

VIABILIDADE DE SÍNTESE E INTERAÇÃO COM MIMÉTICOS DE MEMBRANA DO PEPTÍDEO LABADITINA. Simone Cristina Barbosa, Eduardo Maffud Cilli, Edson Crusca Júnior, Wanessa Fernanda Alteí, Vanderlan da Silva Bolzani. - Sub-área - Bioquímica – Química - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química – Campus de Araraquara.

Macromoléculas encontradas em plantas superiores do gênero *Jatropha*, família *Euphorbiaceae*, têm se mostrado de grande importância como fonte de protótipo de fármacos. Dentre as macromoléculas, os peptídeos cíclicos pequenos constituem uma família de moléculas com um importante espectro de atividades biológicas, como atividade anti-HIV (DALY et al., 1999; CRAIK et al., 1999), atividade hemolítica (CRAIK et al., 2004), antimalárica (BARAGUEY et al., 1998). *Jatropha multifida* foi a primeira espécie de planta superior registrada na literatura por acumular peptídeos cíclicos pequenos. Desta espécie foram isolados dois peptídeos, entre eles a Labaditina, que possui propriedade imunomoduladora seletiva (KOSASI et al., 1989). Uma das características apresentada por essa família de peptídeos é a alta proporção de aminoácidos hidrofóbicos, o que favorece a interação com membranas biológicas. Esta propriedade é importante, pois nos estudos que visam o desenvolvimento de novos fármacos, deve-se levar em consideração a interação destes com membranas biológicas, principalmente por elas mediar a comunicação celular. Com o intuito de elucidar os mecanismos de interação peptídeo-membrana, esta sequência na sua forma linear foi sintetizada por meio da técnica denominada “Síntese de peptídeos em fase sólida” obtendo-se o peptídeo:

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
V W T V W G T I A G

Essa técnica é a principal ferramenta utilizada hoje na obtenção de peptídeos, e baseia-se no crescimento da cadeia peptídica, um resíduo por vez, a partir da região carboxi-terminal que se encontra presa covalentemente a uma resina (ALBERICIO, 2000; BARANY; MERRIFIELD, 1980). O protocolo utilizado foi o empregando o grupamento Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonil) - base lábil - como protetor do α -amino-grupo e o tBu como protetor da cadeia lateral do aminoácido treonina, presente na sequência peptídica. O peptídeo final obtido foi clivado da resina e o protetor da cadeia lateral da treonina removido, através do uso de uma solução contendo 5% água pura, 2,5% fenol, 2,5% EDT, 5% tioanisol e 82,5% TFA, chamado de reagente K. Ao final de 2 horas o peptídeo livre foi precipitado e lavado com éter etílico gelado, através da utilização de uma placa porosa. O precipitado obtido foi então solubilizado e separado da resina, por filtração, com uma solução 10% ácido acético/água ultrapura; e liofilizado. O rendimento em massa obtido foi de 57%. Metade da massa total obtida (peptídeo bruto) manteve-se na forma linear (análogo linear), porém a outra metade foi ciclizada reagindo-se as suas extremidades amino e carboxi terminais. Nesta etapa o peptídeo linear foi solubilizado em DMF, seguido da adição de 10 equivalentes (eq) de trietilamina (Net3) e 1,5 eq de HBTU, por duas horas. Em seguida o peptídeo foi extraído dessa solução utilizando acetato de etila (AcOEt), agente extrator, concentrado e liofilizado. Em uma etapa posterior os peptídeos (Labaditina e análogo linear) foram purificados, separadamente, em CLAE semi-preparativa utilizando uma coluna C18, fase reversa. Para o peptídeo linear o gradiente utilizado foi de 15 – 55% de solvente B (0,36% TFA em ACN) – solvente A = 0,045% TFA/água - em 90 min. O peptídeo cíclico foi purificado utilizando um gradiente de 30 – 60% de solvente B em 90 min. A determinação das frações puras foi monitorada em CLAE analítica, com o uso de condição isocrática com 35% do solvente B em A para o peptídeo análogo linear e 50% de solvente B em A para o peptídeo labaditina. Os peptídeos puros obtidos foram caracterizados por CLAE e analisados em um espectrômetro de massas UltratOF-Q (figura 1 e 2) e em um analisador de aminoácidos buscando confirmar a obtenção do material.

