UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO ESTRUTURAL POR ^{1}H-RMN DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ISOLADOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *Hypsiboas Albopunctatus* E *Leptodactylus Labyrinthicus*

Eliane Santana Fernandes Alves

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Co-orientadora: Prof[a]. Dra. Aline Lima de Oliveira

Goiânia
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG mr

A474e

Alves, Eliane Santana Fernandes.
Estudo estrutural por ^{1}H-RMN de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *Hypsiboas Albopunctatus* e *Leptodactylus Labyrinthicus* [manuscrito] / Eliane Santana Fernandes Alves. – 2012.
xv, 113 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião; Coorientadora: Prof^{a}. Dr^{a}. Aline Lima de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2012.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas e símbolos e tabelas.
Apêndice.

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Peptídeos bioativos. 3. Determinação estrutural. 4. *Hypsiboas Albopunctatus.* 5. *Leptodactylus Labyrinthicus.* I. Título.

CDU: 537.635:567.8

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em 24/02/2012.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Luciano Morais Lião – IQ/UFG

Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende– IQ/UFMG

Profa. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães – ICB/UFG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus primeiramente, que me deu forças para chegar até aqui. Aos meus pais Maria de Fátima da Silva e Vanderlei Fernandes da Silva, que foram os maiores professores da minha vida. Finalmente dedico ao Rosário Alves de Jesus, meu esposo, pelo apoio e compreensão. Devo a vocês todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira pela co-orientação, enorme contribuição profissional e amizade ao longo destes dois anos. Um exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião, pelos maravilhosos conselhos que nunca esquecerei. Por sempre se dirigir a todos como um amigo acima de tudo.

Agradeço em especial a Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães, por sua enorme colaboração, dedicação e paciência. Mesmo a conhecendo no final do mestrado deu uma enorme contribuição a este trabalho.

Aos amigos do laboratório de RMN que se mostraram sempre disponíveis, pelo companheirismo e tornar o dia-a-dia de trabalho mais descontraído: Alba Dutra, Amanda Cidade, Brenda Carvalho, Bruno Martinelli, Carolina Matos, Caroline Oliveira, Eudécio Dias, Flávio Carvalho, Francine Pazini, Igor Flores, José Pacífico, Mábio Santana, Nathália Araújo, Rafael Choze, Rangel Luzin, Rejane Mota, Rodrigo Silva, Vinícius Pinto, Yuri Deus.

À Profa. Dra. Sonia Maria Freitas pela colaboração em disponibilizar o equipamento de dicroísmo circular.

A todos os professores que contribuíram a minha formação ao longo de toda minha vida.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	ÍNDICE DE FIGURAS	viii
	ÍNDICE DE TABELAS	xii
	LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	xiii
	RESUMO	xiv
	ABSTRACT	xvi
1.	INTRODUÇÃO	
	1.1. Estrutura dos peptídeos	1
	1.2. Peptídeos antimicrobianos	6
	1.3. Peptídeos de estudo	9
	1.4. Seletividade	12
	1.5. Aspectos estruturais relevantes para a atividade e seletividade antimicrobiana	13
	1.6. Mecanismos de ação	17
	1.7. Determinação da Estrutura de Peptídeos	21
2.	2. OBJETIVO	
	2.1 Objetivos gerais	31
	2.2 Objetivos específicos	31
3.	3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	
	3.1. Dicroísmo Circular (CD)	32
	3.2. Experimentos de RMN de ^{1H}	33
	3.3. Processamento dos dados	36
	3.4. Determinação estrutural dos peptídeos	36
	3.4.1.1. Análises de TOCSY $^{1H-1H}$	37
	3.4.1.2. Análise de COSY $^{1H-1H}$	38
	3.4.1.3. Assinalamento dos sinais de NOE para o peptídeo hilina a1	39
	3.4.1.4 Cálculo estrutural	41
	3.5. Localização dos peptídeos na micela	43
4.	4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
	4.1. Investigação estrutural do peptídeo ocellatina-P1G16	44
	4.2. Investigação estrutural do peptídeo hilina a1	64
5.	5. CONCLUSÃO	81
6.	6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Estrutura geral de um aminoácido 1
Figura 1. 2. Aminoácidos típicos de proteínas. 2
Figura 1. 3. Formação de uma ligação peptídica a partir da condensação de dois aminoácidos. 3
Figura 1. 4. Representação da cadeia principal peptídica. 4
Figura 1. 5. Típica ligação peptídica mostrando ângulos ψ, ϕ e ω. 4

