilião *Acutisoma longipes*. Sua estrutura primária é linear e constituída por dezoito resíduos de aminoácidos (SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/QGK/QVF), cuja massa molecular monoisotópica teórica (2.125,12 Da) difere 0,04 Da da massa aferida por Q-ToF/MS (2.125,08 Da).

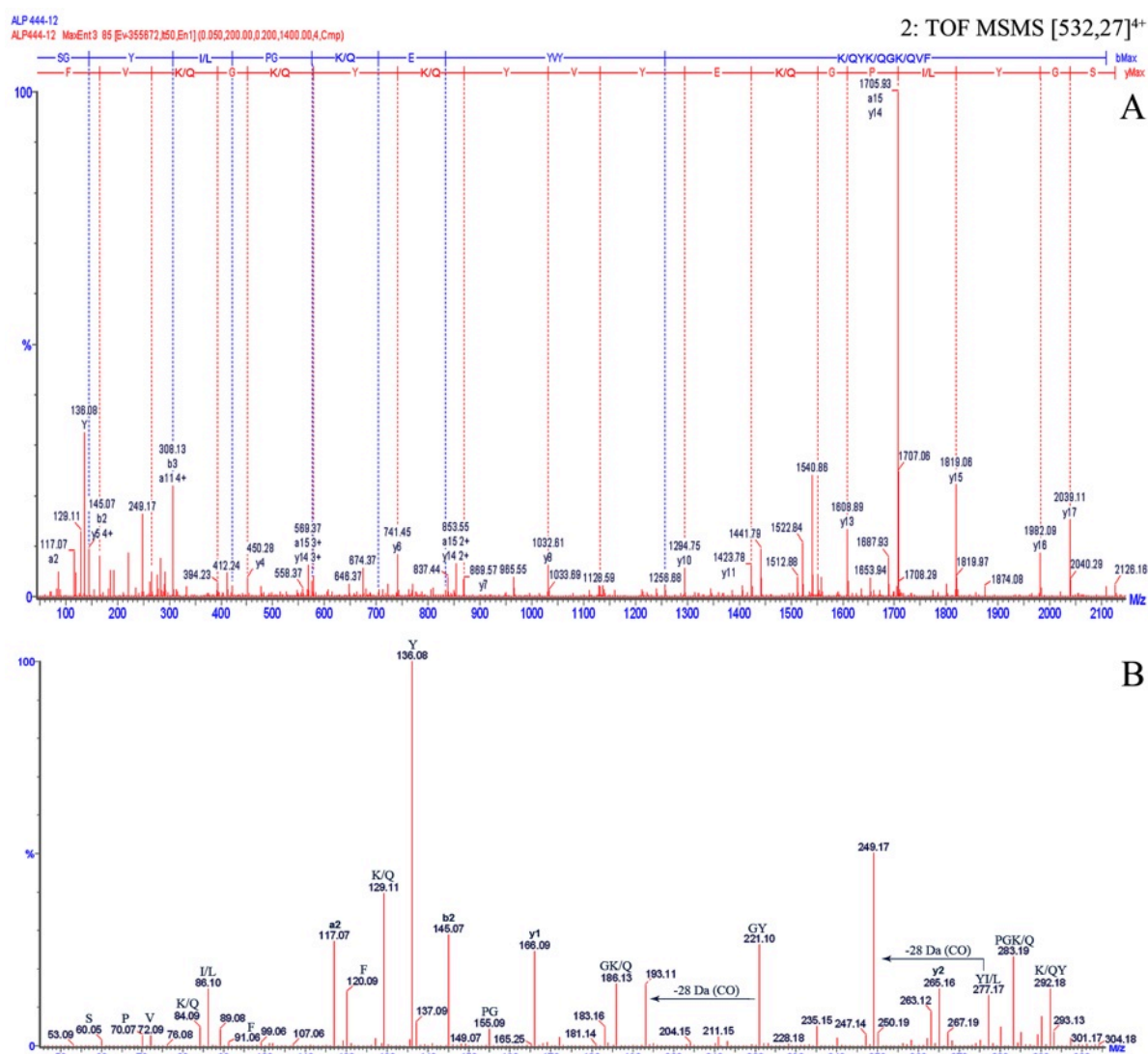


Figura 21- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 2.125,08 Da presente na fração com atividade antimicrobiana ALP40%-44_12. O espectro de DIC (A) do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão do seu íon com quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,27). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: **SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/QGKVF**. Esse peptídeo foi nomeado longipina. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como fragmentos internos formados por di e tripeptídeos. (O espectro da figura A está apresentado no ANEXO para facilitar a visualização das séries assinaladas)

Nessa mesma, fração (**ALP40%-44_12**) foi possível verificar a presença de um peptídeo com 2.153,32 Da ($\approx +28$ Da de diferença do peptídeo de 2.125,08 Da) cujo espectro de fragmentação do seu íon com quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 539,33) mostrou-se muito semelhante ao espectro da **figura 21A**. A comparação entre os dois espectros (figura 22) de DIC possibilitou constatar que a diferença entre as duas moléculas reside, pelo menos, no incremento de 28 Da na massa do resíduo de Glu₈, pois esta diferença entre os dois espectros é constante entre os fragmentos $-y_{17}$ e $-y_{11}$, não sendo mais observada a partir do fragmento $-y_{10}$. Logo, a diferença de +28 Da do peptídeo só pode ser devido ao incremento de massa no resíduo da posição 8 (Glu) ou à troca de resíduo (SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/QGK/QVF).

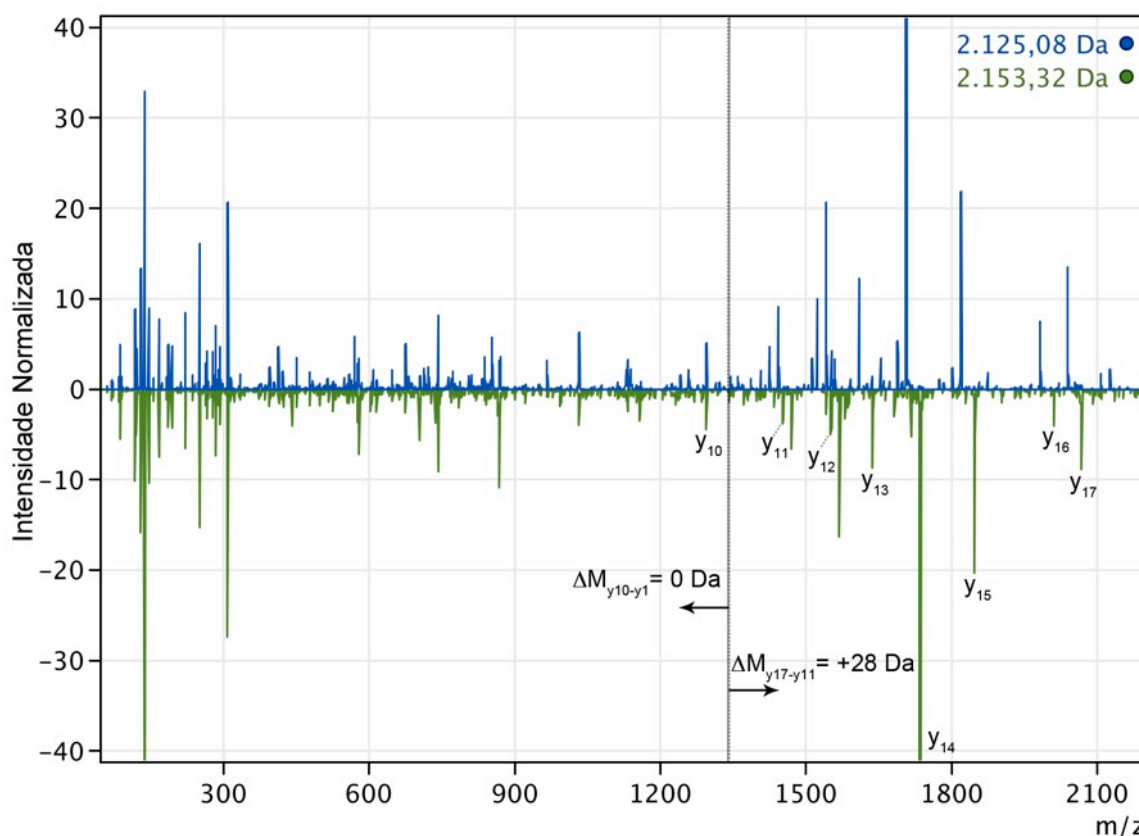


Figura 22- Comparação entre os espectros de DIC dos peptídeos de 2.125,08 (azul) e 2.153,32 (verde) Da encontrados na fração ALP40%-44_12. Os espectros de fragmentação foram obtidos com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão dos íons com quatro cargas dos peptídeos. Os espectros normalizados pela intensidade do íon mais abundante em cada um foram aumentados 2,5 vezes. $\Delta M_{y_m-y_n}$ são as diferenças de massas observadas entre cada um dos fragmentos da série $-y$ do peptídeo de 2.153 e o de 2.125 Da compreendidos entre os números m e n .

4.2.4 Diferenciação entre Resíduos de Lys e Gln

A estrutura primária da longipina determinada até então, não contemplou a diferenciação entre resíduos isobáricos (Ile e Leu) e resíduos de Lys (128, 09 Da) ou Gln (128,06 Da), cujas massas são muito próximas. Optou-se pela modificação química da molécula através da acetilação do amino grupo da cadeia lateral de Lys (incremento de 42 Da por resíduo, além da modificação do grupo amina na região N-terminal), formando-se ϵ -acetil-lisina (K^{AC}), seguido de digestão enzimática com endoprotease Glu-C (ver 3.4.3.2) para diferenciar de resíduos de Gln. Os produtos da acetilação e digestão foram analisados tanto por LC-ESI-MS para a avaliação da massa dos fragmentos formados (figura 23), quanto por LC-Q-ToF-MS/MS para a elucidação de suas estruturas primárias por meio do sequenciamento “de novo” de seus espectros de DIC (figura 24 e 25).

Os dois picos principais (intervalos de tempo marcados com traço azul [34,8-35,8 min] e traço verde [38,8-40,1 min]) do cromatograma total de íons (figura 23A) na análise por LC-ESI-MS revelou a presença de dois fragmentos: um com 933,39 Da, m/z 934,39 do íon monocarregado $[M+H]^+$ (figura 23B); outro com 1.419,62 Da, m/z 1.420,62 do íon monocarregado $[M+H]^+$ e m/z 711,15 do íon com duas cargas $[M+2H]^{2+}$ (figura 23C). Esses valores de massa molecular indicaram, respectivamente, a presença do fragmento que contém região N-terminal do peptídeo (SGY**I**/LPGKE) com duas modificações por acetilação ($849+2\times 42 = 933$ Da \rightarrow $^{AC}SGY**I**/LPGK^{AC}E$) no intervalo azul e do fragmento que contém a região C-terminal (YVYKYK**GK**VF) com três modificações ($1.293+3\times 42 = 1.419$ Da \rightarrow $YVYK^{AC}YK^{AC}GK^{AC}VF$) no intervalo verde.

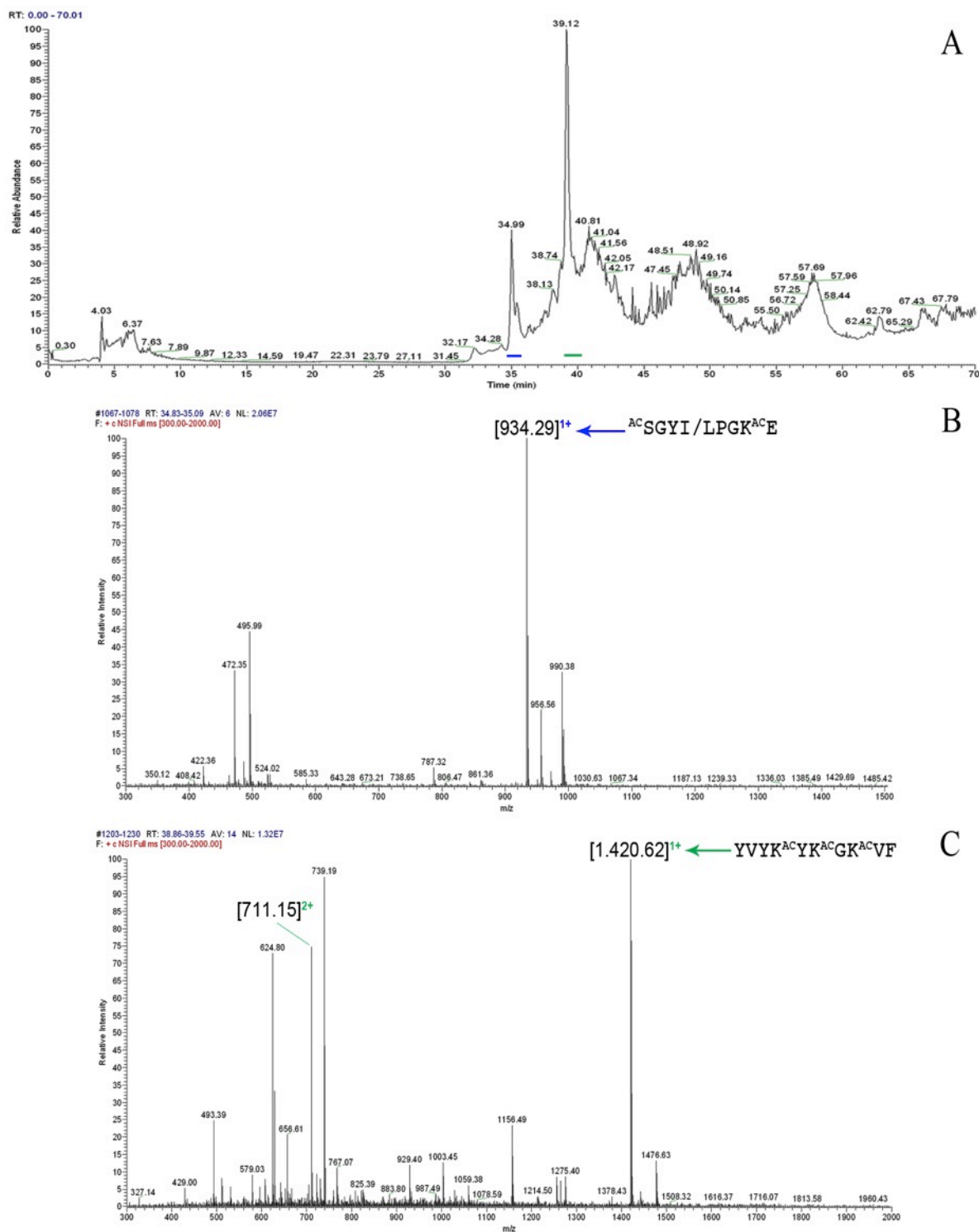


Figura 23- Análise por LC-ESI-MS dos fragmentos obtidos após acetilação e digestão enzimática por endoprotease Glu-C da longipina. O cromatograma total de íons **(A)** apresentou dois picos principais nos intervalos de tempo assinalados com traço azul (34,8-35,8 mim) e com traço verde (38,8-40,1 min). No intervalo de tempo azul nota-se a presença do íon em m/z 934,29 **(B)** referente ao fragmento N-terminal da longipina com duas modificações por acetilação (${}^{\text{AC}}\text{SGYI}/\text{LPGK}^{\text{ACE}}$). No intervalo de tempo verde nota-se a presença do íon monocarregado em m/z 1.420,62 e duplamente carregado em m/z 711,15 **(C)** referentes ao fragmento C-terminal do peptídeo com três modificações por acetilação ($\text{YVYK}^{\text{ACYK}^{\text{AC}}\text{GK}^{\text{AC}}\text{VVF}$).

Embora o incremento de massa causado pela modificação química do peptídeo por acetilação fornecesse uma forte evidência da presença de quatro resíduos de Lys na estrutura primária da longipina, esses fragmentos também foram submetidos a sequenciamento “de novo” para a elucidação das suas sequências de aminoácidos.

A interpretação do espectro de DIC do íon duplamente carregado do peptídeo de 933 Da ($[M+2H]^{2+}$, m/z 467,59) confirmou que este é o fragmento contendo a região N-terminal e a presença de um resíduo de Lys na estrutura primária da molécula (figura 24). Foram assinalados no espectro os íons $-y_5$ (564,01), $-y_4$ (471,92), $-y_3$ (374,98), $-y_2$ (317,99), $-y_1$ (147,94), $-b_1$ (130,05), $-a_1$ (102,06), $-b_2$ (187,07), $-b_3$ (349,85) e $-a_3$ (321,97), confirmando a sequência do fragmento: $^{AC}Ser_1-Gly_2-Tyr_3-Ile/Leu_4-Pro_5-Gly_6-Lys^{AC}_7-Glu_8$ (figura 24A).

Na região de baixos valores de m/z do espectro (figura 24B) foram observados os imônios de Ile/Leu (86), Glu (102), Tyr (136) e ϵ -acetil-lisina (143) além de íons relacionados aos imônios de Lys (84), Tyr (91) e ϵ -acetil-lisina (126). Este último formado pela perda neutra de amônia (NH_3 ; -17 Da) do seu imônio (ZHANG et al., 2004). Estão assinalados também nessa região do espectro alguns fragmentos internos do molécula: Pro-Gly (155), Ile/Leu-Pro (220,97), Gly-Lys^{AC} (228,01) e Ile/Leu-Pro-Gly (268).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (933,44 Da) e aferida por Q-ToF/MS (933,18 Da) desse fragmento foi de 0,26 Da.

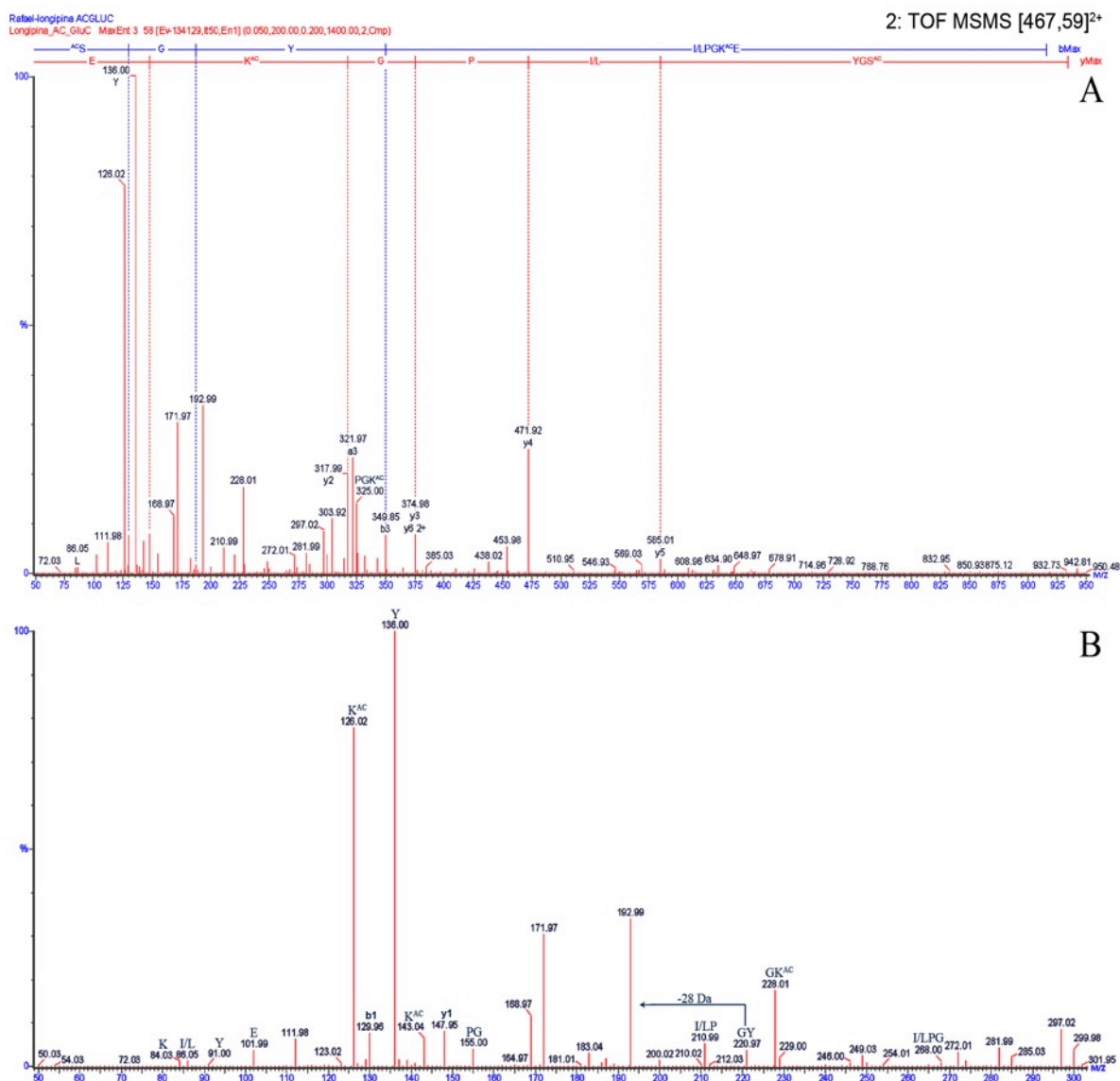


Figura 24- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 933,18 Da obtido após acetilação e digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.125,08 Da. O espectro de DIC (A) do fragmento foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 467,59). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: $^{AC}SGYI/LPGK^{AC}E$. Confirmando a presença de um resíduo de Lys na sequência. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônicos e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como fragmentos internos formados por di e tripeptídeos.