Visando elucidar o modo de ação da labaditina (peptídeo cíclico), iniciamos um estudo da interação destas moléculas com miméticos de membrana. Com o intuito de obter o grau de interação peptídeo-membrana estas biomoléculas foram analisadas frente as micelas de dodecil-sulfato de sódio (SDS, CMC = $8,0 \times 10^{-3}$ M, (CASTELLANOSERRA et al., 1997)), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS, CMC = $5,0 \times 10^{-5}$, (MUKERJEE, 1971)) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3- fosfocolina (LPC), utilizando um espectrofotômetro e fluorímetro. Isso pôde ser realizado devido a presença do fluoróforo, triptofano (W), cuja fluorescência depende do ambiente que os circunda

(SHAI, 1999), permitindo obter informações quanto ao grau de inserção do peptídeo na micela. Assim, utilizando 600µL de uma solução 10µM de peptídeo em pH 7,0, ou seja, próximo do biológico, foram realizadas titulações até a concentração máxima de 50, 10 e 10mM dos detergentes SDS, HPS e LPC, respectivamente (figura 3). Em micelas de SDS e HPS (figura 4) os dois peptídeos mostraram semelhante interação com as micelas estudadas, ou seja, valores próximos do comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{\text{máx}}$). Além disso, em micelas de SDS, o peptídeo análogo linear apresentou uma queda inicial brusca no $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em baixas concentrações. Nestas condições ainda não há detergente o suficiente para a formação de micelas (CMC = 8 mM), por isso essa queda deve-se, provavelmente, a interação do peptídeo com monômero de SDS. No detergente LPC, estruturalmente mais similar aos lipídeos de membrana, a maior interação ocorreu com o peptídeo cíclico.

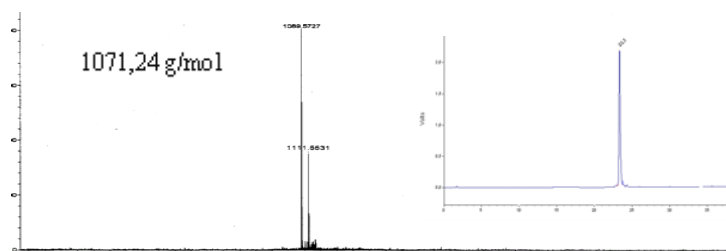


Figura 1: Espectro de massas e CLAE do peptídeo Labaditina - fração 1a.

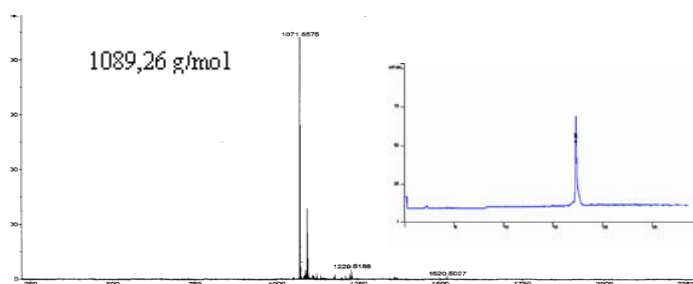


Figura 2: Espectro de Massas e CLAE do peptídeo análogo linear - fração 1a

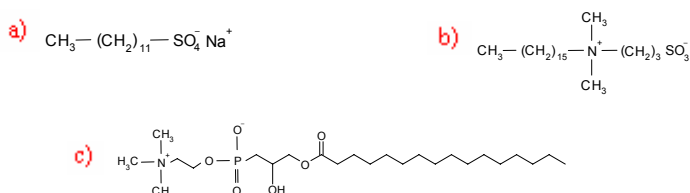


Figura 3: Estrutura dos detergentes utilizados: (a) SDS, (b) HPS e (c) LPC.