Figura 1. 6. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. Estrutura (A) mista *β*-defensina-2 (código PDB 1FQQ) Sawai, 2001 (B) *β*-curvada thanatina (código PDB 8TFV) Mandard, 1998 (C) folha-*β* polifemusina (código PDB 1RKK) Powers, 2004 (D) *α*-hélice magainina-2 (código PDB 2MAG) Gesell, 1997 (E) *coil* indolicidina (código PDB 1G89) Rosek, 2000. As pontes de dissulfeto estão indicadas em amarelo. Adaptado de Jenssen, 2006. 5
Figura 1. 7. Imagem da rã *Leptodactylus labyrinthicus.* (eol enciclopédia of life, 2011). 10
Figura 1. 8. Imagem da perereca *Hypsiboas Albopunctatus.* (eol enciclopédia of life, 2011). 11
Figura 1. 9. Inter-relação entre os fatores que influenciam a atividade peptídica. Fatores como carga (Q), anfipaticidade (A) e hidrofobicidade (H) são influenciados pela composição e sequência de aminoácidos. Conformação (*X*) e ângulo polar (θ) influenciam a estrutura tridimensional. (Adaptado de Yeaman e Yount, 2003). 14
Figura 1. 10. Ilustração dos modelos descritos: a) *Carpete*, b) Poro toroidal, c) *Barril,* d) Shai-Matsuzaki-Huang e e) Detergente. 20

Figura 1. 11. Espectros de dicroísmo circular típicos para peptídeos estruturados. Verde: espectro característico de estrutura randômica; azul: espectro característico de estrutura em folha-*β* e vermelho: espectro característico de *α*-hélice. 22
Figura 1. 12. Representação de NOEs típicos de uma estrutura secundária em *α*-hélice. 27
Figura 1. 13. Representação tridimensional de uma estrutura secundária em *α*-hélice. 28
Figura 3. 1. Espectrômetro BRUKER AVANCE lll 500. 34
Figura 3. 2. Esquema representativo dos sinais cruzados esperados para um espectro de TOCSY. 37
Figura 3. 3. Esquema representativo dos sinais cruzados esperados para um espectro de COSY. 40
Figura 3. 4. Mapa de contornos de COSY. Ampliação da região de cadeia lateral. As correlações destacadas correspondem ao resíduo de aminoácido isoleucina. 39
Figura 3. 5. Hilina a1 – Ampliação da região de impressão digital do mapa de contornos de NOESY. 38
Figura 3. 6. Possíveis correlações propostas para determinado 41

sinal de NOESY.
Figura 4. 1. Espectros de CD de 42,3 µM do peptídeo ocellatina-P1G16 em SDS e H_2O, sendo $[\theta]_{222nn}$ em função de λ (nm). 44
Figura 4. 2. Espectros de CD da ocellatina-P1G16 em SDS à temperatura de 25 ºC, antes e após submetê-la ao aumento de temperatura. 45
Figura 4. 3. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1) para a ocellatina-P1G16. Ampliação da região de H_N-H_α e cadeias laterais. 46
Figura 4. 4. Índice de deslocamento químico para o peptídeo ocellatina-P1G16 a 1 mM em 100 mM *SDS-d_{25}* e 36℃. 48
Figura 4. 5. Diagrama de conectividade de NOE. As intensidades das interações d_{NN}, $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama com linhas de diferentes espessuras, elas variam de acordo com as intensidades dos sinais, como: fraca, media e forte. As interações de media distância estão representadas pelas linhas finas $d_{\alpha N}$(i,i+3), $d_{\alpha\beta}$(i,i+3), sendo que a extensão de hélice do peptídeo está indicada pelo retângulo na parte inferior do diagrama. 49
Figura 4. 4. Índice de deslocamento químico para o peptídeo ocellatina-P1G16 a 1 mM em 100 mM *SDS-d_{25}* e 36℃. 48
Figura 4. 5. Diagrama de conectividade de NOE. As intensidades das interações d_{NN}, $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama com linhas de diferentes espessuras, elas variam de acordo com as intensidades dos sinais, como: fraca, media e forte. As interações de media distância estão representadas pelas linhas finas $d_{\alpha N}$(i,i+3), $d_{\alpha\beta}$(i,i+3), sendo que a extensão de hélice do peptídeo está indicada pelo retângulo na parte inferior do diagrama. 49
Figura 4. 6. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1). Região ampliada de H_N-H_α do peptídeo ocellatina-P1G16 em 100 mmol.L^{-1} de micelas de SDS-d_{25}. 50
Figura 4. 7. Ocellatina-P1G16 – Mapa de contornos de NOESY, região de impressão digital, peptídeo em 100 mmol.L^{-1} de micelas de SDS-d_{25}, contendo as correlações atribuídas para esta região. 51

Figura 4. 8. Sobreposição das vinte estruturas de menor energia do peptídeo ocellatina-P1G16. 52
Figura 4. 9. Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo ocellatina-P1G16 em presença de micelas de SDS-d_{25}. 53
Figura 4. 10. Sobreposição das três estruturas de menor energia. 54