O espectro de DIC do íon duplamente carregado do peptídeo de 1.419,6 Da ($[M+2H]^{2+}$, m/z 710,8) confirmou a presença de três resíduos de Lys na sua estrutura primária e que este é o fragmento da região C-terminal do peptídeo (figura 25). Foram assinalados no espectro todos os íons da série $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), com exceção dos íons $-y_4$, $-y_2$ e $-b_2$, confirmando a sequência de aminoácidos desse fragmento: $Tyr_1-Val_2-Tyr_3-Lys^{AC}_4-Tyr_5-Lys^{AC}_6-Gly_7-Lys^{AC}_8-Val_9-Phe_{10}$ (figura 25A).

A dissociação desse íon também gerou todos os fragmentos internos possíveis do peptídeo (Tabela 3); alguns estão assinalados no próprio espectro (figura 25A).

Na região de baixos valores de m/z do espectro (figura 25B) foram observados os imônios de Ile/Leu (86), Phe (120), Tyr (136) e ϵ -acetil-lisina (143) além de íons relacionados aos imônios de Lys (84) e ϵ -acetil-lisina (126). Estão assinalados também nessa região do espectro os fragmentos internos do molécula: Gly-Lys^{AC} (228,14), Val-Tyr (263,15) e Lys^{AC}-Val (270,19).

A diferença entre a massa molecular monoisotópica teórica (1.419,74 Da) e aferida (1.419,6 Da) desse fragmento foi de 0,14 Da.

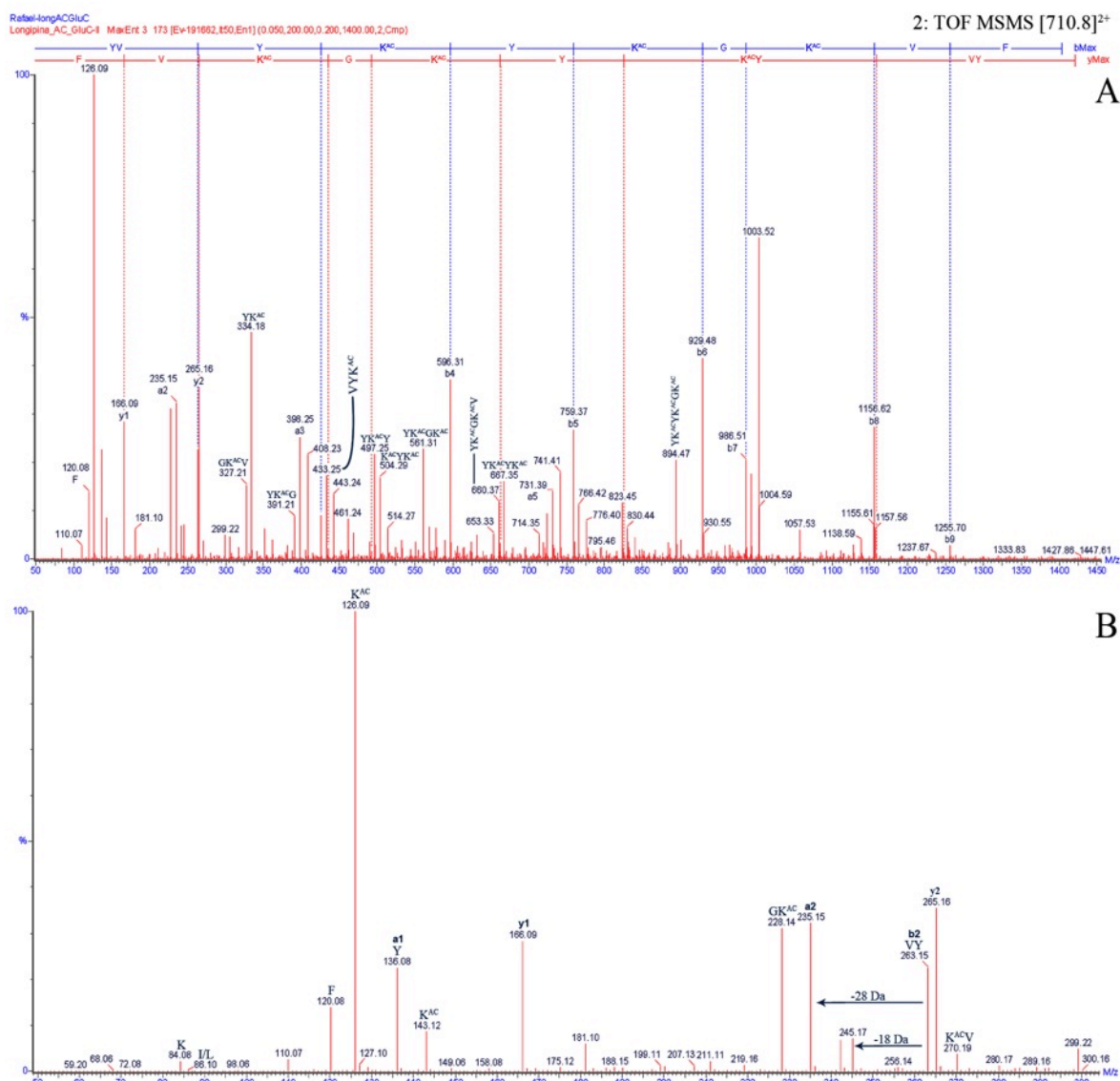


Figura 25- Sequenciamento “de novo” do fragmento de 1.419,6 Da obtido após acetilação e digestão enzimática com endoprotease Glu-C do peptídeo de 2.125,08 Da. O espectro de DIC (A) do fragmento foi adquirido com diferenças de potenciais de 15 V na célula de colisão do seu íon duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$, m/z 710,8). Os íons pertencentes às séries *-y* (vermelho) e *-b* (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: **YVYK^{AC}YK^{AC}GK^{AC}VF**. Confirmando a presença de três resíduos de Lys na sequência. Na região de baixos valores de m/z (B) estão assinalados os íons imônios e relacionados aos resíduos presentes na sequência bem como fragmentos internos formados por dipeptídeos.

Tabela 3- Fragmentos internos presentes no espectros de DIC do fragmento N-terminal obtido após acetilação e digestão com endoprotease Glu-C da longipina. Valores de m/z estão entre parênteses.

Estrutura Primária	Fragmentos Internos		
YVYK ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} VF	GK ^{AC} (228,14)	YK ^{AC} Y (497,25)	VYK ^{AC} YK ^{AC} (766,42)
	VY (263,14)	K ^{AC} YK ^{AC} (504,29)	VYK ^{AC} YK ^{AC} G (823,45)
	K ^{AC} V (270,19)	YK ^{AC} GK ^{AC} (561,31)	K ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} V (830,44)
	GK ^{AC} V (327,21)	YK ^{AC} GK ^{AC} V (660,37)	YK ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} (894,47)
	YK ^{AC} (334,18)	YK ^{AC} YK ^{AC} (667,35)	YK ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} V (993,55)
	YK ^{AC} G (391,21)	YK ^{AC} YK ^{AC} G (724,38)	VYK ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} V (1.092,62)
	K ^{AC} GK ^{AC} (398,25)	K ^{AC} YK ^{AC} GK ^{AC} (731,39)	
	VYK ^{AC} (433,25)		

4.3 Sequenciamento N-terminal

O sequenciamento N-terminal por degradação de Edman dos quinze primeiros resíduos da longipina (SGYLPKDYVYIYNG) confirmou em parte o sequenciamento “de novo” dessa região (ver 4.2). Pois há discordâncias com a sequência obtida por sequenciamento “de novo” nos resíduos das posições 8, 12 e 14. Essas discordâncias não foram consideradas, visto o baixo grau de confiabilidade obtido para esses resíduos durante o sequenciamento N-terminal (ver discussão). Contudo, o sequenciamento por degradação de Edman possibilitou a diferenciação entre os resíduos de Ile e Leu na quarta posição. Assim, verificou-se que nesta posição está presente um resíduo de Leu (Tabela 4), permitindo a completa elucidação de sua estrutura primária da longipina.

Tabela 4- Estrutura primária e outros parâmetros moleculares da longipina.

Estrutura Primária (longipina)	Carga Total (pH 7)	Massa Teórica (Da)	Massa Aferida (Da)	Ponto Isoelétrico ^a (pI)	Coefficiente de Extinção Molar ^b (ε)
SGYLPKKEYVYKYKGVF	+3	2.125,12	2.125,08	9,52	5.960 M ⁻¹ cm ⁻¹

a- calculado com o aplicativo disponível em: <http://expasy.org/tools/protparam.html>;

b- calculado segundo trabalho de Pace, et al. (1995).

Esse peptídeo não apresentou similaridade com nenhum outro peptídeo antimicrobiano conhecido após busca realizada em banco de dados não redundante de proteínas e em banco de dados de peptídeos antimicrobianos. No entanto, a região compreendida entre os resíduos 1-15

apresentou grande similaridade uma heme-lipoproteína do carrapato *Amblyomma americanum* e uma heme-lipoglicoproteína do carrapato *Dermacentor variabilis* (figura 26).

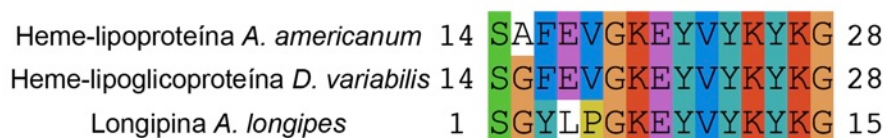


Figura 26- Alinhamento das heme-lipoproteínas dos carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum* com o peptídeo sequenciado do opilião *Acutisoma longipes*. O alinhamento foi realizado com o programa ClustalX.

Após a completa elucidação da estrutura primária da longipina, foi realizada a síntese química da molécula por meio da tecnologia Fmoc, com o intuito de obter-se uma quantidade suficiente do peptídeo para os ensaios biológicos e os estudos de interação com vesículas artificiais.

4.4 Síntese Química da Longipina

4.4.1 Purificação dos Produtos de Síntese

O peptídeo de 2.125 Da (longipina) presente na fração com atividade anti-*M. luteus* **ALP40%-44_12**, cuja estrutura primária foi completamente elucidada por meio de sequenciamento “de novo” e degradação de Edman, foi sintetizado quimicamente em fase sólida utilizando-se a resina Fmoc-Phe-2-cloro-tritil (ver 3.6). O material com os produtos da síntese obtidos após a desproteção e clivagem das cadeias formadas (ver 3.6.3) foi liofilizado e ressuspendido em DMF para sua purificação por CLAE (ver 3.6.4).

O perfil cromatográfico (figura 27A) evidenciou a impureza do material bruto. Todos picos foram coletados manualmente e analisados por espectrometria de massas, dentre os quais a presença do íon monocarregado referente à massa molecular monoisotópica da longipina sintética ($[M+H]^+$, m/z 2.126,03) foi detectado com maior intensidade relativa no espectro de MALDI-ToF da fração **LS-T7**, eluída a aproximadamente 30% de ACN (figura 27B). No entanto, nesta mesma fração, foram observados outros íons

contaminantes referentes a peptídeos com a região N-terminal bloqueada por acetilação (AC). Esse procedimento era realizado quando, após etapas de acoplamento, ainda eram observados valores de m/z nos espectros de massa referentes a cadeias peptídicas com a região N-terminal livre, ou seja, cadeias peptídicas onde não ocorreu o acoplamento do Fmoc-aminoácido (ver 3.6.2, §4):

- m/z 1.173,57 AC-Val₁₀ → cadeia peptídica até a Val na décima posição;
- m/z 1.336,41 AC-Tyr₉ → cadeia peptídica até a Tyr na nona posição;
- m/z 1.465,66 AC-Glu₈ → cadeia peptídica até Glu na oitava posição;
- m/z 1.593,75 AC-Lys₇ → cadeia peptídica até Lys na sétima posição;
- m/z 1.747,85 AC-Gly₆ → cadeia peptídica até Gly na sétima posição.

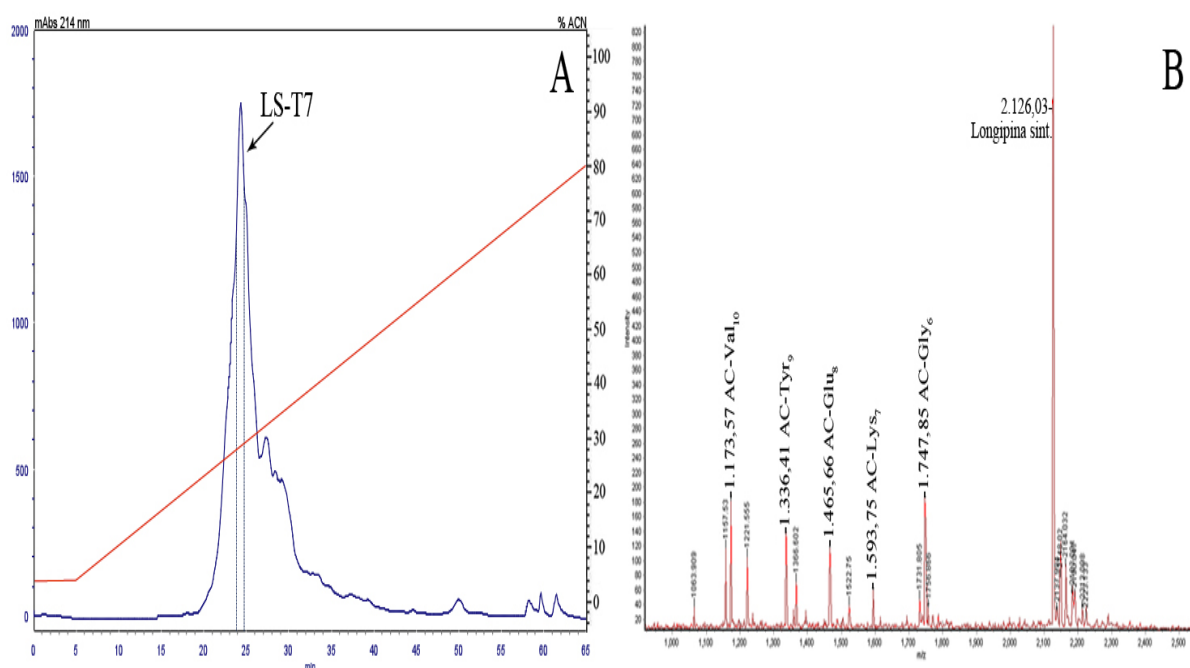


Figura 27- Purificação por CLAE do material bruto obtido da síntese química em fase sólida da longipina e avaliação da fração LS-T7 por MALDI-ToF/MS. Foi utilizada uma coluna preparativa Shim-pak PREP-ODS (5 μ m, 20 \times 250 mm) com um gradiente linear de 5 a 80% de ACN/TFA 0,1% em H₂O/TFA 0,1% durante 60 min sob fluxo de 8 mL/min (A). A fração LS-T7 apresentou o valor de massa da longipina sintética (m/z 2.126,03) com maior abundância relativa no espectro de MALDI-ToF (B).

4.4.2 Avaliação do Grau de Pureza

A fração **LS-T7** contendo a longipina sintética foi liofilizada e o material pesado e ressuspenso em H₂O Milli-Q para avaliação do grau de pureza. Uma pequena amostra (20 µg) do material foi submetida a CLAE utilizando-se uma coluna de fase reversa analítica (ver 3.7.5).

O cromatograma da análise apresentou três picos principais (figura 28A), que foram coletados e avaliados por espectrometria de massas. A fração **LS-T7_2**, eluída com 24,3% de ACN, coletada do pico com maior intensidade no cromatograma (aprox. 370 mAbs), mostrou conter os íons com quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,89), três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 710,03) e duas ($[M+2H]^{2+}$, m/z 1.064,56) cargas do peptídeo sintético após análise por ESI/MS (figura 28B). Esses íons com diferentes cargas puderam ser convoluídos numa massa molecular média de 2.127,5 Da. A diferença entre o valor de massa aferido e a massa molecular média teórica da longipina (2.126,49 Da) foi de 1,01 Da.

É possível também notar no espectro (figura 28B) diferentes estados de ionização desse peptídeo carregados com pelo menos um aduto de potássio (K): $[M+K+3H]^{4+}$, m/z 542,4; $[M+K+2H]^{3+}$, m/z 722,66; $[M+K+H]^{2+}$, m/z 1.083,57. Fato evidenciado pela diferença de 39 Da (massa do íon K) entre as massas do peptídeo (2.127,5 Da) e a massa convoluída dos seus íons com um aduto do elemento (2.166,66 Da).

A relação entre a área do pico da longipina ($A_{\text{LS-T7}_2}$ = 38,05;) e a soma das áreas de todos os picos ($A_{\text{LS-T}_1+\text{T}_2+\text{T}_3}$ = 53,91) permitiu determinar o grau de pureza do peptídeo sintético, que ficou em 70,6% (figura 28B).