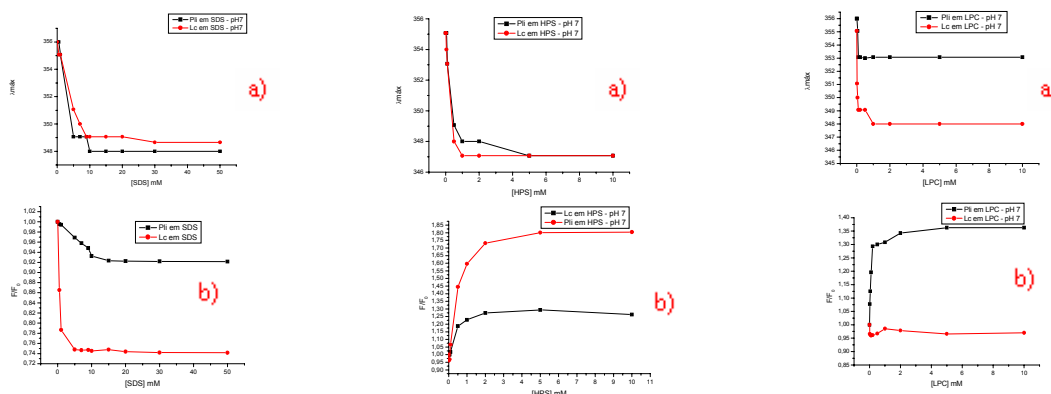


Figura 4: (a) Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em função da [SDS], [HPS] e [LPC]. (b) Intensidade de fluorescência em função da [SDS], [HPS] e [LPC], ambos em pH 7.

Buscando avaliar em maiores detalhes o grau de interação entre os peptídeos e as diferentes micelas foram realizados estudos de supressão da fluorescência, processo que ocorre devido à extinção colisional, onde o estado excitado do fluoróforo é desativado, por outra molécula em solução (acrilamida), sem que haja alteração química das moléculas durante o processo. A supressão foi realizada numa solução peptídica 10 μ M na ausência e presença de micelas (SDS, HPS e LPC a 50mM, 10mM e 10mM, respectivamente) titulando-se com acrilamida até a concentração de 50mM. O índice de apagamento pôde ser quantitativamente medido através da constante de Stern-Volmer (Ksv), que é obtida a partir da tangente da curva de supressão (F_0/F em função da concentração de acrilamida), tabela 1 e figura 5. Os resultados obtidos confirmam a interação dos peptídeos com todas as micelas, pois mostram uma grande diminuição do Ksv quando comparamos o meio aquoso e o micelar. Em relação os peptídeos houve comportamento antagônico, o linear – que possui cargas em suas extremidades – interagiu mais com o SDS (negativo), enquanto que o cíclico interagiu mais com os dois detergentes dipolares.

Tabela 1 : Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e Ksv da labaditina e do análogo linear.

Peptídeo	SDS		HPS		LPC	
	$\lambda_{\text{máx}}$	Ksv (M^{-1})	$\lambda_{\text{máx}}$	Ksv (M^{-1})	$\lambda_{\text{máx}}$	Ksv (M^{-1})
Pli com detergente	348	1,5	350	5,4	350	5,9
Pli meio aquoso	356	12,8	356	12,8	356	12,8
Lc com detergente	352	2,5	348	4,4	347	3,3
Lc meio aquoso	356	19,8	356	19,8	356	19,8

Pli = Análogo linear; Lc = Labaditina

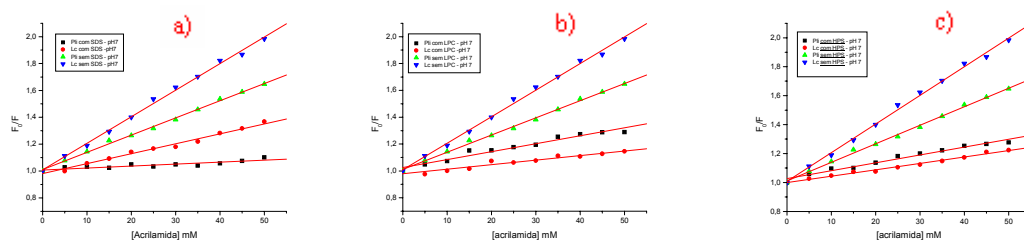


Figura 5: Supressão da fluorescência pela acrilamida nos peptídeos Labaditina e análogo linear em micelas de SDS (a), LPC (b) e HPS (c), pH 7.