Figura 4. 11. Ocellatina-P1G16 - Sobreposição dos 20 diagramas de Ramachandran. 55
Figura 4. 12. Mapas de contornos de 1H TOCSY da região de impressão digital (NH-Hα) peptídeo ocellatina-P1G16 em SDS-d25, a 36 ℃. A) antes da adição de D2O e B) 10 hor as e 24 minutos após a adição de D2O. 58

Figura 4. 13. Ocellatina-P1G16 - Estrutura de menor energia com os resíduos que sofreram troca H/D em verde e os resíduos que não trocaram em azul. 59
Figura 4. 14. Ocellatina-P1G16 – Estrutura helicoidal de menor energia, com os quatro resíduos catiônicos destacados em rosa. 60
Figura 4. 15. Projeção de Edmundson para o peptídeo ocellatina-P1G16. O tamanho das barras é proporcional ao valor do índice de hidrofobicidade (Hi) do resíduo. Os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos são destacados através das cores. 61
Figura 4. 16. Demonstração frontal a direita da estrutura de menor energia e a direita das 20 estruturas sobrepostas. Os resíduos hidrofóbicos foram destacados em azul e os hidrofílicos em verde, a região C-terminal sai do plano. 62
Figura 4. 17. Modelo proposto para a orientação do peptídeo ocellatina-P1G16 na superfície das micelas de SDS-d_{25}, em azul resíduos que não sofreram troca H/D e em verde resíduos que trocaram. 63
Figura 4. 18. Espectro de CD de 39,7 µM do peptídeo hilina a1 em SDS e H_2O, $[\theta]_{222\ nn}$ em função de λ (nm).
Figura 4. 19. Espectro de CD da hilina a1 na temperatura de 25ºC, antes e após submetê-la ao aumento de temperatura. 65
Figura 4. 20. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1) para a hilina a1. Ampliação da região de H_N-H_α e cadeias laterais. 66
Figura 4. 21. Índice dedeslocamento químico (CSI), valores iguais a -1 indicam estruturação em hélice. 68
Figura 4. 22. Diagrama de conectividade de NOE inter-residuais, sequenciais e de médias distâncias. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama com linhas de diferentes espessuras, elas variam de acordo com as intensidades dos sinais, como: fraca, media e forte. As interações de media distância estão representadas pelas linhas finas $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$, sendo que a extensão de hélice do peptídeo está indicada pelo retângulo na parte inferior do diagrama. 69
Figura 4. 23. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz). Região de H_N e H_α ampliada da hilina a1 em solução micelar de SDS-d_{25} 100 mmol.L^{-1}. 70
Figura 4. 24. Mapa de contornos de NOESY (500 MHz). Região de H_N-H_α ampliada correspondente ao peptídeo hilina a1 em solução micelar 100 mmol.L^{-1} de SDS-d_{25}. 70
Figura 4. 25. Sobreposição da família de vinte estruturas de menor energia, os hidrogênios foram omitidos para melhor visualização. 72
Figura 4. 26. Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo hilina a1 em presença de micelas de SDS-d_{25} 72

Figura 4. 27. Sobreposição das três estruturas de menor energia. 73

Figura 4. 28. Hilina a1 - Sobreposição dos 20 diagramas de Ramachandran. 74

Figura 4. 29. Mapas de contornos de TOCSY da região de impressão digital (N_H-H_α) do peptídeo hilina a1 em SDS-$d_{25,}$ a 25 ℃. a) antes da adição de D_2O, b) 2 horas, c) 3 horas e d) 4 horas após a adição de D_2O. 76

Figura 4. 30. Hilina a1 - Estrutura de menor energia com os resíduos que sofream troca H/D em azul e os resíduos que não trocaram em verde, após 3 horas de experimento. 77

Figura 4. 31. Hilina a1 – Localização dos 4 resíduos catiônicos (rosa) na estrutura helicoidal. 77

Figura 4. 32. Projeção de Edmundson para o peptídeo ocellatina-P1G16. O tamanho das barras é proporcional ao valor do índice de hidrofobicidade (Hi) do resíduo. 78

Figura 4. 33. Demonstração frontal a direita da estrutura de menor energia e a direita das 20 estruturas sobrepostas. Os resíduos hidrofóbicos foram destacados em azul e os hidrofílicos em verde, a região C-terminal sai do plano. 79

FIGURA 4. 34. MODELO PROPOSTO PARA A ORIENTAÇÃO DO PEPTÍDEO HILINA A1 NA SUPERFÍCIE DAS MICELAS DE SDS-D_{25}, EM AZUL RESÍDUOS QUE NÃO SOFRERAM TROCA H/D E EM VERDE RESÍDUOS QUE TROCARAM. 80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. 1 Estudos relacionados a peptídeos biologicamente ativos. 8