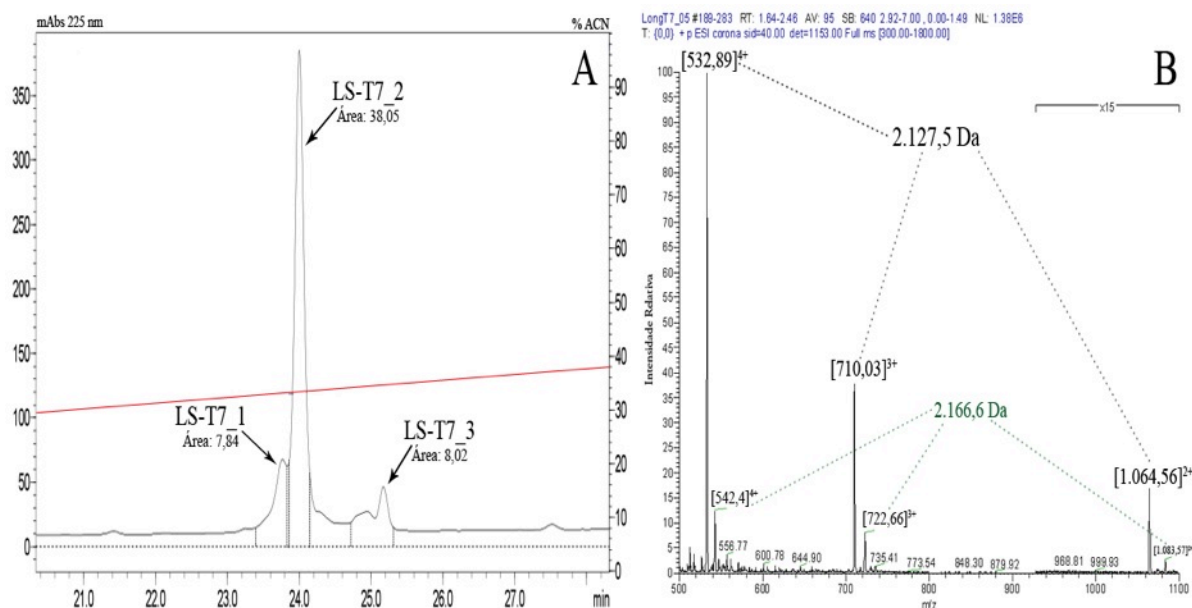


Figura 28- Análise por CLAE para avaliação do grau de pureza do peptídeo sintético obtido na fração LS-T7 da purificação dos produtos da síntese. Na cromatografia foi utilizada uma coluna de fase reversa analítica Shim-pak VP-ODS (5 μ M, 4,6 mm \times 250 mm) em um gradiente linear de 15 a 40% de ACN/TFA 0,05% em H₂O/TFA 0,05% durante 28 min sob fluxo de 1 mL/min (A). Foram observados três picos principais e suas áreas utilizadas para o cálculo do grau de pureza do material (70,6%). O principal pico (LS-T7_2) mostrou-se pertencente à longipina sintética após análise por ESI/MS do seu conteúdo (B), pois seu espectro apresentou os íons com quatro ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,89), três ($[M+3H]^{3+}$, m/z 710,03) e duas ($[M+3H]^{3+}$, m/z 710,03) cargas que foram convoluídos na massa molecular média do peptídeo (2.127,5 Da). No espectro também foi possível notar o peptídeo detectado com pelo menos um aduto de potássio (2.166,66 Da) em diferentes estados de ionização: $[M+K+3H]^{4+}$, m/z 542,4; $[M+K+2H]^{3+}$, m/z 722,66; $[M+K+H]^{2+}$, m/z 1.083,57. A intensidade relativa da região de altos valores de m/z foi ampliada em 15 vezes para melhor visualização dos íons.

4.4.3 Espectros de DIC da Longipina Nativa e Sintética

A longipina sintética foi submetida a análise por LC-Q-ToF-MS/MS utilizando-se os mesmos parâmetros para a obtenção e processamento do espectro de DIC do íon com quatro cargas da molécula nativa (figura 21A e ANEXO). O espectro de fragmentação processado do íon com quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,26) da molécula sintética (em verde) pode então ser comparado com o da longipina nativa (azul) para a confirmação do sequenciamento “de novo” do peptídeo (figura 29). Para isso o espectro da molécula sintética foi rebatido, a intensidade relativa de ambos foi normalizada e aumentada 2,5 vezes, com o auxílio do software mMass 3.9 (STROHALM et al., 2010), para a melhor visualização e comparação dos íons.

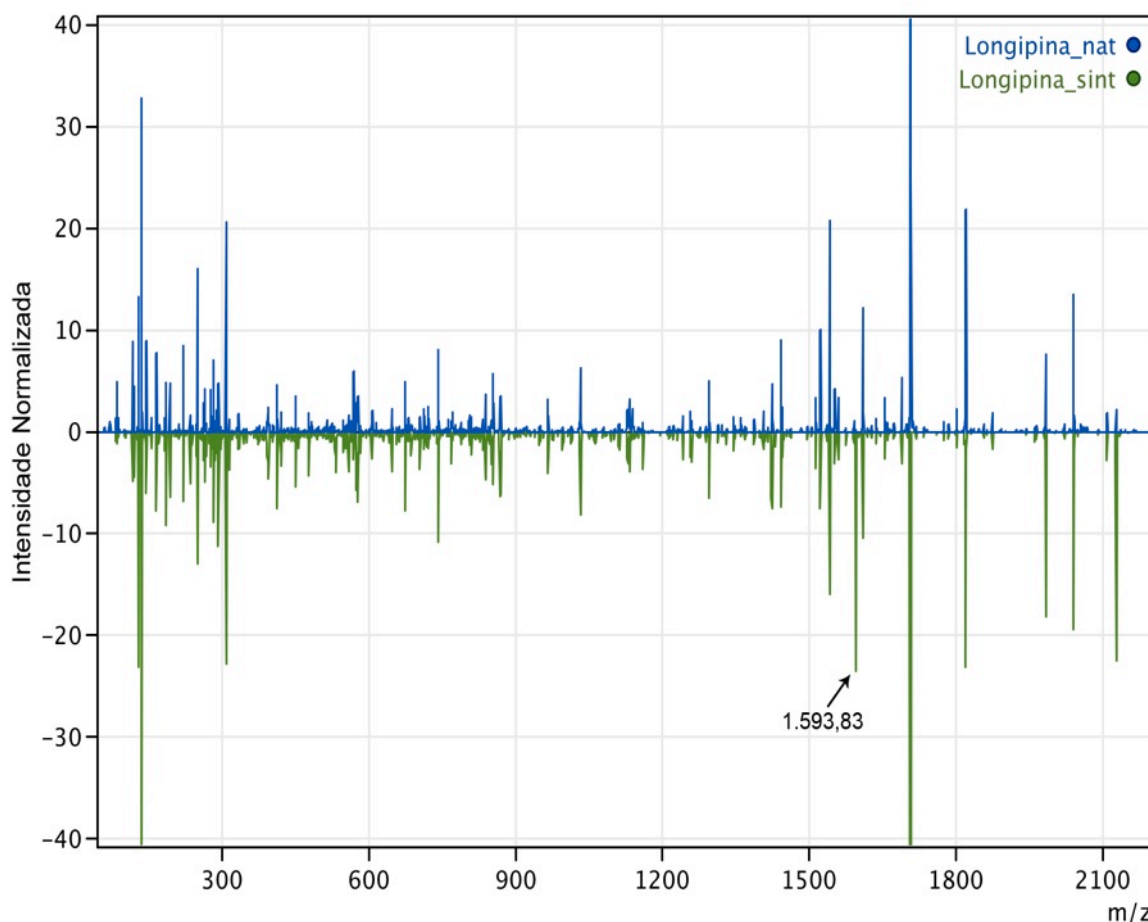


Figura 29- Comparação entre os espectros de DIC da longipina nativa (azul) e sintética (verde). O espectro de fragmentação do íon com quatro cargas da molécula sintética foi adquirido com os mesmos parâmetros utilizados para a longipina nativa; em diferença de potencial de 20 V na célula de colisão. O espectro da molécula sintética foi rebatido, ambos foram normalizados e as intensidades aumentadas 2,5 vezes.

Houve uma grande semelhança entre os espectros, com pequenas diferenças na intensidade de alguns íons. Nota-se a presença do íon em m/z 1.593,83 no espectro da longipina sintética. Na região de baixos valores de m/z no espectro do peptídeo sintético, diferentemente do nativo, os íons imônios dos resíduos presentes na sequência apresentaram baixas intensidades relativas. A intensidade do íon monocarregado do peptídeo ($[M+H]^+$, m/z 2.126,07) foi outra diferença notável, pois no espectro da molécula sintética ele se encontra mais intenso que no espectro da nativa.

4.5 Atividade Antimicrobiana e Hemolítica da Longipina Sintética

A longipina sintética foi utilizada em ensaios de inibição do crescimento microbiano (ver 3.3.2) de bactérias e leveduras para a determinação do seu espectro de atividade bem como a obtenção do intervalo da concentração mínima inibitória (CMI).

Na **tabela 5** estão presentes os resultados obtidos na determinação da CMI do peptídeo contra diferentes microorganismos.

Tabela 5- Espectro de atividade e intervalo da CMI da longipina sintética.

Microorganismos	Intervalo da CMI ^a
-bactérias Gram-positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	ND
<i>Micrococcus luteus</i> A270	50-100 µM
-bactérias Gram-negativas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC14502	ND
<i>Escherichia coli</i> SBS 363	50-100 µM
-leveduras	
<i>Candida albicans</i> MDM8	50-100 µM
<i>Candida albicans</i> IOC 4558	50-100 µM
<i>Candida tropicalis</i> IOC 4560	12,5-25 µM

a- intervalo de concentrações a inibir total e parcialmente o crescimento do microorganismo;

ND- CMI não detectada na máxima concentração testada (100 µM).

O peptídeo sintético mostrou possuir uma maior atividade contra a inibição do crescimento da levedura *C. tropicalis* dentre todos os microorganismos avaliados (CMI 12,5-25 µM). Além de também ser ativo, assim como o peptídeo nativo, contra a bactéria Gram-positiva *M. luteus*.

O ensaio de atividade hemolítica, utilizando-se eritrócitos humanos (ver 3.3.3), evidenciou que a 100 µM e em todas as outras concentrações inferiores testadas, o peptídeo não causou o rompimento das células.

4.6 Ligação da Longipina a Vesículas Unilamelares Grandes

4.6.1 Ensaio com Filtros Amicon - 100 kDa

A ligação da longipina a LUVs formadas somente por POPG ou POPC foi avaliada por meio de ensaio em filtro para moléculas de até 100 kDa (em 3.9, § 1 e 2), o que permite a passagem do peptídeo (2 kDa) e retém as vesículas após filtração. O peptídeo foi previamente incubado na razão molar *P/L* de 1:50.

A fluorescência detectada (figura 30) na solução filtrada da longipina incubada com vesículas de POPC (**long+POPC filtração**) indica que o peptídeo não foi capaz de se ligar a vesículas constituídas por esse fosfolípido de cabeça polar zwitteriônica (carga total neutra). Além do mais, o valor de intensidade da fluorescência se assemelha com o filtrado da solução de longipina sem vesículas (**long filtração**) que, por sua vez, possui menor valor de intensidade da fluorescência que uma solução 20 μM do peptídeo (**long 20 μM**), indicando que uma porcentagem das moléculas ficou retida no filtro.

O peptídeo apresentou ligação preferencial a vesículas formadas pelo fosfolípido POPG (figura 30), cuja cabeça polar possui uma carga negativa. Esse fato foi evidenciado pela semelhança entre a intensidade de fluorescência da solução filtrada do peptídeo incubado com vesículas de POPG (**long+POPG filtração**) e a intensidade de fluorescência do tampão utilizado no ensaio (NaCl 10 mM). A fluorescência do tampão é obtida pelo efeito espalhamento de luz causado pela solução.

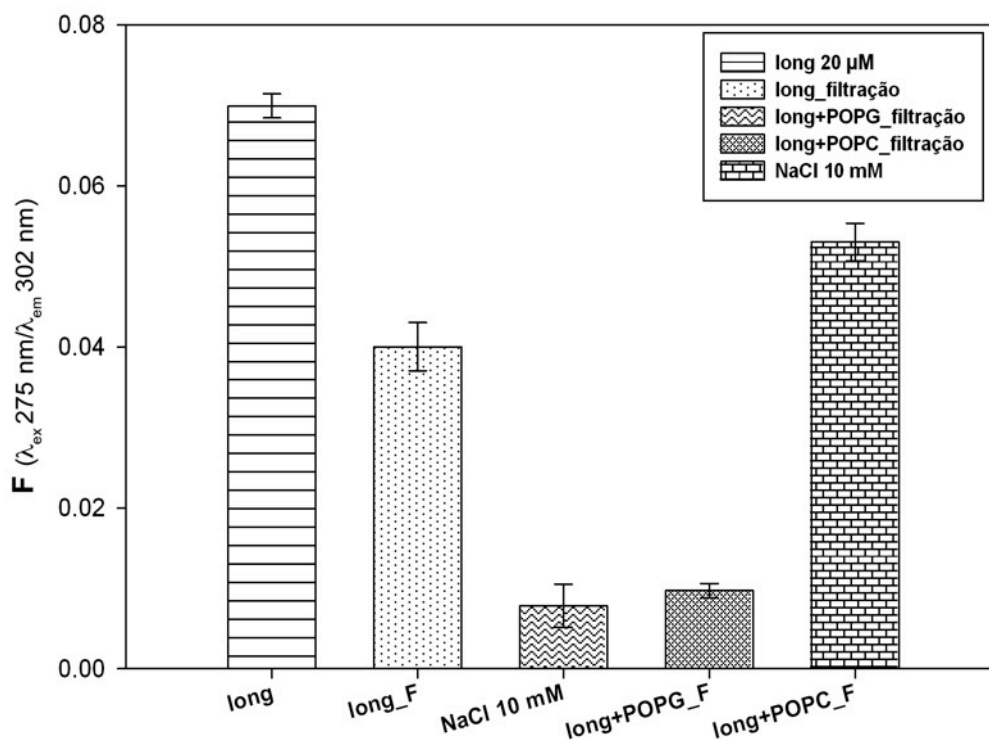


Figura 30- Fluorescência dos filtrados de soluções de longipina 20 μM incubadas durante 30 min com vesículas formadas por POPG ou POPC na relação 1:50 (mol:mol) P/L em NaCl 10 mM. A fluorescência (F) dos filtrados foi medida em comprimentos de onda de 275 nm de excitação e 302 nm de emissão ($\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}/\lambda_{em} = 302 \text{ nm}$). **long 20μM** – solução 20 μM de longipina sem vesículas; **long filtração** – filtrado de solução 20 μM de longipina; **long+POPG filtração** – filtrado do peptídeo incubado com vesículas de POPG; **long+POPC filtração** – filtrado do peptídeo incubado com vesículas de POPC; **NaCl 10 mM** – solução tampão.

4.6.2 Titulação da Longipina com LUVs

Foi observado um aumento na intensidade da fluorescência relativa (F/F_0) do peptídeo na titulação com vesículas (em 3.9, § 3) formadas por POPG ou POPG:POPC 1:1 (mol:mol). Por outro lado, a intensidade da fluorescência relativa da molécula não se alterou em concentrações crescentes de vesículas com superfície zwitteriônica, constituídas somente por POPC (figura 31).

A saturação em POPG foi atingida a uma concentração de 0,1 mM de fosfolípido (razão molar P/L de 1:5), enquanto em POPG:POPC 1:1 a saturação foi obtida com 1 mM de fosfolípido (razão molar P/L de 1:50).

Esses resultados indicaram que a interação da longipina nesse sistema mimético foi favorecida pela adição de fosfolípidios com cabeça polar de caráter aniônico, que contribuíram para o aumento no número de cargas

negativas na superfície da vesícula. Sugerindo que forças eletrostáticas atrativas entre as vesículas (superfície negativa) e o peptídeo, cuja carga total é positiva (+3) em pH neutro, sejam importantes para que ocorra interação peptídeo–membrana.

O aumento na fluorescência relativa do peptídeo na titulação com vesículas de POPG e POPG:POPC também sugere que a molécula, ou pelo menos parte dos resíduos de Tyr, passaram para um ambiente menos polar.

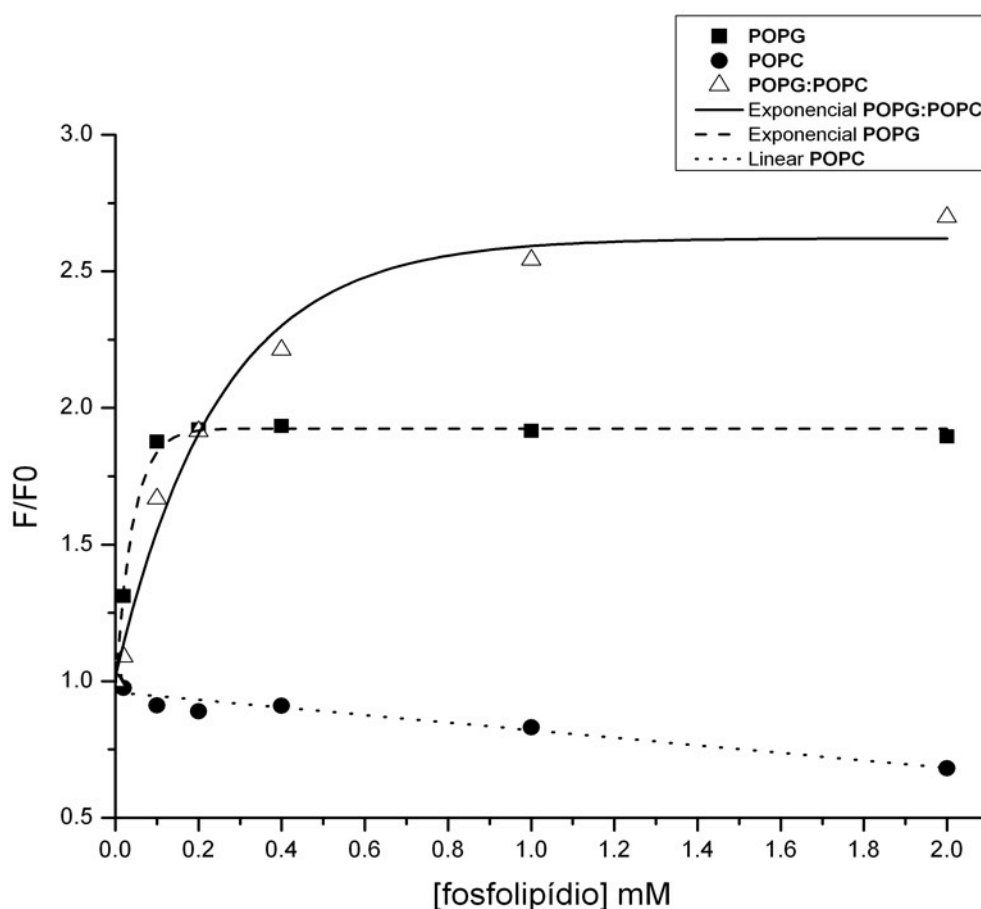


Figura 31- Titulação da longipina (20 µM) com vesículas unilamelares. O gráfico mostra a variação da intensidade da fluorescência relativa (F/F_0) do peptídeo ($\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}/\lambda_{em} = 302 \text{ nm}$), em concentrações crescentes de fosfolípidios (mM) presentes nas vesículas formadas por POPG (■), POPC (●) e POPC:POPG 1:1 (△). Os pontos foram ajustados com curvas exponenciais; POPG (---), POPC (....) e POPG:POPC (—).

Os valores obtidos para a constante de ligação aparente (K_b) e as equações das curvas ajustadas na titulação do peptídeo com vesículas (figura 31) estão apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6- Valores da constante de ligação aparente (K_b) e de F/FO máxima ($F/FO_{\text{máx}}$) obtidos pela equações das curvas ajustadas na titulação da longipina com LUVs.

Composição das vesículas	$K_b \times 10^{-3} (\text{M}^{-1})$	$F/FO_{\text{máx}}$	Equação da curva
POPG	34,04	1,93	$y = 1,93 - 0,94 \times (4,6 \times 10^{-11})^x$
POPG:POPC (1:1)	5,85	2,62	$y = 2,62 - 1,61 \times (1,8 \times 10^{-2})^x$

O valor de K_b para na interação peptídeo-membrana em vesículas compostas por POPG mostrou-se maior que o valor obtido para vesículas compostas por POPG:POPC. Indicando uma maior afinidade da longipina pelo primeiro sistema mimético nas condições utilizadas, devido, possivelmente, à maior quantidade de cargas negativas na superfície dessas vesículas.

A intensidade da fluorescência relativa máxima ($F/FO_{\text{máx}}$) obtida no sistema de vesículas compostas por POPG:POPC (1:1 mol:mol) foi aproximadamente 36% maior do que na titulação com vesículas compostas por POPG. Indicando a longipina encontra-se em um ambiente menos polar na interação com vesículas formada por POPG:POPC, mas não necessariamente que está mais inserida na bicamada.