Além dos estudos com miméticos de membrana também foram realizados testes biológicos: antifúngico e inibição da acetilcolinesterase. A medida da atividade antifúngica foi realizada utilizando os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, conforme o protocolo Homans e Fuchs (1970), no entanto, nenhum dos peptídeos apresentou atividade antifúngica. A inibição da acetilcolinesterase (figura 6) foi medida, utilizando como controle positivo a galantamina (1 μ g), em CCD (cromatografia de Camada delgada fina), conforme o método de Marston et al. (2002). Ambos os peptídeos mostraram atividade anticolinesterásica apresentada pelas manchas obtidas na CCD. Estes resultados fazem dessas moléculas importantes pontos de partida no desenvolvimento de novos fármacos, pois apresenta a propriedade de aumentar a função colinérgica central, podendo ser usado no tratamento da doença de Alzheimer e em crianças com retardamento mental, aumentando a sua capacidade cognitiva. Somado a isto, os resultados com interação com membrana revelam que o modo de ação destes peptídeos pode estar ligado a interação com receptores situados na membrana biológica.



Figura 6: Resultado da medida da atividade Anticolinérgica para o peptídeo Labaditina (A) e de seu análogo linear (B); resultados obtidos da inibição da acetilcolinesterase.

Referências Bibliográficas:

ALBERICIO, F. Orthogonal protecting groups for N – alpha-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 123-139, 2000

BARAGUEY, C.; Guette, C.A.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J. L.; Bodo, B.,; Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. **Journal Chemical Society**., Perkin Trans. n. 1, p. 3033-3039, 1998

BARANY, G.; MERRIFIELD, R. B. ANALYSIS, SYNTHESIS AND BIOLOGY. Gross, E., Meinhofer, J. New york: **Academic press**, The peptides.II, 1980.

CASTELLANOS SERRA, L. R.; FERNANDEZPATRON, C.; HARDY, E.; SANTANA, H.; HUERTA, V. High yield elution of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels at the low-picomole level. Application to N-terminal sequencing of a scarce protein and to in-solution biological activity analysis of on-gel renatured proteins. **Journal of Protein Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 415-419, 1997.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; BOND, T.; WAINE, C. **Plant cyclotides**; v. 294, n. 5, p. 1327-1336, 1999.

CRAIK, D. J.; DALY, N. L.; MULVENNA, J.; PLAN, M.R.; TRABI, M. Discovery, structure and biological activities of the cyclotides. **Current Protein & Peptide Science**, 5, 5, p. 297-315, 2004.

DALY, N. L.; KOLTAY, A.; GUSTAFSON, K. R.; BOYD, M. R.; CASAS-FINET, J. R.; CRAIK, D.J. Solution structure by NMR of circulin A. **Journal of molecular Biology**, 285, 1, p. 333-345, 1999.

HOMANS, A. L. & FUCHS, A.,; Direct bioautography on Thin layer-chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal Chromatography**, 51, 327-329, 1970.

KOSASI, S.; VANDERSLUIS, W. G.; BOELEN, R.; THART, L. A.; LABADIE, R. P. LABADITIN, A Novel Cyclic Decapeptide from the Latex of *Jatropha-Multifida* I (Euphorbiaceae). **Febs Letters**, v. 256, n. 1-2, p. 91-96, 1989.

MARSTON, A; KISSLING, J; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochemical Analysis** 13: 51-54, 2002.

MUKERJEE, P. Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Systems, 1971.

SHAI, Y.; Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Bioquímica et Biophysica acta**, p. 55-70, 1999.

Bolsa: CNPq/PIBIC