4.6.3 Influência da Força Iônica do Meio

A ligação da longipina a LUVs compostas por POPG:POPC 1:1 em quatro diferentes concentrações de NaCl (1, 10, 50 e 200 mM) no meio foi realizada para verificar a influência do aumento da força iônica do ambiente na interação peptídeo-membrana (em 3.9, § 4).

É possível notar que o aumento na força iônica do meio – proporcional ao aumento na concentração de NaCl – influenciou na ligação da longipina às LUVs (figura 32). Até que, a 200 mM de NaCl, não foi mais observada variação da fluorescência relativa à medida que foi aumentada a concentração de fosfolipídios.

Quando maior a força iônica do meio, menores foram os valores de K_b observados para as curvas ajustadas nas concentrações de 1, 10 e 50 mM. No entanto, não foi verificada alterações nos valores de $F/FO_{\text{máx}}$ (Tabela 7).

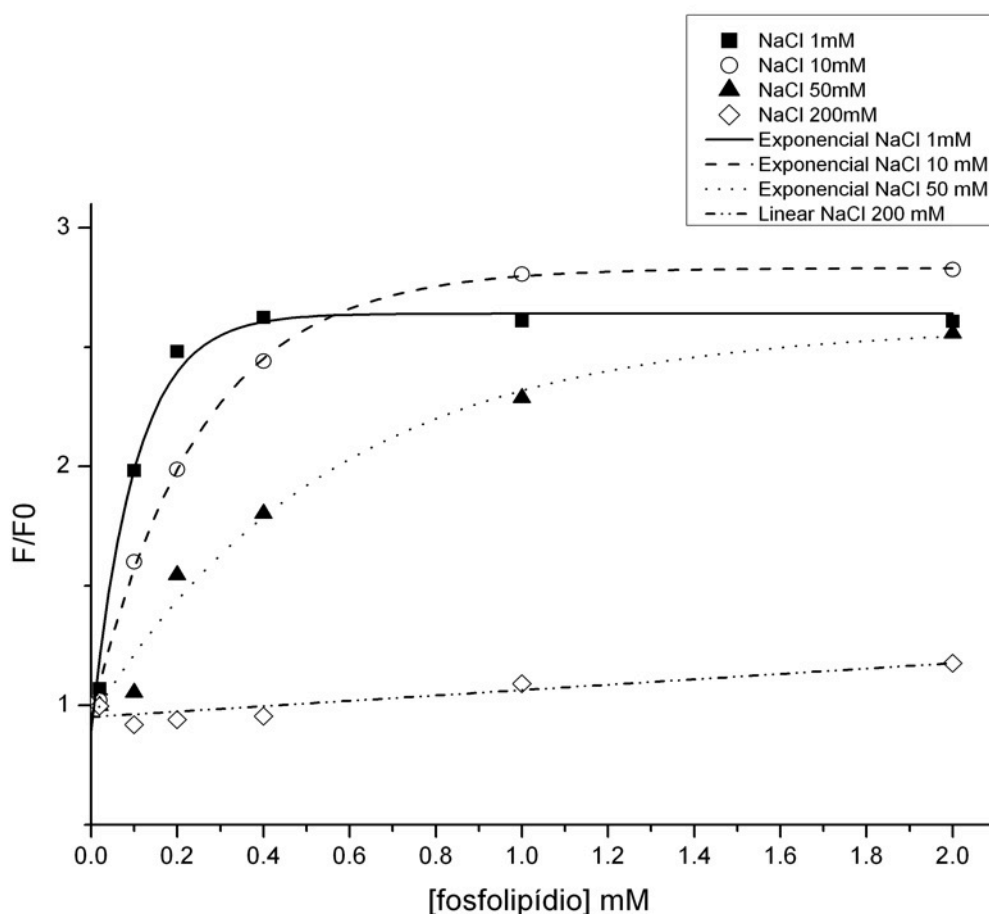


Figura 32- Influência da força iônica do meio na ligação da longipina a LUVs compostas por POPG:POPC 1:1. A fluorescência relativa (F/F_0) do peptídeo ($\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}/\lambda_{em} = 302 \text{ nm}$) foi monitorada em concentrações crescentes do vesículas em quatro diferentes concentrações de NaCl do meio: 1mM (■), 10 mM (○), 50 mM (▲) e 200 mM (◇). Os conjuntos de pontos foram ajustados em reta [200 mM (---)] e curvas exponenciais [1mM (—), 10 mM (---), 50 mM (....)].

Tabela 7- Valores da constante de ligação aparente (K_b) e de F/F_0 máxima ($F/F_{0\text{máx}}$) obtidos pela equações das curvas ajustadas na titulação da longipina com LUVs em diferentes forças iônicas do meio.

[NaCl] mM	$K_b \times 10^{-3} (\text{M}^{-1})$	$F/F_{0\text{máx}}$	Equação da curva
1	13,09	2,64	$y = 2,64 - 1,74 \times (5,26 \times 10^{-5})^x$
10	5,85	2,83	$y = 2,83 - 1,88 \times (1,8 \times 10^{-2})^x$
50	2,51	2,59	$y = 2,59 - 1,65 \times (1,6 \times 10^{-1})^x$

4.6.4 Supressão da Fluorescência da Longipina

O valores de intensidade de fluorescência de resíduos de Tyr da longipina em solução e na presença de vesículas (POPG ou POPG:POPC 1:1) em NaCl 10 mM foram obtidos por meio do ensaio de supressão de

fluorescência (ver 3.10) e plotados num gráfico de $F0/F \times [\text{Acrilamida}]$ (figura 33). Os pontos obtidos nos três ensaios (solução; POPG; POPG:POPC 1:1) foram ajustados a equações lineares em dois intervalos independentes no eixo das abscissas: entre 0 e 0,3 M e entre 0,4 e 0,7 M de acrilamida.

A supressão da fluorescência de resíduos de Tyr da longipina em solução por moléculas de acrilamida foi mais eficiente do que a supressão do peptídeo na presença de vesículas, dada a maior inclinação da reta nos dois intervalos de concentração de acrilamida considerados (figura 33).

Foi possível avaliar de maneira quantitativa a eficiência da supressão pelo valor da constante de Stern-Volmer (K_{SV}), referentes ao coeficiente angular das retas ajustadas. Nota-se que em ambos intervalos de concentração de acrilamida considerados, o valor da K_{SV} é maior para o peptídeo em solução do que na presença de vesículas (Tabela 8).

Esses resultados indicam que no sistema mimético formado por vesículas compostas por POPG ou POPG:POPC 1:1, a longipina, ou parte dela contendo resíduo(s) de Tyr, encontra-se mais protegida do efeito supressor da acrilamida na solução.

Tabela 8- Valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e das equações de retas obtidas no ensaio de supressão de fluorescência da longipina em dois intervalos de concentrações de acrilamida considerados: 0-0,3 e 0,4-0,7 M.

	Intervalo de concentração de acrilamida			
	0-0,3 M		0,4-0,7 M	
longipina	K_{SV} (M^{-1})	Equação da reta	K_{SV} (M^{-1})	Equação da reta
Solução	4,99	$y = 1+4,99x$	20,96	$y = -4,72+20,96x$
POPG	1,06	$y = 1+1,06x$	7,9	$y = -1,04+7,9x$
POPG:POPC	2,22	$y = 1+2,22x$	4,52	$y = 0,35+4,52x$

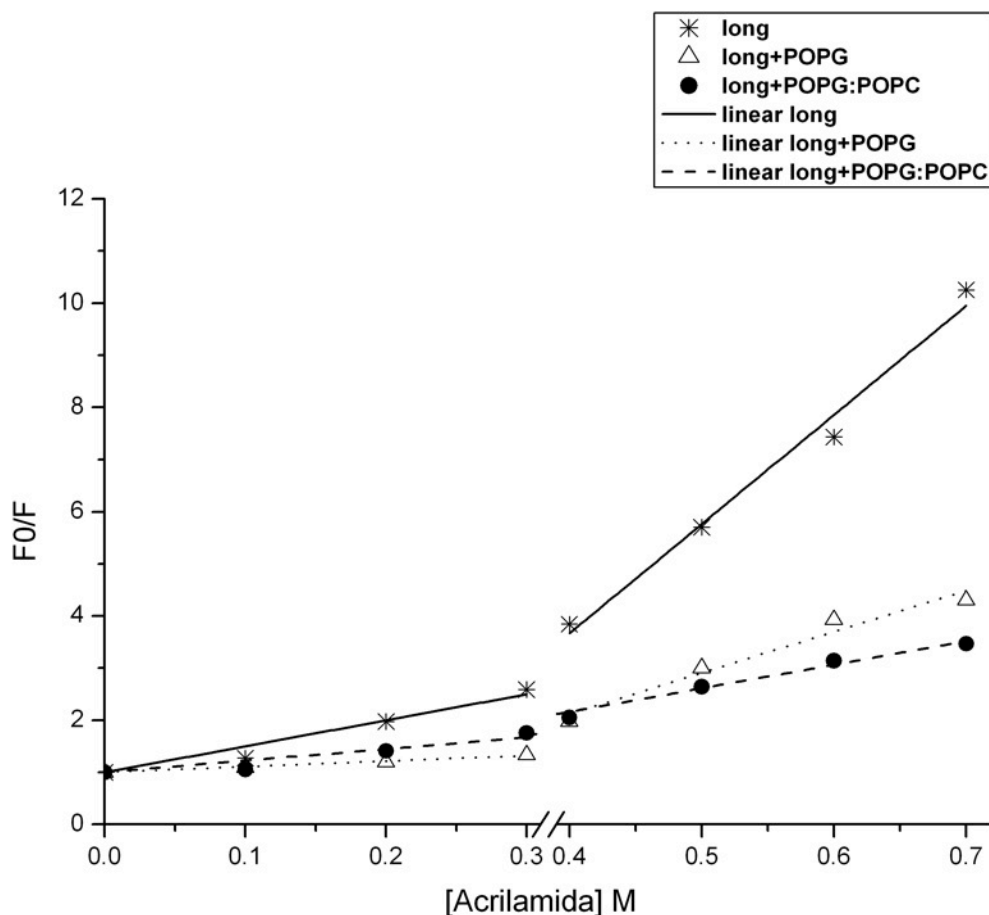


Figura 33- Ensaio de supressão da fluorescência do peptídeo, em solução ou na presença de LUVs, a concentrações crescentes de acrilamida. A supressão da fluorescência de resíduos de Tyr ($\lambda_{ex} = 275 \text{ nm}/\lambda_{em} = 302 \text{ nm}$) da longipina ($20 \mu\text{M}$) foi avaliada em solução (* long) ou na presença de 1 mM de fosfolípidios em vesículas de POPG (Δ long+POPG) ou POPG:POPC 1:1 (\bullet long+POPG:POPC). Os pontos foram ajustados em dois intervalos independentes de concentração de acrilamida (0-0,3 e 0,4-0,7 M) para a obtenção dos valores da K_{sv} .

4.6.5 Alteração da Permeabilidade da Bicamada

A capacidade da longipina induzir o aumento na permeabilidade da bicamada fosfolipídica foi verificada pela adição do peptídeo ($20 \mu\text{M}$) em vesículas compostas por POPG:POPC (1:1, mol:mol) na concentração 1 mM carregadas com carboxifluoresceína (CF) 80 mM e filtradas em 80 mM de NaCl (em 3.8, § 3 [preparação das vesículas carregadas com CF]; ver 3.10 [ensaio de permeabilidade]). O monitoramento da CF foi feito a $\lambda_{ex} = 474 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 518 \text{ nm}$.

A longipina (Longipina $20 \mu\text{M}$), adicionada à solução com vesículas em aproximadamente 220 s, foi capaz de causar extravasamento de CF do

interior dos lipossomas, como evidenciado pelo aumento da fluorescência normalizada ($F_{\text{normalizada}}$) da solução ao longo do período de tempo monitorado (figura 34). Porém, o extravasamento do fluoróforo ocorreu com menor intensidade quando comparado ao causado pela adição de melitina 20 μM , um potente peptídeo antimicrobiano isolado do veneno de abelhas capaz de formar poros toroidais em membranas artificiais (YANG et al., 2001).

No período de tempo observado (até 2.500 s), a longipina foi capaz de causar o extravasamento de CF do interior dos lipossomas correspondente a aproximadamente 38% do total de fluorescência obtida após adição de Triton X-100 na concentração final de 0,1% (v/v). Por outro lado, a adição de melitina na solução com vesículas causou 100% do total de fluorescência em aproximadamente 1.250 s. No controle negativo do aumento da permeabilidade das vesículas (LUV-CF), o extravasamento de CF correspondeu a aproximadamente apenas 5% do total obtido após a adição de Triton X-100.

Podemos observar no gráfico que com ambos peptídeos ocorre inicialmente um de rápido aumento da fluorescência seguido por um aumento mais lento.

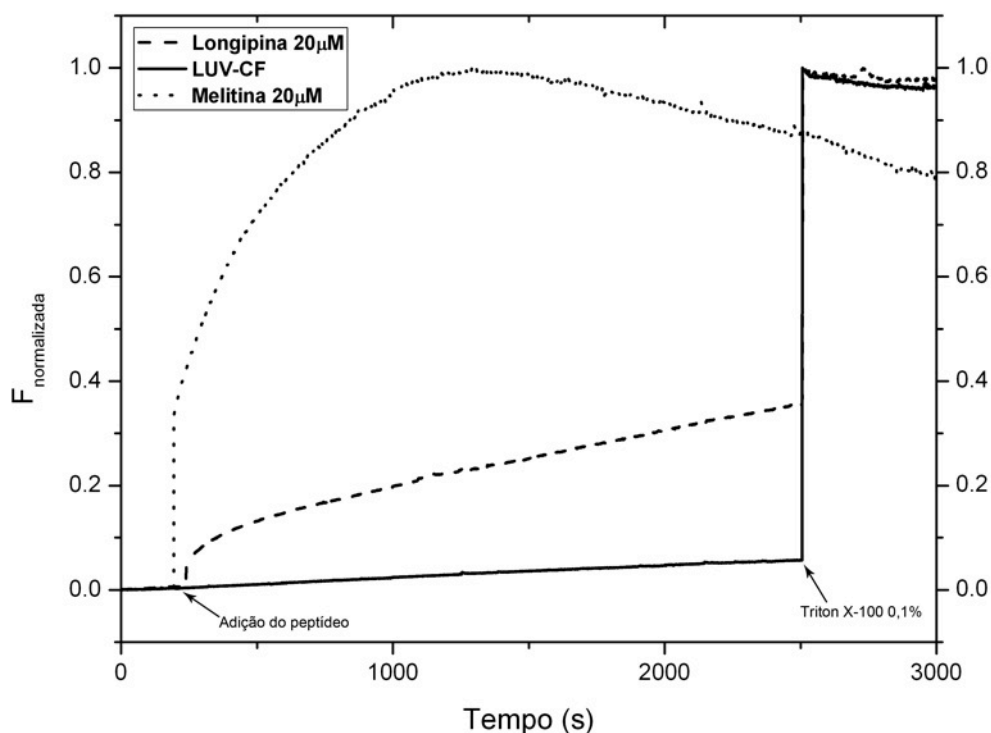


Figura 34- Ensaio de alteração da permeabilidade de vesículas em NaCl 80 mM. Foram utilizadas LUVs formadas por POPG:POPC (1:1) carregadas com 80 mM de carboxifluoresceína filtradas em NaCl 80 mM. Em aproximadamente 200 s foi adicionado o peptídeo: longipina (---) ou melitina (....) na concentração final de 20 μM . No controle (—LUV—CF) após 200 s foi adicionada uma solução de NaCl 80 mM. A adição de Triton X-100 na concentração final de 0,1% em 2.500 s foi feita para a obtenção da máxima fluorescência liberada pelo rompimento das vesículas a fim de se normalizar os dados. O monitoramento da carboxifluoresceína foi feito a $\lambda_{\text{ex}} = 474 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$.

A influência da alteração da força iônica do meio e da concentração da longipina na indução do extravasamento de CF do interior das vesículas foi verificada pela adição do peptídeo em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 20 μM) em 1 mM de vesículas de POPG:POPC 1:1 carregadas com 80 mM de CF e filtradas em NaCl 10 mM/sacarose 140 mM (solução de menor força iônica que o ensaio da **figura 34**). A sacarose nessa concentração foi utilizada para equilibrar a pressão osmótica da solução externa com a do interior das vesículas. A longipina foi adicionada em 200 s e em 1.800 s, Triton X-100 na concentração final de 0,1% (v/v) com o intuito de obter o máximo de fluorescência emitida pelo rompimento das vesículas (figura 35).

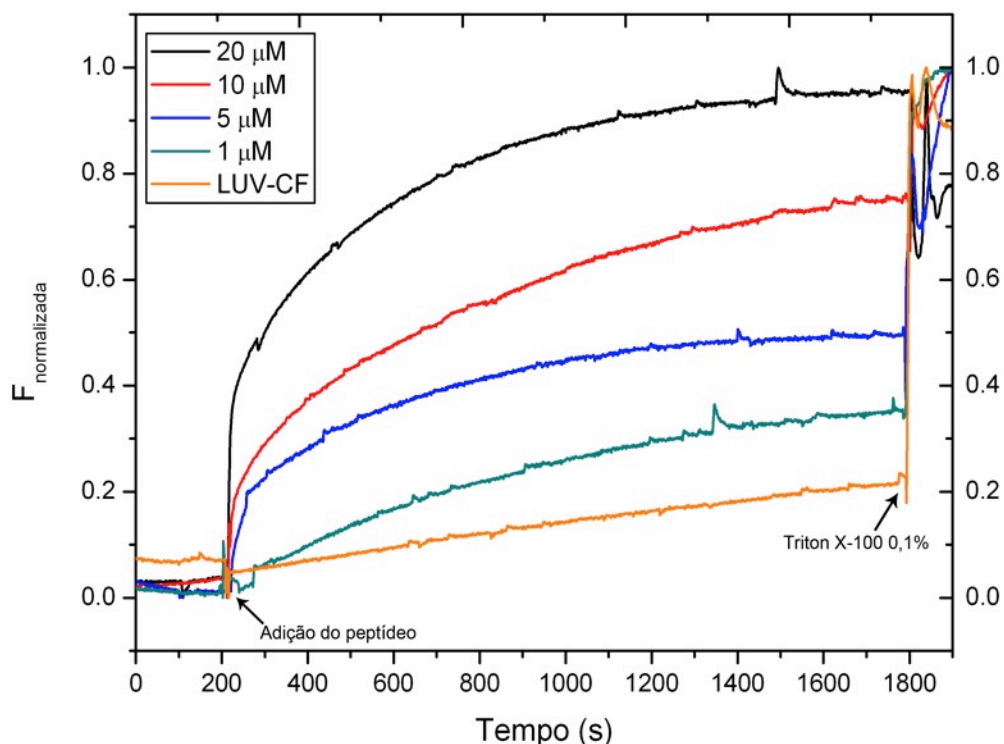


Figura 35- Ensaio de alteração da permeabilidade de vesículas em NaCl 10 mM/sacarose 140 mM. Foram utilizadas LUVs formadas por POPG:POPC (1:1) carregadas com 80 mM de carboxifluoresceína e filtradas em NaCl 10 mM/sacarose 140 mM. Em aproximadamente 200 s foi adicionada longipina na concentração final de 1 μ M (verde), 5 μ M (azul), 10 μ M (vermelho) ou 20 μ M (preto). No controle de vesículas (laranja), após 200 s, foi adicionada uma solução de NaCl 10 mM/sacarose 140 mM. A adição de Triton X-100 na concentração final de 0,1% em 1.800 s foi feita para o obtenção da máxima fluorescência liberada pelo rompimento das vesículas a fim de se normalizar os dados. O monitoramento da carboxifluoresceína foi feito a $\lambda_{ex} = 474$ nm e $\lambda_{em} = 518$ nm.

Pela **figura 35** é possível notar que a longipina é capaz de induzir o extravasamento da CF do interior das vesículas de uma maneira concentração-dependente. Ao final do monitoramento, o peptídeo na concentração de 20 μ M causou 100% de liberação da CF aprisionada no interior das vesículas seguido de 78, 50 e 30% para a longipina nas concentrações de 10, 5 e 1 μ M, respectivamente.

4.7 Análise Conformacional da Longipina

A análise das estruturas secundárias presentes no peptídeo em solução em sistema de vesículas multilamelares (MLVs) foi realizada por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (ver 3.12). O estudo de estruturas secundárias por essa técnica baseia-se na

absorbância de grupos carbonila (C=O), adjacentes às ligações peptídicas, na região amida I' (1700 – 1600 cm^{-1}) do espectro. Como a frequência vibracional – de estiramento – desse grupo depende da estrutura secundária (α -hélice, estruturas β ou desordenada), sua absorbância pode ocorrer em diferentes comprimentos de onda na região amida I' do espectro (SUSI; TIMASHEFF; STEVENS, 1967).

Os espectro deconvoluídos (em 3.12, § 4) na região amida I' do peptídeo em solução (D_2O) ou na presença de MLVs compostas por POPC (figura 36) apresentaram-se bastante semelhantes, exceto pelo aparecimento de um “ombro” a 1.654 cm^{-1} em POPC característico de estruturas em α -hélice. Ambos encontraram-se centrados na região de 1.643 cm^{-1} – comprimento de onda relacionado a estruturas desordenadas. Contudo, foi verificada uma grande diferença do espectro na região amida I' da longipina em POPG:POPC 1:1. Neste sistema aniônico foi notada, principalmente, a intensificação da banda em 1.613 cm^{-1} e o aparecimento de outra em 1.683 cm^{-1} , ambas características de regiões em estruturas β .

Esses resultados indicam que a longipina encontra-se majoritariamente desordenada em solução e adquire estruturas secundárias mais definidas ao interagir com o sistema aniônico formado por POPG:POPC. Este fato demonstrou que os fosfolipídios com cabeça polar negativa possuem importante papel na estruturação do peptídeo nesse sistema, já que a molécula apresentou-se mais desordenada no sistema formado somente por fosfolipídios zwitteriônicos (POPC).

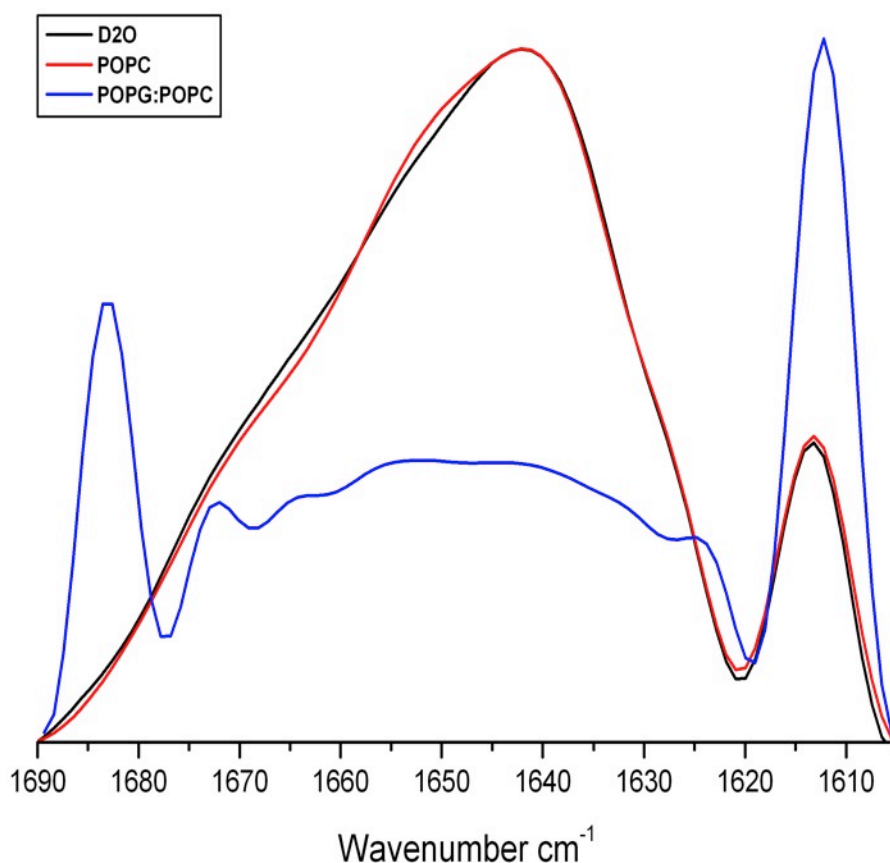


Figura 36- Comparação dos espectros deconvoluídos da região amida I' da longipina. Os espectros da longipina em solução (D_2O) ou na presença de vesículas multilamelares compostas por POPC ou POPG:POPC 1:1 (mol:mol) subtraídos do espectro sem o peptídeo e deconvoluídos com valores de 18 cm^{-1} para largura de bandas e fator $k = 2$ para estreitamento de linha.

Os espectros deconvoluídos foram utilizados para a identificação das bandas que os compõem. Essas bandas foram então, posteriormente utilizadas para o assinalamento nos espectros originais (não deconvoluídos) a fim de ajustá-las por meio de função gaussiana (em 3.12, § 5).

Nos espectros deconvoluídos da longipina (figura 36), pode-se verificar a contribuição das bandas que foram centradas e ajustadas aos espectros originais (figura 37) correspondentes:

- longipina em solução (D_2O) – $1.613, 1.626, 1.643$ e 1.673 cm^{-1} ;
- longipina em POPC – $1.614, 1.626, 1.643, 1.654$ e 1.673 cm^{-1} ;
- longipina em POPG:POPC – $1.613, 1.624, 1.632, 1.641, 1.656, 1.665, 1.673$ e 1.683 cm^{-1} .

Houve mudanças na posição das bandas ajustadas aos espectros originais (figura 37), já que foi permitida variação máxima de 1% nos valores das suas posições durante algumas etapas do ajuste (em 3.3.4, § 5). Portanto, as estruturas secundárias presentes no peptídeo foram assinaladas de acordo com suas posições ajustadas aos espectros originais (Tabela 9).

Na análise qualitativa do espectro ajustado da longipina em solução (figura 37A) nota-se a grande contribuição da banda em 1.643 cm^{-1} – relacionada a estruturas desordenadas – e do componente a 1.665 cm^{-1} , característico de estruturas em volta- β . No espectro ajustado do peptídeo em POPC (figura 37B), esses dois componentes aparecem com grande intensidade, porém a banda relacionada a voltas- β encontra-se deslocada e centrada em 1.669 cm^{-1} . Apesar do componente centrado em 1.655 cm^{-1} , característico de α -hélices, não ser notado no espectro original do peptídeo em POPC, a sua presença fica evidente no espectro deconvoluído (figura 36) – é observado mais facilmente quando ele é comparado com o do peptídeo em solução. Portanto, o peptídeo adquiri estruturas em α -hélice, ausentes em solução, na presença de MLVs compostas somente por POPC. Indicando que a longipina interage de alguma maneira com esse sistema mimético formado por fosfolipídios de cabeça polar zwitteriônica.

Na presença de MLVs formadas por POPG:POPC nota-se o aumento da intensidade das bandas em 1.613 e 1.683 cm^{-1} , características de agregados intermoleculares presentes em fibras amiloides (CHITI et al., 1999). Esses agregados possuem estrutura semelhante, porém mais homogênea a folhas- β , pois seus pares de ângulos diedrais (ϕ/ψ) possuem distribuição mais restrita no diagrama de Ramachandran e se aproximam da reta $\psi = -\phi$. Essa observação também explica o aspecto estreito da banda relacionada a essas estruturas na região amida I' do espectro (ZANDOMENEGHI et al., 2004), como também pode ser observado na banda centrada em 1.613 cm^{-1} da longipina em POPG:POPC (figura 37C).

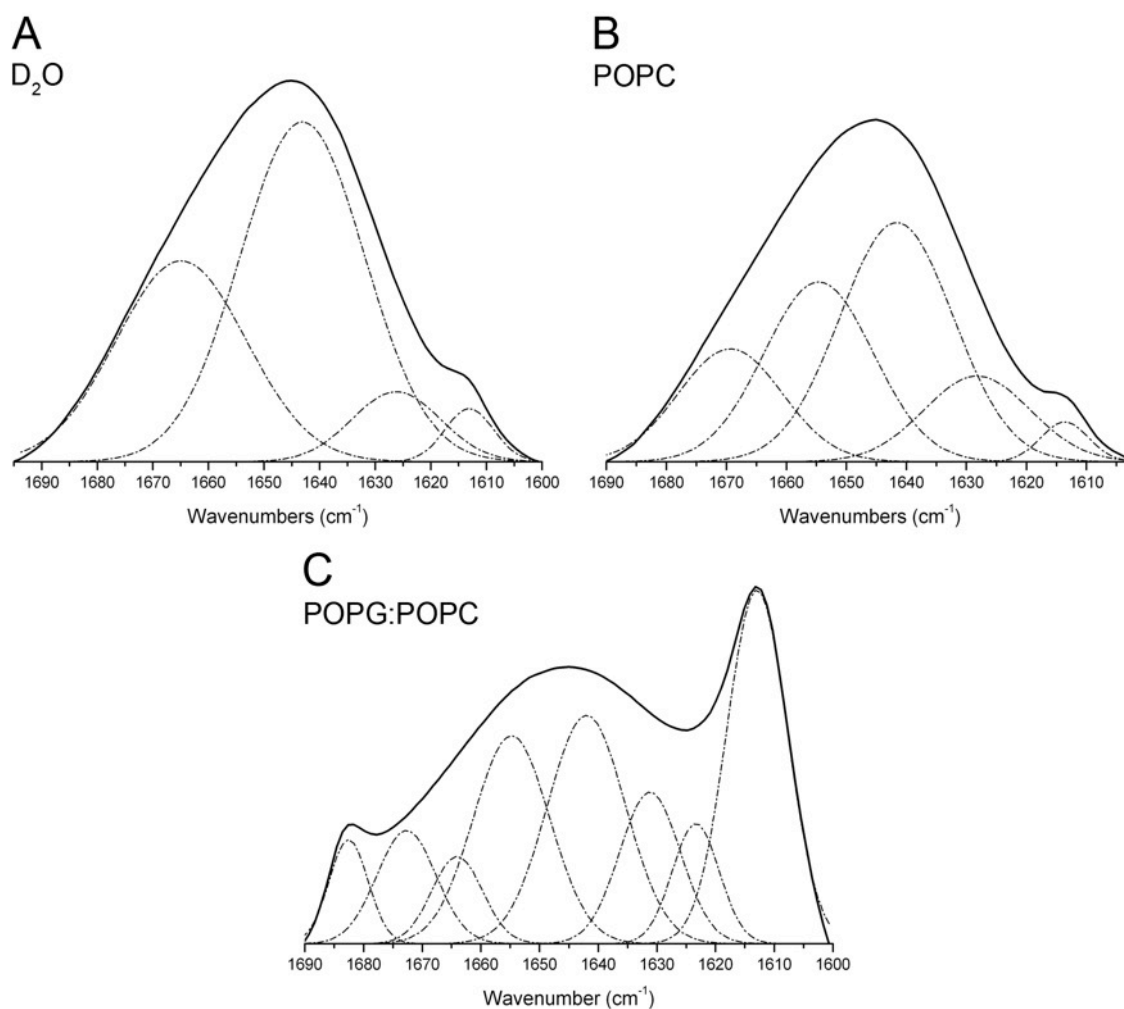


Figura 37- Espectros originais com as bandas ajustadas da longipina em solução ou na presença de sistema mimético multilamelar. As bandas que compõem os espectros originais (linhas tracejada-potuada) na região amida I' da longipina em D₂O (**A**), POPC (**B**) e POPG:POPC (**C**), determinadas por meio dos espectros deconvoluídos, foram ajustadas aos espectros originais (linhas contínuas) com funções gaussianas utilizando-se o programa PeakFit 4.0. A razão *P/L* utilizada nos dois sistemas multilamelares foi de 1:20.

Tabela 9- Frequências assinaladas das estruturas secundárias presentes obtidas após ajuste nos espectros originais na região amida I'.

longipina	Frequências assinaladas na região amida I' (cm ⁻¹)				
	α -hélice ^a	volta- β ^a	folha- β ^a	agregados intermoleculares ^b	desordenada ^a
D ₂ O	---	1.665	1.626	1.613	1.642
POPC	1.655	1.669	1.628	1.614	1.642
POPG:POPC	1.655	1.664	1.623 1.631 1.673	1.613 1.683	1.642

a- de acordo com o trabalho publicado por Byler e Susi (1986);

b- de acordo com o trabalho publicado por Chiti et al. (1999);

--- - ausência da frequência no espectro.

Dos espectros originais da longipina em solução (figura 37A) e em MLVs compostas por POPC (figura 37B) ou por POPG:POPC 1:1 (figura 37C) ajustados às bandas que os compõem, puderam ser obtidas as proporções de estruturas secundárias presentes no peptídeo em cada um dos três sistemas (Tabela 10). Os espectros originais não apresentaram diferenças visíveis dos espectros obtidos pela composição das bandas ajustadas (dados não apresentados), pois $r^2_{\text{final}} > 0,998$ em todos os casos.

Tabela 10- Proporções (%) de estruturas secundárias da longipina em solução (D₂O) e na presença de MLVs compostas por POPC ou POPG:POPC 1:1 obtidas pela área das bandas após o ajuste nos espectros originais na região amida I'.

longipina	Estruturas secundárias (%)				
	α -hélice	volta- β	folha- β	agregados intermoleculares	desordenada
D ₂ O	0	34	8	3	55
POPC	28	17	13	3	39
POPG:POPC	19	5	25	30	21

As porcentagens das estruturas secundárias da longipina em solução ou na presença de MLVs compostas por POPC ou POPG:POPC 1:1 apresentadas na **tabela 10** foram obtidas pela relação entre a área de cada banda ajustada nos espectros originais (figura 37) e a área total composta por todas as bandas. Esses resultados possibilitaram uma análise quantitativa da conformação do peptídeo nos três sistema em questão.

Nota-se que a estrutura secundária da longipina em solução é majoritariamente desordenada (55%), porém com grande contribuição de estruturas em volta- β (34%).

Na presença de MLVs compostas por POPC parte do peptídeo fica estruturada em α -hélice (28%), fato evidenciado pelo aparecimento da banda em 1.655 cm⁻¹. Ocorrendo também a diminuição da porcentagem de resíduos em voltas- β (17%) nesse sistema – presente em 34% no peptídeo em solução.

A maior estruturação do peptídeo no sistema mimético de MLVs compostas por POPC comparado à molécula em solução reflete diretamente na diminuição das estruturas desordenadas, que passaram representar 39%

da sequência. Os resultados indicam que o peptídeo está interagindo com esse sistema mimético, porém de maneira fraca, como observado pelos ensaios com filtros Amicon (ver 4.6.1) e de titulação com vesículas compostas por POPC (ver 4.6.2).

Dentre os três sistemas estudados, foi em MLVs compostas por POPG:POPC que o peptídeo apresentou menor porcentagem de estruturas desordenadas (21%). A diferença mais evidente comparado com os outros dois sistemas (D₂O e POPC) é o aumento acentuado na intensidade da banda característica de estruturas presentes em agregados intermoleculares (1.613 cm⁻¹), totalizando 30% do peptídeo. Este fato pode ser notado tanto nos espectros deconvoluídos (figura 36) quanto nos espectros originais (linhas contínuas; figura 37). As estruturas em folhas-β estão presentes em 25% da molécula (maior porcentagem obtida), enquanto as estruturas em volta-β apresentaram a menor porcentagem (5%) dos três sistemas em questão.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve início com a análise da atividade antimicrobiana de diversas frações extraídas tanto do plasma quanto dos hemócitos de opiliões *Acutisoma longipes*. As análises evidenciaram a existência de diversas frações ativas compostas por peptídeos obtidas do fracionamento da hemolinfa do opilião *Acutisoma longipes*. Uma delas apresentou somente um peptídeo de 2,1 kDa, cuja estrutura primária foi completamente elucidada, possibilitando sua síntese química para a utilização da molécula sintética em ensaios biológicos e de interação com sistemas miméticos de membranas.

A obtenção de diversas frações com atividade antimicrobiana de opiliões não desafiados, visto que os animais eram mantidos em condições assépticas de cativeiro antes da extração da hemolinfa, da espécie *Acutisoma longipes* aponta para o fato de que moléculas ativas localizadas na hemolinfa desses animais estão sendo constitutivamente expressas, da mesma maneira como foi observado em outros aracnídeos . Por exemplo, dos hemócitos do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, foi purificado o peptídeo antimicrobiano ixodidina (FOGAÇA et al., 2006), nos hemócitos da aranha caranguejeira *Aconthoscurria gomesiana*, é expressa a acanthoscurrina (LORENZINI et al., 2003a) e a gomesina (LORENZINI et al., 2003b; SILVA; DAFFRE; BULET, 2000) e em diferentes tecidos da aranha verdadeira *Cupiennius salei*, onde ocorre a expressão constitutiva de defensinas (BAUMANN et al., 2010).

Em contrapartida, a expressão de peptídeos antimicrobianos no corpo gorduroso da mosca *Drosophila melanogaster* é rapidamente induzida após injúria séptica por meio do reconhecimento de constituintes da parede celular de fungos e bactérias Gram-positivas, bem como LPS da membrana externa de bactérias Gram-negativas (FERRANDON et al., 2007; LEMAITRE e HOFFMANN, 2007). No entanto, em outros tecidos de *D. melanogaster*, como glândulas salivares, os PAM são constitutivamente expressos (IMLER e BULET, 2005).

Ao verificarem que não houve diferenças na expressão de PAMs entre bivalves desafiados e não desafiados, Charlet et al. (1996) especularam que a presença constitutiva dessas moléculas no sangue de invertebrados basais pode ser uma condição primitiva comparada ao sofisticado sistema de indução da expressão após injúria presente nos insetos superiores. Portanto, a caracterização do sistema imune com relação à expressão de PAMs (induzida após injúria ou constitutiva) nos diferentes grupos de artrópodes pode fornecer caracteres que possam, porventura, serem utilizados em inferências filogenéticas e evolutivas, caso uma gama maior de dados seja obtida da grande diversidade de animais presente nesses grupos.

A divisão da hemolinfa (1,5 mL) em plasma e hemócitos permitiu a avaliação das frações ativas presentes em cada um desses dois componentes após o fracionamento dos seus conteúdos por CLAE (ver 4.1 e 4.2). De uma maneira geral, foram detectadas uma maior quantidade de frações capazes de inibir o crescimento da bactéria Gram-positiva *M. luteus* obtidas a partir do plasma do animal. Vale ressaltar que a atividade das frações foi avaliada contra essa bactéria, pois em etapa anterior ao presente projeto que envolveu o fracionamento e teste de atividade de 0,8 mL de hemolinfa por meio das mesmas metodologias, foi detectada somente atividade anti-*M. luteus* dentre os três microorganismos utilizados (*M. luteus*, *E. coli* e *C. albicans*). Portanto, optou-se somente pela avaliação contra *M. luteus* da atividade das frações no presente projeto a fim de serem evitadas perdas e disponibilizar uma maior quantidade de material para análises por espectrometria de massas. A ausência de atividade nas demais frações coletadas não indica a ausência de moléculas ativas, uma vez que a concentração das mesmas pode ser um fator limitante para a detecção da atividade antimicrobiana.

Iwanaga e Lee (2005) revisaram o conhecimento do sistema imune de invertebrados utilizando como modelo o límulo *Tachypleus tridentatus* (subfilo Chelicerata no qual estão presentes todos os aracnídeos), cujos peptídeos antimicrobianos e outras moléculas de defesa encontram-se armazenados em grânulos pequenos no interior dos hemócitos sendo liberados na hemolinfa após injúria, enquanto no plasma há pouca

variedade de proteínas. No presente estudo, as frações ativas obtidas pelo fracionamento do extrato ácido de hemócitos de opilião após a segunda etapa de purificação por CLAE totalizaram duas, enquanto as frações ativas do plasma totalizaram onze. Isto indica que os hemócitos desses animais expressam e podem estar envolvidos no armazenamento de PAM no interior de seus grânulos (figura 4B).

A extração da hemolinfa dos animais pode somente ser realizada por meio de punção na articulação coxae-trocanter do último par de pernas (figura 4A) visto a impossibilidade de se acessar um vaso de grosso calibre para se inserir a agulha da seringa. Após a punção, a hemolinfa extravasada em forma de gotícula era então coletada com uma seringa apirogênica contendo uma solução anticoagulante (ver 3.1). Apesar desse procedimento ser realizado posteriormente à esterilização da articulação com etanol 100%, a presença de constituintes da parede de bactérias no local pode ter provocado o rompimento dos hemócitos. Ademais, a extração da hemolinfa dos animais foi realizada em diversas etapas (de cada espécimen eram retirados aproximadamente 10 μ L). Portanto, não se pode descartar a possibilidade de que tenha ocorrido rompimento dos hemócitos em algumas extrações. Como evidências desta possibilidade, temos: (i) a presença de células íntegras além de grânulos soltos na solução em algumas preparações de hemolinfa coletada e visualizada ao microscópio ótico (figura 4B); (ii) a comparação entre o perfil cromatográfico do extrato ácido de hemócitos (figura 6) e do plasma (figura 10) eluídos a 40% de ACN nas colunas Sep-Pak® onde a absorbância, a quantidade de picos e número de frações ativas no primeiro são notavelmente inferiores. A diferença entre esses dois perfis também evidencia uma maior variedade de moléculas presentes no plasma. Este fato contraria a observação feita por Iwanaga e Lee (2005) de que o plasma do límulo *T. tridentatus* (um quelicerado, assim como os opiliões) apresenta menor variedade de proteínas quando comparado ao plasma humano. Portanto, as frações ativas obtidas pelo fracionamento do material do plasma podem conter moléculas originalmente encontradas no interior dos hemócitos.

Porém, as duas frações com atividade anti-*M. luteus* obtidas do fracionamento dos hemócitos (figura 7) possivelmente contêm peptídeos originalmente localizados nessas células, pois as massas das moléculas presentes nessas frações não foram encontradas em nenhuma outra fração ativa obtida do plasma dos animais.

Todas as frações ativas obtidas evidenciam a grande diversidade de moléculas antimicrobianas presentes na hemolinfa dos opiliões que provavelmente desempenham papel importante na imunidade inata desses animais. Haine et al. (2008) demonstraram que na larva do besouro *Tenebrio molitor*, os PAM, cuja expressão é induzida somente após injúria, desempenham importante função na proteção contra os patógenos mais resistentes que não foram inicialmente eliminados por outros mecanismos da imunidade inata, como a cascata da profenoloxidase. Eles observaram que a eliminação de quase todos os microorganismos (99,5%) ocorre após 30 min, antes mesmo do aumento significativo nos níveis de peptídeos antimicrobianos, que atingem seu pico de concentração por volta de três dias após a infecção. No entanto, em animais nos quais a expressão é constitutiva, os PAM devem desempenhar um papel fundamental na primeira linha de defesa contra microorganismos invasores, visto que ocorre rápida liberação do conteúdo granular dos hemócitos de límulos (IWANAGA, 1993) quando em contato com LPS (presente em bactérias) ou $\beta(1,3)$ D-glucana (presente em leveduras), levando à ação conjunta da coagulação da hemolinfa e de peptídeos antimicrobianos para a eliminação dos microorganismos invasores (SHIGENAGA et al., 1993).

As frações ativas **ALP80%-3**, **ALP80%-13**, **ALP80%-16** e **ALP80%-25** obtidas após a primeira etapa de purificação do material do plasma eluído a 80% de ACN das colunas Sep-Pak® puderam ser novamente fracionadas em uma segunda etapa de purificação por CLAE, evidenciando a presença de diferentes moléculas nas suas constituições. No entanto, nenhuma das frações obtidas após a segunda purificação foi capaz de inibir o crescimento de *M. luteus*. Sendo assim, é possível especular que as moléculas, fracionadas após a segunda purificação, poderiam estar exercendo conjuntamente a atividade antimicrobiana observada ou que a concentração

da(s) molécula(s) foi o fator limitante na detecção de sua(s) atividade(s) – visto que perdas de material são inerentes aos processos de purificação.

O cromatograma do material do plasma eluído a 80% de ACN das colunas Sep-Pak® (figura 8) apresentou diversos picos eluídos no começo do gradiente (20-80% de ACN) que provavelmente estão presentes devido a uma contaminação do material que deveria ser eluído no corte de 40% de ACN das colunas Sep-Pak® mas que ficou retido nas colunas – possivelmente pela grande quantidade de material. Esse fato foi confirmado pela presença do peptídeo de massa 2.125 Da ($[M+H]^+$, m/z 2.126) tanto em frações de Sep-Pak® 80% – **ALP80%-2_7** (figura 9F) e **ALP80%-5_11** (figura 9G) – como na fração **ALP40%-44_12** (figura 15B) eluída nas colunas Sep-Pak® com 40% de ACN do material do plasma dos opiliões. Como essas duas frações da Sep-Pak® 80% foram eluídas a porcentagens de ACN muito diferentes, 17,9 e 19,4, respectivamente, não pode ser descartada a possibilidade de os dois peptídeos de 2.125 Da encontrados em cada uma sejam diferentes. Porém, as frações **ALP80%-5_11** e **ALP40%-44_12** foram eluídas em porcentagens de ACN muito semelhantes, 19,4 e 20, respectivamente. Tornando-se muito improvável que os peptídeos de mesma massa molecular detectados nelas possuam sequências de aminoácidos diferentes.

Pode ser verificado por MALDI-ToF/MS ou LC-ESI/MS que quase todas as frações ativas obtidas após a segunda etapa de CLAE apresentaram moléculas cujos valores de massas são superiores a 1.000 Da, o que evidencia as suas prováveis naturezas proteicas. Somente a fração **ALP40%-11_0** apresentou valores inferiores de m/z no espectro de MALDI-ToF, fato que aponta para a possibilidade da presença de moléculas ativas de outra natureza nessa fração. Contudo, ensaios para verificar essa hipótese não foram realizados.

Todas as frações ativas obtidas da hemolinfa, à exceção da fração **ALP40%-44_12**, mostraram-se constituídas por mais de uma molécula nas análises por espectrometria de massas, evidenciando a necessidade de outra etapa de purificação a fim de se isolar sua(s) molécula(s) ativa(s). É possível observar no espectro de MALDI-ToF da fração **ALP40%-44_12** a presença de um valor de m/z em 2.177,9 (+22 Da) referente ao peptídeo carregado com

um aduto de sódio ($[M+Na]^+$). Por esse tipo de análise é muito comum encontrar peptídeos carregados com adutos de metais monovalentes (LEITE et al., 2004). Como a fração **ALP40%-44_12** foi a única a apresentar somente um peptídeo em sua constituição após análise por MALDI-ToF/MS (figura 15), os esforços nesse momento do projeto foram dirigidos à elucidação da estrutura primária do peptídeo antimicrobiano de 2.124,9 Da, partindo-se do pressuposto que essa molécula, possivelmente em maior concentração dada a intensidade do seu m/z no espectro de MALDI-ToF (figura 15B), foi a responsável pela atividade inibitória do crescimento *M. luteus* observada. Vale ressaltar que esse mesmo peptídeo foi detectado na fração **ALP80%-5_11** (figura 9G), como discutido anteriormente (em 5, § 8).

Foi possível determinar a estrutura primária de três fragmentos gerados após a digestão com tripsina do peptídeo de 2.125 Da por meio do sequenciamento “de novo”. Dois fragmentos, um de massa molecular 1.012,26 Da (SGYI/LPGK/QEY – fragmento I) e outro de 449,1 Da (GK/QVF – fragmento II), apresentaram resíduos na região C-terminal não correspondentes àqueles esperados (Arg ou Lys) em produtos de tripsinização. Logo, eles podem ter sido originados por clivagem inespecífica da enzima ou pelo menos um deles conter a parte C-terminal do peptídeo. O terceiro fragmento sequenciado, com 720,2 Da (SGYI/LPGK/Q – fragmento III), provavelmente contém um resíduo de Lys na parte C-terminal, evidenciado pela presença do íon y_1 (m/z 147,08) no seu espectro de DIC (figura 16). Como esse é um produto da digestão do fragmento I (1.012,26 Da), é pouco provável ser encontrada uma Gln na região C-terminal.

A digestão do peptídeo com endoprotease Glu-C gerou um fragmento de 849,2 Da cuja estrutura primária (SGYI/LPGK/QE – fragmento IV) determinada (figura 19) confirmou a presença de um resíduo de Glu na sua posição C-terminal (m/z 148,02) como esperado. No entanto, esse foi o único fragmento obtido da digestão com endoprotease Glu-C cujo espectro de DIC pode ser interpretado.

Na digestão do peptídeo com ambas as enzimas (tripsina e endoprotease Glu-C) foi determinada a estrutura primária de um fragmento com 862,22 Da (YVYK/QYK/Q – fragmento V).

A grande precisão no assinalamento dos íons das séries $-y$ ou $-b$ (desvio máximo de $\pm 0,2$ Da), a alta intensidade relativa dos seus íons (principalmente os da série $-y$), a presença de diversos fragmentos internos que correspondem às sequências determinadas (exceto no espectro do fragmento II) e a grande proximidade entre as massas teóricas e aferidas dos fragmentos são fatores que tornam improváveis erros na interpretação dos espectros. Além disso, observam-se na região de baixos valores de m/z de todos os espectros de DIC alguns íons imônios ou íons relacionados de resíduos que sempre estão presentes nas sequências determinadas.

A utilização de diferentes tratamentos enzimáticos no peptídeo foi realizada com o intuito de possibilitar a sobreposição de alguns fragmentos para que fosse determinado como eles se encadeiam no peptídeo. A única sobreposição possível das sequências obtidas é aquela entre os fragmentos I e V, resultando na sequência **SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/Q** (1.693,87 Da). A provável estrutura primária do peptídeo pode ser obtida adicionando-se ao fragmento I+V, o de número II (**GK/QVF**). A soma das massas dos fragmentos I+V e II (1.693,87 + 449,1 = 2.142,97 Da) descontados 18 Da pela formação de uma molécula de H₂O (2.142,97 - 18 = 2.124,97 Da) aproxima-se com grande precisão da massa do peptídeo aferida por MALDI-ToF/MS (2.124,9 Da).

A estrutura primária completa do peptídeo prevista pela sobreposição dos fragmentos de digestão enzimática e comparação com a massa molecular obtida por MALDI-ToF/MS (**SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/QGK/QVF**) foi confirmada pelo sequenciamento “de novo” da cadeia polipeptídica completa (figura 21 e ANEXO). No espectro de DIC foi possível assinalar todos os íons da série $-y$ com alta precisão (desvio máximo de $\pm 0,1$ Da) e observar a presença de um grande número de fragmentos internos (ANEXO), principalmente aqueles com uma Pro na região N-terminal. O grande número de fragmentos com esse resíduo, bem como a alta intensidade relativa do íon $-y_{14}$ são explicados pela tendência de ocorrer quebra na ligação peptídica na região N-terminal de Pro durante o processo de fragmentação de peptídeos (VAISAR e URBAN, 1996). Os imônios e íons relacionados presentes na região de baixos m/z também estão de acordo com a sequência determinada.

Com a determinação parcial da estrutura primária do peptídeo foi possível constatar que o fragmento I (SGYI/LPGK/QEY) foi gerado por uma clivagem inespecífica da tripsina. Esse fato pode ser explicado pela contaminação com quimotripsina, enzima capaz de clivar na região C-terminal de Tyr, na tripsina comercialmente vendida apesar da presença de inibidores específicos para essa enzima no produto (informação contida no manual). Soma-se ainda a presença de um resíduo carregado na posição P1' (Glu), o que dificulta a quebra da ligação peptídica no sítio reconhecido pela tripsina (SCHECHTER e BERGER, 1967), pois é possível haver uma Lys na sétima posição do resíduo (evidenciado pela formação do fragmento II). Essas duas características do peptídeo devem ter possibilitado a formação do fragmento I pela ação conjunta da quimotripsina contaminante e dificuldade na clivagem pela tripsina da região C-terminal da Lys na sétima posição.

A presença de resíduos de Lys ou Gln nas posições 7, 12, 14 e 16 pode ser diferenciada na estrutura primária do peptídeo tanto pelas massas (figura 23) quanto por meio do sequenciamento “de novo” dos fragmentos contendo a parte N-terminal (figura 24) e C-terminal (figura 25) após acetilação e digestão com endoprotease Glu-C da molécula. Somente o tratamento enzimático do peptídeo com endoprotease Glu-C geraria um fragmento N-terminal (SGYI/LPGK/QEY) com 849 Da e outro C-terminal (YVYK/QYK/QGK/QVF) com 1.293 Da. Mas o CTI na análise por LC-ESI/MS (figura 23) apresentou dois picos principais cujos íons são referentes ao fragmento N-terminal com duas modificações por acetilação ($849 + 2 \times 42 = 933$ Da) e ao fragmento C-terminal com três modificações ($1.293 + 3 \times 42 = 1.419$ Da). Pelo menos uma das modificações presentes no fragmento de 934 Da ocorreu necessariamente no grupo amina dessa região e a outra provavelmente em uma Lys presente na sétima posição. Como a acetilação da molécula foi realizada antes da digestão com endoprotease Glu-C, os únicos grupos livres modificáveis no fragmento N-terminal seriam os grupos NH_2 da cadeia lateral de Lys. Logo, as três modificações detectadas nesse fragmento ocorreram exclusivamente nos resíduos de Lys presentes nas posições 12, 14 e 16 do peptídeo. Portanto, o peptídeo deve conter somente resíduos de Lys na sua estrutura primária (SGYI/LPGKEYVYKYKGKVF), se

somente ocorreram modificações em suas cadeias laterais. A confirmação das modificações nos resíduos de Lys foi realizada pelo sequenciamento “de novo” desses dois fragmentos (figura 24 e 25), onde foi observada a presença do íon em m/z 126, relacionado ao imônio de Lys^{AC} com uma perda neutra de amônia (ZHANG et al., 2004). Outros trabalhos também já obtiveram êxito na diferenciação entre resíduos de Lys e Gln por meio da modificação do peptídeo por acetilação (HISADA et al., 2000; 2002; STEVENS et al., 2000).

Alguns trabalhos já relataram a possibilidade da diferenciação entre os resíduos de massas isobáricas (Ile e Leu) por meio de espectrometria de massas utilizando fragmentações em série (ARMIROTTI; MILLO; DAMONTE, 2007; HULST e KIENZ, 1996) ou observando a presença dos íons d e w , referentes a quebras de ligações ocorridas no carbono β desses resíduos, em análises com altas energias de colisão (JOHNSON et al., 1987). Mendes et al. (2004) observaram a presença de íons w nos espectros de fragmentação a baixas energias de colisão (como as utilizadas neste trabalho) de peptídeos de vespa, possibilitando a diferenciação entre Leu e Ile. No entanto, nos espectros de fragmentação obtidos dos produtos gerados por digestão enzimática (figura 16, 17, 19 e 24) ou da cadeia polipeptídica completa do peptídeo (figura 21 e ANEXO), esses íons não foram detectados, impossibilitando a diferenciação entre Ile e Leu na quarta posição da molécula.

O resíduo localizado na quarta posição da estrutura primária do peptídeo pode ser determinado pelo sequenciamento N-terminal da molécula por degradação de Edman. Verificou-se a presença de uma Leu nessa posição. Por essa metodologia foi possível sequenciar o peptídeo até o 15º resíduo. Apesar dos resíduos 8 (Asp), 12 (Ile) e 14 (Asn) estarem em desacordo com aqueles obtidos por sequenciamento “de novo”, o grau de confiabilidade desses resultados foi baixo: 30, 14 e 7%, respectivamente, provavelmente devido à baixa concentração de peptídeo utilizada. Essa discordância entre as sequências obtidas pode ser resolvida analisando-se detalhadamente o espectro de fragmentação da cadeia polipeptídica completa (figura 21): (i) não são observados na região de baixos m/z os

imônios de Asp (88) e Asn (87); (ii) a troca de Glu por Asp na posição 8 implicaria no fragmento y_{10} com novo valor de m/z em 1.308, no entanto esse íon não está presente no espectro, além de deslocar todos íons seguintes da série $-y$ em +14 Da; (iii) a troca de Lys por Ile na posição 12 implicaria no fragmento y_6 com novo valor de m/z em 756, porém este íon não está presente; (iv) a troca de Lys por Asn na posição 12 implicaria no fragmento y_4 com novo valor de m/z em 464, porém este íon também não está presente; (v) a substituição dos três resíduos na sequência de aminoácidos (SGYLPGK**DYVYI**YNGKVF) resultaria num peptídeo de 2.374 Da, cuja massa está em completo desacordo com a massa aferida do peptídeo (2.125 Da) e a nova sequência não é ajustável ao espectro de DIC.

O resíduo de Phe na última posição foi diferenciado de Met^{ox} (metionina oxidada) pela ausência de qualquer íon satélite localizado a -64 Da de todos os fragmentos y , já que todos possuem esse resíduo. Esse íon satélite é comumente encontrado devido à facilidade com que ocorre perda de ácido metanossulfônico (CH₃SO₃H) de fragmentos contendo Met^{ox} sob análises de MS/MS com baixas energias de colisão (MO et al., 2000). Como em nenhum fragmento y foi encontrado esse íon satélite, o último resíduo da sequência foi assinalado como Phe.

A confirmação inequívoca da estrutura primária do peptídeo (SGYLPGKEYVYKYK**G**KVF) foi feita pela comparação entre os espectros de fragmentação do peptídeo nativo e sintética (figura 29). Os espectros são muito similares, exceto por pequenas diferenças na intensidade de alguns íons, observada principalmente na região de baixos m/z . Essas diferenças podem ter ocorrido pela troca de muitos componentes do equipamento que se deterioraram entre a aquisição dos espectros da molécula nativa e da sintética e que podem ter influenciado nos padrões de fragmentação na célula de colisão do equipamento. Apesar dos parâmetros utilizados terem sido exatamente os mesmos.

A diferença entre os espectros reside nas intensidades dos íons em m/z 2.126 e 1.593,83. Como no espectro original da molécula sintética, diferentemente da nativa, o íon 4+ do peptídeo é muito intenso (dado não apresentado), após o processamento do espectro esse íon foi convertido em

monocarregado (m/z 2.126). Dessa maneira, observa-se esse íon muito mais intenso no espectro do peptídeo sintético. O íon em m/z 1.593,83, presente no espectro da molécula sintética e ausente na nativa, está relacionado ao fragmento $-z_{13}$ (quebra na ligação N-C α), como evidenciado pela diferença de -15 Da (HN) do íon $-y_{13}$ (m/z 1.608,88). O fragmento $-z_{13}$ pode ter sido originado na aquisição do espectro da molécula sintética por razões descritas previamente relacionadas às condições do equipamento no momento da análise.

Esse peptídeo, nomeado longipina em alusão ao epíteto da espécie do opilião (*A. longipes*), possui característica catiônica (carga total +3) com elevado valor de pI (9,52), propriedades compartilhadas pela grande maioria dos peptídeos antimicrobianos conhecidos (BROWN e HANCOCK, 2006; HANCOCK e DIAMOND, 2000).

Foi observada a presença de outro peptídeo na mesma fração da longipina com estrutura primária muito similar, como evidenciado pelos espectros de fragmentação comparados das duas moléculas (figura 22), mas com um incremento de massa de 28 Da. Como explicado nos resultados (em 4.2.3, § 5) essa diferença pode ter sido ocasionada por modificação no resíduo de Glu presente na posição 8 ou pela presença de outro resíduo com 157 Da nessa posição. Como se conhece até o momento um resíduo natural com 157 Da, torna-se mais plausível sugerir que esse incremento de massa observado foi ocasionado pela modificação do resíduo de Glu. O incremento de 28 Da nesse resíduo pode ter sido originado por etilação ($-C_2H_5$) num processo de esterificação de etanol com o grupo carboxila da sua cadeia lateral. Esse processo foi descrito como uma modificação que ocorre *in vitro* quando proteínas são solubilizadas com soluções contendo etanol (XING et al., 2008). No entanto, em nenhuma etapa de extração, purificação e análise por espectrometria de massas o material da hemolinfa dos opiliões entrou em contato com soluções contendo etanol, o que aponta para a possibilidade de que tenha ocorrido uma modificação *in vivo*. Tornando-se, dessa maneira, intrigante a descoberta da origem dessa modificação presente no peptídeo, já que vias de etilação *in vivo* ainda não foram descritas.

A similaridade entre a longipina e lipo-proteínas de outros dois carrapatos (figura 26), pela proximidade filogenética (ambos são aracnídeos), pode indicar que o peptídeo seja fragmento de uma proteína similar nos opiliões que sofra processamento para a formação dessa molécula com atividade antimicrobiana. Um processamento desse tipo ocorre com a hemocianina de camarões na geração de fragmentos com atividade antifúngica em resposta a infecções microbianas (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2001). Nesse sentido, o grupo de pesquisa que faço parte obteve evidências de que a clivagem da região C-terminal da hemocianina da aranha *Acanthoscurria rondoniae* também pode gerar um fragmento com atividade antimicrobiana (dados não publicados).

Após a síntese em fase sólida da longipina e purificação, foi verificada a presença de uma grande quantidade de contaminantes com a cadeia peptídica incompleta e bloqueada na região N-terminal por acetilação (figura 27B) devido à dificuldade nas etapas de acoplamento dos Fmoc-aminoácidos após a Val₁₀. Essa dificuldade no acoplamento pode ser explicada pelo alto grau de substituição da resina utilizada (0,43 mmol/g) para a síntese de um peptídeo com 18 resíduos de aminoácidos (AMBLARD et al., 2006). Dessa maneira permitiu a grande proximidade das cadeias crescentes, facilitando a agregação entre elas e impedindo que as etapas de acoplamento fossem bem sucedidas (TICKLER; CLIPPINGDALE; WADE, 2004), o que, por sua vez, exigiu etapas de acetilação para bloquear as cadeias cuja região N-terminal permanecera livre após as etapas de acoplamento.

O material sintético final utilizado para os ensaios biológicos (antimicrobiano e hemolítico) e estudos espectroscópicos apresentou um grau pureza em torno de 70%. Sua atividade antimicrobiana foi eficaz na inibição do crescimento da bactéria Gram-positiva *M. luteus* (assim como a molécula nativa), da bactéria Gram-negativa *E. coli* e das leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*. A CMI da longipina contra todos os microorganismos testados ficou no intervalo de 50-100 µM, exceto contra *C. tropicalis*, contra a qual o peptídeo mostrou-se mais ativo, com CMI no intervalo 12,5-25 µM (tabela 5). A ausência de atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* indica que a longipina não é ativa contra esses microorganismos

até a máxima concentração utilizada nos ensaios (100 μ M). O peptídeo também não foi capaz de causar lise de eritrócitos humanos, indicando que, nas concentrações testadas, essa molécula tem atividade específica contra células de microorganismos.

A atividade antimicrobiana da longipina detectada *in vitro* permite que seja feita a especulação de que esse peptídeo antimicrobiano provavelmente é um constituinte da imunidade inata de *A. longipes* e que, possivelmente, *in vivo* possua ação direta contra microorganismos invasores.

A seletividade de PAMs nas suas atividades reside na interação preferencial com membranas de microorganismos, visto que estas são compostas por uma porcentagem mais elevada de fosfolipídios com cabeças polares negativamente carregadas quando comparada com as células de mamíferos. Dessa maneira, a diferença no balanço de cargas entre as superfícies das células de microorganismos (negativamente carregadas) e de mamíferos (próximas à neutralidade) pode ser o fator inicial a determinar a seletividade dos PAMs (MATSUZAKI, 2009).

O estudo dos efeitos causados pela interação do peptídeo com membranas modelo pode fornecer evidências a respeito do modo de ação dessa molécula, uma vez que diversos PAMs agem diretamente sobre a membrana plasmática das células (SHAI, 2002). Mesmo que essas moléculas possuam alvos intracelulares, como descrito para a buforina II (PARK; KIM; KIM, 1998), a membrana plasmática é uma barreira que ainda precisa ser atravessada (MELO e CASTANHO, 2007).

Diferentes avaliações por meio de técnicas fluorimétricas puderam ser realizadas com o peptídeo sintético sem nenhuma modificação, graças à presença de resíduos de Tyr em sua estrutura primária. Esse resíduo possui fluorescência intrínseca ($\lambda_{ex} = 275$ nm/ $\lambda_{em} = 302$ nm).

No presente trabalho foram utilizados lipossomas constituídos por diferentes proporções de POPC e POPG com o intuito de mimetizar a superfície externa das células de mamíferos ou de microorganismos. Portanto, as LUVs foram constituídas por POPC – que mimetizam a superfície zwitteriônica da membrana de células de mamíferos (VERKLEIJ et

al., 1973) – e por POPG ou POPG:POPC 1:1 – que mimetizam a superfície aniônica das células de microorganismos.

A ligação preferencial da longipina a lipossomas compostas por POPG (cabeça polar aniônica) foi verificada inicialmente pelo ensaio com filtros Amicon (figura 30) e confirmada pelo aumento da fluorescência do peptídeo na titulação com essas vesículas (figura 31). Por este último, verificou-se também a ligação do peptídeo em vesículas compostas por POPG:POPC 1:1. O aumento na intensidade de F/FO indica que o peptídeo ou parte dele, na presença de vesículas que contêm fosfolípidios aniônicos, passou a se localizar num ambiente menos polar, provavelmente mais próximo ao core hidrofóbico da bicamada. Em contrapartida, a longipina não foi capaz de se ligar a vesículas compostas somente por fosfolípidios zwitteriônicos (POPC), como verificado nos ensaios de titulação (figura 31) e com filtros Amicon (figura 30). Esses resultados indicam que a ligação do peptídeo a esses sistemas miméticos pode ser inicialmente dirigida por forças eletrostáticas atrativas entre a superfície aniônica das vesículas e as cargas positivas da longipina. Além de contribuir às observações feitas por Matsuzaki (2009) e Papo e Shai (2003), na qual peptídeos não hemolíticos, como a longipina, não possuem uma forte interação com sistemas membranares compostos por fosfatidilcolina (PC).

Ainda pode ser observado que o peptídeo possui afinidades diferentes por POPG e POPG:POPC 1:1, pois os valores das constantes de afinidade do peptídeo (K_b) nesses dois sistemas são, respectivamente, 34,04 e 5,85 (tabela 6), evidenciando que a longipina possui uma maior partição na membrana do sistema mimético composto por vesículas formadas somente por POPG.

Com o aumento da força iônica do meio foi verificada uma diminuição nos valores de K_b do peptídeo em POPG:POPC 1:1 (tabela 7). Este fato evidencia que forças eletrostáticas podem estar envolvidas inicialmente na ligação da longipina a vesículas, já que aumentando-se a concentração de NaCl da solução, os contra-íons de sódio ficam mais particionados na cabeça polar aniônica dos fosfolípidios aniônicos e dessa maneira diminuem a carga total na superfície das vesículas afetando na afinidade do peptídeo pelas vesículas.

Portanto, os resultados da interação da longipina com vesículas unilamelares sugerem que o peptídeo possui uma maior afinidade por sistemas compostos por fosfolipídios aniônicos, que mimetizam a superfície externa da membrana de microorganismos. E que essa interação é inicialmente dirigida por forças eletrostáticas atrativas entre a superfície aniônica das vesículas e as cargas positivas presentes no peptídeo.

Os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) são menores nos dois intervalos de concentração de acrilamida considerados para o peptídeo em vesículas compostas por fosfolipídios aniônicos quando comparados ao da molécula em solução. Isto indica que a longipina, ou parte dela contendo resíduo(s) de Tyr, encontra-se mais protegida do efeito supressor da acrilamida presente na solução. Provavelmente o peptídeo está inserido em regiões do core hidrofóbico da bicamada fosfolipídica dessas vesículas, já que as moléculas de acrilamida (carga neutra) não são atraídas pela superfície das vesículas por forças eletrostáticas e possuem baixa partição no interior da bicamada.

A linearidade dos pontos para o peptídeo em solução não foi observada em todo o intervalo de concentração de acrilamida como previsto pela equação de Stern-Volmer (equação 4). Isto provavelmente ocorreu devido à influência de outras variáveis no sistema, como a esfera de ação da molécula supressora de fluorescência. Propriedade física na qual medida à que é aumentada a concentração da molécula supressora, aumenta-se a chance de que essas moléculas se encontrem a uma distância do fluoróforo eficiente para a supressão da sua fluorescência (CASTANHO e PRIETO, 1998). Logo, a concentrações maiores do que 0,3 M de acrilamida, a esfera de ação da acrilamida pode ter exercido uma influência maior na supressão de fluorescência, pois as inclinações (K_{SV}) de todas as retas ajustadas aumentam (tabela 8). Para o ajuste de todos os pontos do intervalo (0-0,7 M de acrilamida), seriam necessárias medidas de valores de fluorescência de estado transiente do peptídeo na presença de acrilamida. Vale ressaltar que uma função exponencial descreve supressão de um fluoróforo levando em conta a esfera de ação da molécula supressora, e foi justamente numa curva

exponencial (dado não apresentado) que foram melhor ajustados todos os pontos do intervalo de acrilamida para o peptídeo em solução.

A longipina foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade da bicamada fosfolipídica de vesículas de POPG:POPC 1:1 carregadas com CF (figura 34) de uma maneira menos eficiente que a melitina em igual concentração (20 μM). Esse fato aponta para a possibilidade da longipina ser um peptídeo que atua na membrana dos microorganismos para exercer sua atividade antimicrobiana, assim como a melitina (MEINCKEN; HOLROYD; RAUTENBACH, 2005), porém de uma maneira menos eficiente no aumento da permeabilidade.

Foi verificado também que o aumento da permeabilidade causado pela longipina é diretamente proporcional à concentração da molécula (figura 35) e inversamente proporcional à força iônica do meio, pois a uma mesma concentração (20 μM), o peptídeo foi capaz de liberar 38 e 100% da fluorescência total das moléculas de CF aprisionadas nas vesículas a 80 (figura 34) e 10 mM (figura 35) de NaCl, respectivamente. O aumento da permeabilidade da bicamada causado pela longipina evidencia que este peptídeo pode ter a membrana plasmática de microorganismos como alvo, aumentando sua permeabilidade, para o desempenho de sua atividade antimicrobiana observada *in vitro*.

Os estudos conformacionais da longipina foram realizados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – técnica que permite quantificar as estruturas secundárias presentes numa proteína. No entanto, Williams et al. (1990) constataram que não há indícios de que o espectro de infravermelho na região amida I das estruturas secundárias de um peptídeo com 20 resíduos seja diferente das mesmas estruturas presentes numa grande proteína. Permitindo, dessa maneira, a realização das análises nos espectros da longipina da mesma maneira como são feitas as análises nos espectros de grandes proteínas (ARRONDO e GOÒI, 1999).

Na região amida I' dos espectros de infravermelho da longipina em solução ou em MLVs compostas por POPC, ficou evidenciado que o peptídeo encontra-se majoritariamente desordenado – espectros centrados em 1.642 cm^{-1} – e adquiri estruturas secundárias mais definidas ao interagir com o

sistema multilamelar aniônico composto por POPG:POPC 1:1 – presença, principalmente de bandas relacionadas a estruturas β (figura 36). Isto demonstra que os fosfolipídios com cabeça polar negativa possuem importante papel na estruturação do peptídeo nesse sistema, já que a molécula apresentou-se mais desordenada no sistema formado somente por fosfolipídios zwitteriônicos (POPC). Como a longipina possivelmente está inserida na região do core hidrofóbico em vesículas compostas por POPG:POPC, fato evidenciado pelo ensaio de supressão da fluorescência (figura 33), é provável que as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios nesse sistema tenham importante papel na estruturação da molécula por meio de interações hidrofóbicas.

O aparecimento de uma banda a 1.654 cm^{-1} (figura 36), relacionada a estruturas em α -hélice, no peptídeo em POPC, evidencia que a longipina interage com esse sistema, porém de uma maneira fraca – como evidenciado pelo ensaio com filtros Amicon (ver 4.6.1) – na qual o peptídeo não se localiza em regiões menos polares da bicamada – como evidenciado pela não alteração da intensidade de F/F_0 na titulação da longipina com vesículas de POPC (ver 4.6.2). A maior estruturação do peptídeo no sistema mimético de MLVs compostas por POPC comparado à molécula em solução reflete diretamente na diminuição das estruturas desordenadas, que passaram representar 39% da sequência ante 55% do peptídeo em solução (tabela 10). Portanto, esses resultados indicam que a longipina está interagindo de maneira fraca com MLVs compostas por POPC sem que ocorra inserção da molécula no interior da bicamada e, portanto, as estruturas em α -hélice podem ser formadas por interações com as cabeças polares dos fosfolipídios.

As estruturas em volta- β na longipina em solução estão, provavelmente, presentes na molécula devido à Pro₅ – resíduo encontrado com frequência em voltas- β de proteínas (CRAWFORD; LIPSCOMB; SCHELLMAN, 1973). Para verificar a tendência na formação de voltas- β no peptídeo em solução, foram realizadas predições com dois algoritmos diferentes: Beta T Pred2 e COUDES (FUCHS e ALIX, 2005). As regiões consenso entre as duas predições apontam para a presença de estruturas em volta- β nos segmentos

Leu₄-Pro₅-Gly₆-Lys₇ (obtida pelos dois algoritmos) e Lys₁₄-Gly₁₅-Lys₁₆ – ambas predizem a presença da Pro₅ na estrutura.

O segmento entre os resíduos 4-7 pode formar uma volta- β do tipo II, já que possui uma Gly na terceira posição e o segmento 14-16 pode estar envolvido na formação de uma volta- γ , já que possui três resíduos. A soma do número de resíduos em voltas- β preditos (7) para o peptídeo em solução corresponde a $\approx 39\%$ do total de resíduos do peptídeo (18). Esta porcentagem é muito próxima dos 34% de estruturas em volta- β calculados na região amida I' pelo espectro de infravermelho (tabela 10).

A diminuição na porcentagem de estruturas em volta- β no peptídeo em POPC pode indicar que, pelo menos algumas partes dos trechos outrora nesta conformação em solução adquiriram estrutura em α -hélice (presentes agora em 28% nesse sistema), visto que as folhas- β aumentaram em 5% e as voltas- β diminuíram em 17%. Torna-se pois, plausível sugerir que a diminuição em 17% de estruturas em volta- β do peptídeo nesse sistema se deve à mudança na conformação dos resíduos 14-16, cuja estruturação predita em solução apontou para volta- β e que equivalem a $\approx 17\%$ da molécula. No entanto, esta hipótese não pode ser confirmada com os dados obtidos, sendo necessária avaliação por outras metodologias.

Na ligação da longipina em MLVs compostas por POPG:POPC 1:1 observa-se o aumento na porcentagem de agregados intermoleculares (30%), de estruturas em folha- β (25%) e α -hélice (19%) e a diminuição de estruturas em volta- β (5%) quando comparados ao peptídeo em solução, indicando que a estruturação nesse sistema está relacionada à extensão do peptídeo pela perda de estrutura em volta- β .

A formação de agregados moleculares de peptídeos antimicrobianos ligados a sistemas de membrana aniônicos (que mimetizam a membrana de microorganismos) já foi também observada com a cateslitina (JEAN-FRANÇOIS et al., 2008) e plantaricina A (ZHAO et al., 2006).

O modo de ação proposto para a cateslitina envolve a formação de domínios rígidos e espessos ricos em fosfolípídios aniônicos que promovem um defeito de fase entre os domínios fluidos e finos, permitindo o extravasa-

mento de moléculas do interior das células bem como a entrada do peptídeo para o interior das mesmas (JEAN-FRANÇOIS et al., 2008). Já no modo de ação proposto para a plantaricina A, a região hidrofóbica dos agregados moleculares interage com as caudas apolares dos fosfolipídios e a parte hidrofílica promove uma curvatura positiva na membrana levando ao aparecimento de uma fenda que permite o extravasamento de moléculas do interior das células. Vale ressaltar que assim como a longipina, a plantaricina A causa o extravasamento de CF aprisionada no interior de vesículas (ZHAO et al., 2006).

Portanto, o aparecimento de agregados molecular na ligação da longipina a MLVs de POPG:POPC aponta para um modo de ação que pode ser semelhante ao da cateslitina ou da plantaricina A. No entanto, futuros ensaios devem ser conduzidos para que os mecanismos moleculares do modo de ação da longipina sejam elucidados.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu resultados que podem contribuir para o conhecimento da imunidade de opiliões e de uma maneira mais ampla, da imunidade dos aracnídeos. Além de fornecer evidências sobre a interação de um novo peptídeo antimicrobiano, isolado da hemolinfa de *A. longipes*, com LUVs e resultados preliminares sobre seu possível modo de ação contra microorganismos.

Foi observada a presença de diversas frações com atividade anti-*M. luteus* obtidas da hemolinfa dos opiliões não desafiados. Essas frações mostraram-se formadas por peptídeos que são aparentemente constitutivos nesses animais, assim como ocorre em outros aracnídeos.

Uma fração ativa do plasma apresentou-se constituída somente por um peptídeo de 2,1 kDa, cuja estrutura primária foi completamente elucidada. Esse peptídeo mostrou-se composto por 18 resíduos de aminoácidos dispostos em uma estrutura linear, já que não há pontes de dissulfeto. Sua sequência apresentou similaridade com heme-proteínas presentes em carrapatos, mas não com outros PAMs conhecidos. Em alusão ao epíteto da espécie, essa molécula foi nomeada longipina.

O peptídeo foi sintetizado utilizando-se a tecnologia Fmoc e a molécula sintética apresentou atividade contra bactérias (Gram-negativa e positiva) e leveduras, não sendo capaz de romper eritrócitos humanos na máxima concentração testada (100 μ M).

A longipina interage preferencialmente com LUVs compostas por POPG, promovendo o extravasamento de marcador fluorescente do interior dessas vesículas. E adota estruturas conformacionais mais ordenadas em contato com MLVs compostas por POPG:POPC quando comparadas com o peptídeo em solução ou na presença de POPC. As estruturas conformacionais da molécula em POPG:POPC são relacionadas principalmente a estruturas β e a estrutura similar à presente em fibras amiloides.

REFERÊNCIAS

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and Protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006.

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.

ARMIROTTI, A.; MILLO, E.; DAMONTE, G. How to Discriminate Between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 1, p. 57-63, 2007.

ARRONDO, J. L. R.; GOÏI, F. M. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 72, n. 4, p. 367-405, 1999.

ASSUNÇÃO, N. A. **Desenvolvimento de instrumentação e ferramentas bio-analíticas aplicadas a análises proteômicas**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão eintegrada**. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora de Publicações Biomédicas, 1994. 411 p.

BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADER, C. R.; NENTWIG, W. Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 15, p. 2643-2651, 2010.

BLAST. **Basic local alignment search tool**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 13 mar. 2011.

BLOUT, E. R.; DE LOZE, C.; ASADOURIAN, A. The Deuterium Exchange of Water-soluble Polypeptides and Proteins as Measured by Infrared Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 83, n. 8, p. 1895-1900, 1961.

BRIOLAT, J.; WU, S. D.; MAHATA, S. K.; GONTHIER, B.; BAGNARD, D.; CHASSEROT-GOLAZ, S.; HELLE, K. B.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide

from chromogranin A. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 3, p. 377-385, 2005.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BROWN, K. L.; HANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2003. 936 p.

BULET, P.; DIMARCQ, J. L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J. A. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14893-14897, 1993.

BULET, P.; STOCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 3-11, 2005.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunology Reviews**, v. 198, p. 169-184, 2004.

CAMP: Collection of Anti-Microbial Peptides. **Database statistics**. Disponível em: <<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/>>. Acesso em: 14 mar. 2011.

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

CASTANHO, M. A.; PRIETO, M. J. Fluorescence quenching data interpretation in biological systems. The use of microscopic models for data analysis and interpretation of complex systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1373, n. 1, p. 1-16, 1998.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.

CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

CHARLET, M.; CHERNYSH, S.; PHILIPPE, H.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; BULET, P. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21808-21813, 1996.

CHITI, F.; WEBSTER, P.; TADDEI, N.; CLARK, A.; STEFANI, M.; RAMPONI, G.; DOBSON, C. M. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3590-3594, 1999.

CRAWFORD, J. L.; LIPSCOMB, W. N.; SCHELLMAN, C. G. The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 2, p. 538-542, 1973.

DE SMET, K.; CONTRERAS, R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 18, p. 1337-1347, 2005.

DECCA, M. B.; PERDUCA, M.; MONACO, H. L.; MONTICH, G. G. Conformational changes of chicken liver bile acid-binding protein bound to anionic lipid membrane are coupled to the lipid phase transitions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 6, p. 1583-1591, 2007.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHERE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47070-47077, 2001.

DUNLOP, J. A. Geological history and phylogeny of Chelicerata. **Arthropod Structure & Development**, v. 39, n. 2-3, p. 124-142, 2010.

DUNLOP, J. A.; ANDERSON, L. I.; KERP, H.; HASS, H. Palaeontology: preserved organs of Devonian harvestmen. **Nature**, v. 425, n. 6961, p. 916, 2003.

EDGECOMBE, G. D. Arthropod phylogeny: an overview from the perspectives of morphology, molecular data and the fossil record. **Arthropod Structure & Development**, v. 39, n. 2-3, p. 74-87, 2010.

EHRET-SABATIER, L.; LOEW, D.; GOYFFON, M.; FEHLBAUM, P.; HOFFMANN, J. A.; VAN DORSSELAER, A.; BULET, P. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29537-29544, 1996.

FALICK, A. M.; HINES, W. M.; MEDZIHRADSZKY, K. F.; BALDWIN, M. A.; GIBSON, B. W. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, n. 11, p. 882-893, 1993.

FAZIO, M. A.; OLIVEIRA, V. X., JR.; BULET, P.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 205-218, 2006.

FERRANDON, D.; IMLER, J. L.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 11, p. 862-874, 2007.

FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. New York, NY: Oxford University Press, 1996. 336 p.

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, v. 27, n. 4, p. 667-674, 2006.

FOGAÇA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191-200, 2004.

FUCHS, P. F.; ALIX, A. J. High accuracy prediction of beta-turns and their types using propensities and multiple alignments. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 828-839, 2005.

FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA, P. I., JR.; MORTARA, R. A.; DA SILVA, J. M.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 6, p. 716-725, 2008.

GEHRE, F.; SPISEK, R.; KHARAT, A. S.; MATTHEWS, P.; KUKREJA, A.; ANTHONY, R. M.; DHODAPKAR, M. V.; VOLLMER, W.; TOMASZ, A. Role of teichoic acid choline moieties in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 77, n. 7, p. 2824-2831, 2009.

GREENBERG, S.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 136-145, 2002.

HAINÉ, E. R.; MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T.; ROLFF, J. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. **Science**, v. 322, n. 5905, p. 1257-1259, 2008.

HALE, J. D.; HANCOCK, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, n. 6, p. 951-959, 2007.

HANCOCK, R. E.; BROWN, K. L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 315-322, 2006.

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402-410, 2000.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 82-88, 1998.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006.

HAO, G.; SHI, Y. H.; TANG, Y. L.; LE, G. W. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. **Peptides**, v. 30, n. 8, p. 1421-1427, 2009.

HISADA, M.; KONNO, K.; ITAGAKI, Y.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Advantages of using nested collision induced dissociation/post-source decay with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: sequencing of novel peptides from wasp venom. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 19, p. 1828-1834, 2000.

HISADA, M.; KONNO, K.; ITAGAKI, Y.; NAOKI, H.; NAKAJIMA, T. Sequencing wasp venom peptides by endopeptidase digestion and nested collision-induced dissociation/post-source decay methods. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 11, p. 1040-1048, 2002.

HOFFMANN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426, n. 6962, p. 33-38, 2003.

HOFFMANN, J. A. Primitive immune systems. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 5-9, 2004.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1313-1318, 1999.

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; WEBB, G.; CULLIS, P. R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 812, n. 1, p. 55-65, 1985.

HUACHACA, N. S. M. **Propriedades conformacionais de hormônios peptídicos ligantes de receptores acoplados a proteínas G em solução e em presença de membranas modelo**. 2007. 170 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347-8352, 2000.

HULST, A. G.; KIENZT, C. E. Differentiation between the isomeric amino acids leucine and isoleucine using low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectroscopy. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, n. 10, p. 1188-1190, 1996.

IMLER, J. L.; BULET, P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 86, p. 1-21, 2005.

IONSOURCE. **De novo peptide sequencing tutorial**. Disponível em: <<http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/introduction.htm>>. Acesso em: 12 out. 2010.

IWANAGA, S. The limulus clotting reaction. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 1, p. 74-82, 1993.

IWANAGA, S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 87-95, 2002.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128-150, 2005.

IWANAGA, S.; MUTA, T.; SHIGENAGA, T.; MIURA, Y.; SEKI, N.; SAITO, T.; KAWABATA, S. Role of hemocyte-derived granular components in invertebrate defense. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 712, p. 102-116, 1994.

JEAN-FRANÇOIS, F.; CASTANO, S.; DESBAT, B.; ODAERT, B.; ROUX, M.; METZ-BOUTIGUE, M. H.; DUFOURC, E. J. Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides? **Biochemistry**, v. 47, n. 24, p. 6394-6402, 2008.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JOHNSON, R. S.; MARTIN, S. A.; BIEMANN, K.; STULTS, J. T.; WATSON, J. T. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 2621-2625, 1987.

KENT, S. B. H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 957-989, 1988.

KOBAYASHI, S.; TAKESHIMA, K.; PARK, C. B.; KIM, S. C.; MATSUZAKI, K. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8648-8654, 2000.

KOPRIVNJAK, T.; WEIDENMAIER, C.; PESCHEL, A.; WEISS, J. P. Wall teichoic acid deficiency in *Staphylococcus aureus* confers selective resistance to mammalian group IIA phospholipase A(2) and human beta-defensin 3. **Infect Immun**, v. 76, n. 5, p. 2169-2176, 2008.

KOVACS, M.; HALFMANN, A.; FEDTKE, I.; HEINTZ, M.; PESCHEL, A.; VOLLMER, W.; HAKENBECK, R.; BRUCKNER, R. A functional dlt operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5797-5805, 2006.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, v. 425, n. 6953, p. 37-38, 2003.

LAKOWICZ, J. R. Quenching of Fluorescence. In:____. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 4th ed. New York, NY: Springer US, 2006. cap. 8, p. 277-330. ISBN 978-0-387-46312-4.

LAMBERTY, M.; ZACHARY, D.; LANOT, R.; BORDEREAU, C.; ROBERT, A.; HOFFMANN, J. A.; BULET, P. Insect immunity. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4085-4092, 2001.

LEE, M.; HUNG, W.; CHEN, F.; HUANG, H. W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5087-5092, 2008.

LEITE, J. F.; HAJIVANDI, M. R.; DILLER, T.; POPE, R. M. Removal of sodium and potassium adducts using a matrix additive during matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of peptides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 23, p. 2953-2959, 2004.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Reviews of Immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J. M.; HOFFMANN, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LITTLE, T. J.; HULTMARK, D.; READ, A. F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 651-654, 2005.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: ___. LOHNER, H. **Development of novel antimicrobial agents**. Wymondham, England: Horizon Scientific Press, 2001. p. 1-15.

LORENZINI, D. M.; DA SILVA, P. I., JR.; FOGACA, A. C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 9, p. 781-791, 2003a.

LORENZINI, D. M.; FUKUZAWA, A. H.; DA SILVA, P. I., JR.; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKY, A. T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 10, p. 1011-1016, 2003b.

MANDARD, N.; BULET, P.; CAILLE, A.; DAFFRE, S.; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 4, p. 1190-1198, 2002.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 5, p. 468-472, 2006.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

MEINCKEN, M.; HOLROYD, D. L.; RAUTENBACH, M. Atomic force microscopy study of the effect of antimicrobial peptides on the cell envelope of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4085-4092, 2005.

MELO, M. N.; CASTANHO, M. A. Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 5, p. 1277-1290, 2007.

MENDES, M. A.; MONSON DE SOUZA, B.; DELAZARI DOS SANTOS, L.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaiapallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 6, p. 636-642, 2004.

MO, W.; MA, Y.; TAKAO, T.; NEUBERT, T. A. Sequencing of oxidized methionine-containing peptides for protein identification. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, n. 21, p. 2080-2081, 2000.

MOULS, L.; AUBAGNAC, J. L.; MARTINEZ, J.; ENJALBAL, C. Low Energy Peptide Fragmentations in an ESI-Q-ToF Type Mass Spectrometer. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 4, p. 1378-1391, 2007.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. Absorption of light by molecules: The Lambert-Beer Law. In: ___. **Principles of Biochemistry**. 3rd ed. New York, NY: Freeman, W. H., 2000. cap. 3, p. 75-115.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 22, p. 6483-6496, 2009.

NIZET, V.; OHTAKE, T.; LAUTH, X.; TROWBRIDGE, J.; RUDISILL, J.; DORSCHNER, R. A.; PESTONJAMASP, V.; PIRAINO, J.; HUTTNER, K.; GALLO, R. L. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. **Nature**, v. 414, n. 6862, p. 454-457, 2001.

PACE, C. N.; VAJDOS, F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Science**, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693-1703, 2003.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 244, n. 1, p. 253-257, 1998.

PESCHEL, A.; OTTO, M.; JACK, R. W.; KALBACHER, H.; JUNG, G.; GOTZ, F. Inactivation of the dlt operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8405-8410, 1999.

PESCHEL, A.; SAHL, H. G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 529-536, 2006.

PINTO-DA-ROCHA, R.; MACHADO, G.; GIRIBET, G. **Harvestmen: the biology of Opiliones**. London: Harvard University Press, 2007. 599 p.

RODRIGUES, J.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1353-1355, 2010.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Letter to the editors. **Biological Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 601-601, 1984.

ROSSI, L. M.; RANGASAMY, P.; ZHANG, J.; QIU, X.-Q.; WU, G. Y. Research advances in the development of peptide antibiotics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 3, p. 1060-1070, 2008.

SAMGINA, T. Y.; KOVALEV, S. V.; GORSHKOV, V. A.; ARTEMENKO, K. A.; POLJAKOV, N. B.; LEBEDEV, A. T. N-Terminal Tagging Strategy for De Novo Sequencing of Short Peptides by ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 21, n. 1, p. 104-111, 2010.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SCOTT, M. G.; DAVIDSON, D. J.; GOLD, M. R.; BOWDISH, D.; HANCOCK, R. E. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3883-3891, 2002.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SHIGENAGA, T.; TAKAYENOKI, Y.; KAWASAKI, S.; SEKI, N.; MUTA, T.; TOH, Y.; ITO, A.; IWANAGA, S. Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components. **Journal of Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 307-316, 1993.

SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 50, p. 34735-34746, 2009.

SILVA, P. I., JR. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 2000. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

SILVA, P. I., JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33464-33470, 2000.

SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 1998.

SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 2, p. 229-239, 1983.

STANDING, K. G. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 5, p. 595-601, 2003.

STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTROM, A.; BENNICHT, H.; BOMAN, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246-248, 1981.

STEVENS, J.; JONES, R. C.; BORDOLI, R. S.; TROWSDALE, J.; GASKELL, S. J.; BUTCHER, G. W.; JOLY, E. Peptide specificity of RT1-A1(c), an inhibitory rat major histocompatibility complex class I natural killer cell ligand. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29217-29224, 2000.

STONE, K. L.; WILLIAMS, K. R. Enzymatic digestion of proteins in solution and in SDS polyacrilamide gel. In:____. WALKER, J. M. **The protein protocol handbook**. Totowa: Human Press Inc., 1996. p. 415-421.

STROHALM, M.; KAVAN, D.; NOVÁK, P.; VOLNÝ, M.; HAVLÍČEK, V. mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 11, p. 4648-4651, 2010.

SUGITA, Y. Differences in spectra of alpha and beta chains of hemoglobin between isolated state and in tetramer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1251-1256, 1975.

SUSI, H.; TIMASHEFF, S. N.; STEVENS, L. Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. I. The amide I band in H₂O and D₂O solutions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 23, p. 5460-5466, 1967.

THE ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE. **Database search**. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em: 6 mar. 2011.

TICKLER, A. K.; BARROW, C. J.; WADE, J. D. Improved preparation of amyloid- β peptides using DBU as N α -Fmoc deprotection reagent. **Journal of Peptide Science**, v. 7, n. 9, p. 488-494, 2001.

TICKLER, A. K.; CLIPPINGDALE, A. B.; WADE, J. D. Amyloid-beta as a "difficult sequence" in solid phase peptide synthesis. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, n. 4, p. 377-384, 2004.

VAISAR, T.; URBAN, J. Probing the proline effect in CID of protonated peptides. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, n. 10, p. 1185-1187, 1996.

VERKLEIJ, A. J.; ZWAAL, R. F.; ROELOFSEN, B.; COMFURIUS, P.; KASTELIJN, D.; VAN DEENEN, L. L. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 323, n. 2, p. 178-193, 1973.

WILLIAMS, R. W.; STARMAN, R.; TAYLOR, K. M.; GABLE, K.; BEELER, T.; ZASLOFF, M.; COVELL, D. Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa. **Biochemistry**, v. 29, n. 18, p. 4490-4496, 1990.

XING, G.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHAO, Y. Identification of Four Novel Types of in Vitro Protein Modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 10, p. 4603-4608, 2008.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1475-1485, 2001.

ZANDOMENEGHI, G.; KREBS, M. R.; MCCAMMON, M. G.; FANDRICH, M. FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. **Protein Science**, v. 13, n. 12, p. 3314-3321, 2004.

ZANGER, K. Immunocytochemical localization of lysozyme in the nephrocytes of the harvestman, *Leiobunum rotundum*. **Tissue & Cell**, v. 27, n. 3, p. 299-308, 1995.

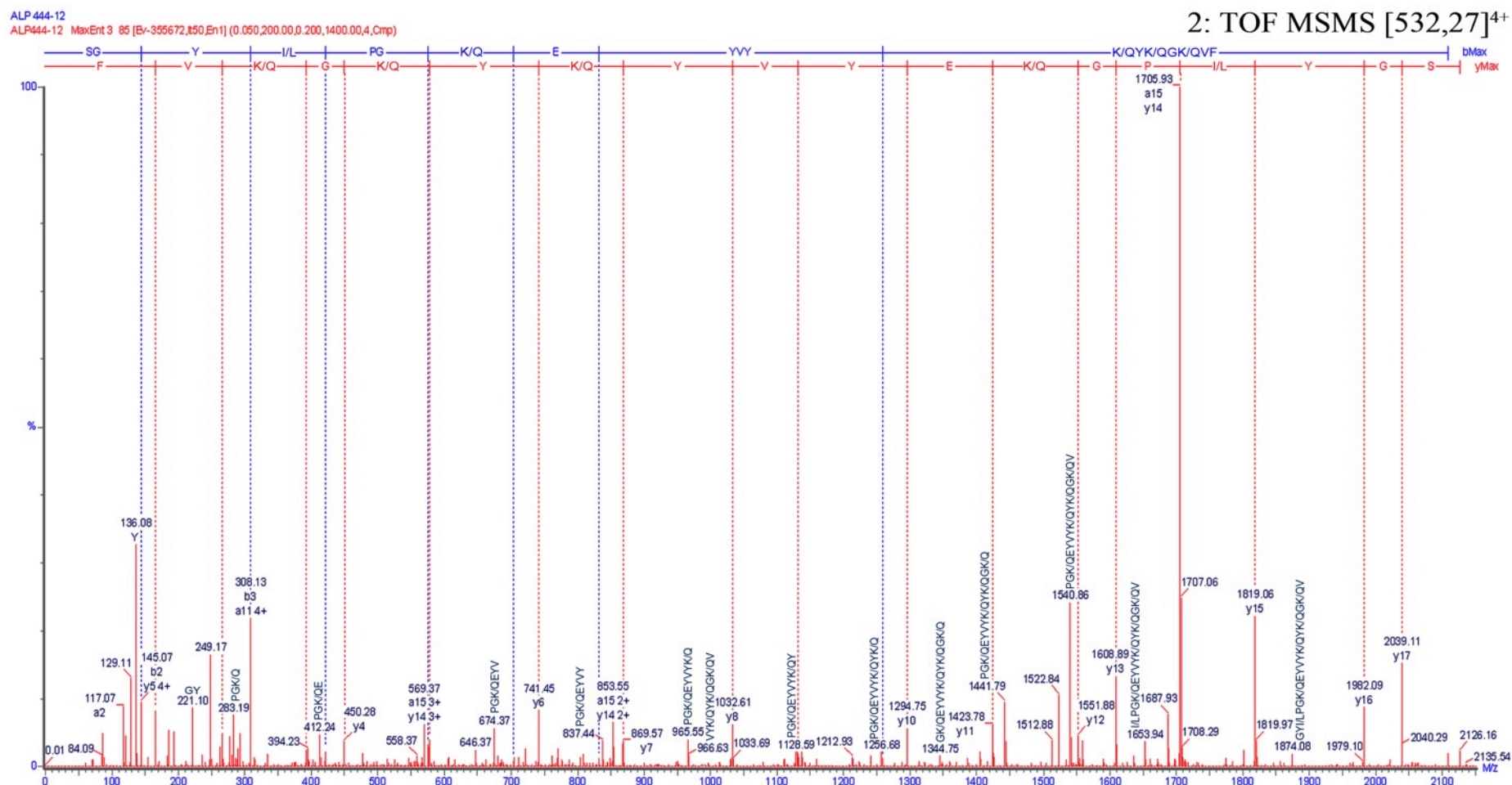
ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, K.; YAU, P. M.; CHANDRASEKHAR, B.; NEW, R.; KONDRAT, R.; IMAI, B. S.; BRADBURY, M. E. Differentiation between peptides containing acetylated or tri-methylated lysines by mass spectrometry: An application for determining lysine 9 acetylation and methylation of histone H3. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2004.

ZHANG, Z.; MARSHALL, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, n. 3, p. 225-233, 1998.

ZHAO, H.; SOOD, R.; JUTILA, A.; BOSE, S.; FIMLAND, G.; NISSEN-MEYER, J.; KINNUNEN, P. K. J. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1461-1474, 2006.

ANEXO- Sequenciamento “de novo” do peptídeo de 2.125,08 Da presente na fração com atividade antimicrobiana **ALP40%-44_12**.



O espectro de DIC do peptídeo foi adquirido com diferenças de potenciais de 20 V na célula de colisão do seu íon com quatro cargas ($[M+4H]^{4+}$, m/z 532,27). Os íons pertencentes às séries $-y$ (vermelho) e $-b$ (azul), assinalados na parte superior do espectro, elucidaram sua estrutura primária: **SGYI/LPGK/QEYVYK/QYK/QGKVF**. Esse peptídeo foi nomeado longipina. Os fragmentos internos do peptídeo sequenciado, cujos íons foram encontrados no espectro, estão representados com o código de uma letra de aminoácidos.