Tabela 1. 2. Modificações realizadas no peptídeo nativo 12

Tabela 3. 1. Sequência primária dos peptídeos de estudo. 32

Tabela 3. 2. Parâmetros utilizados para cada experimento e peptídeo. 71

Tabela 3. 3. Parâmetros utilizados nos experimentos de TOCSY troca H/D, relativo a cada peptídeo. 43

Tabela 4. 1. Deslocamentos químicos de ^{1}H (ppm) para o peptídeo ocellatina-P1G16 na presença de 100 mmol.L^{-1} de SDS-d_{25}, a 36℃. 47

Tabela 4. 2. Estatística para as 20 estruturas do peptídeo ocellatina-P1G16. 52

Tabela 4. 3. Estatística dos desvios médios quadráticos 54

Tabela 4. 4. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (ppm) para o peptídeo hilina a1 em solução micelar 100 mmol.L-SDS-d_{25}, a 25℃. 67

Tabela 4. 5. Análise estatística das 20 estruturas do peptídeo hilina a1. 35

Tabela 4. 6. Estatística dos desvios médios quadráticos 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Experimento unidimensional
2D	Experimento bidimensional
AQ	Tempo de aquisição
C-terminal	Região carboxi terminal de um peptídeo
CD	Dicroísmo Circular
COSY	Espectroscopia de correlação (do inglês *Correlated Spectroscopy*)
D_2O	Água deuterada
FID	Decaimento Livre de Indução
Hz	Hertz
Δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento escalar
N-terminal	Região amino-terminal de um peptídeo
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (do inglês *nuclear Overhauser effect spectroscopy*)
NS	Número de transientes
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio padrão quadrático médio (do inglês *root mean square deviation*)
SA	Arrefecimento simulado (do inglês *simulated annealing*)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TFE	Trifluoroetanol
TOCSY	Espectroscopia de correlação total (do inglês *total correlation spectroscopy*)
δ	Deslocamento químico

RESUMO:

Atualmente o surgimento de fungos, bactérias e vírus resistentes a múltiplos fármacos tem estimulado o interesse pelo desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos com maior potencial terapêutico. Eles em geral possuem propriedades de extrema importância como um amplo espetro ação antimicrobiana, toxicidade seletiva, ação rápida e mecanismos de ação específicos. Muitas dessas características podem ser encontradas em peptídeos isolados da secreção cutânea de anuros.

O principal fator que diferencia peptídeos antimicrobianos de antibióticos utilizados na terapia convencional está relacionado com o seu mecanismo de ação. A força motriz para a ação de grande parte de peptídeos antimicrobianos é sua habilidade em provocar lise em membranas celulares, matando rapidamente um amplo espectro de microorganismos. Nesse sentido, a conformação do peptídeo tem uma grande importância em sua interação com a estrutura anfifílica das membranas biológicas. Nesse contexto, a determinação da estrutura tridimensional por meio da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possibilita a identificação da posição espacial de cada resíduo de aminoácido na estrutura terciaria, destacando aqueles que são importantes para a sua ação e que, portanto, poderiam ser modificados para aumentar a atividade antimicrobiana. O estudo da estrutura 3D dos peptídeos em soluçao é uma vantagem da espectroscopia de RMN, pois se consegue simular o ambiente fisiológico por meio de sulfactantes.

Nesse contexto, determinou-se através da RMN a estrutura tridimensional de dois peptídeos sintéticos: ocellatina-P1G16

(GLLDTLKGAAKNVVGGLASKVMEKL-NH_2) isolado dos anfíbios *Leptodactylus labyrinthicus*, e o peptídeo hilina a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH_2), isolado do anfíbio *Hypsiboas albopunctatus.*

A anfipaticidade da estrutura pode ser observada pela separação da estrutura em duas faces distintas, uma hidrofobica (apolar) e outra hidrofilica (polar). O peptídeo hilina a1, em presença de SDS-d_{25}, apresentou estrutura helicoidal entre os resíduos Ile-5 a Ile-17 e o peptídeo ocellatina-P1G16, em presença de SDS-d_{25}, apresentou estrutura em *α*-hélice entre os resíduos Leu-3 a Lys-24, ambos em *α*-hélice anfipática.

Por fim, as análises moleculares de anfipaticidade, interação eletrostática, polaridade e troca H_2O/D_2O, apontaram a mesma face de interação dos peptídeos com a membrana, propondo um modelo de orientação paralela para o peptídeo hilina a1 e para o peptídeo ocellatina-P1G16 uma orientação paralela, porém com a porção c-terminal mergulhada na micela de SDS-d_{25} entre os resíduos Ser-19 e Leu-25. Tais características estruturais tornam esses peptídeos candidatos promissores para o desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano.

ABSTRACT:

Currently, the emergence of fungi, bacteria and viruses resistant to multiple drugs has stimulated interest in the development of antimicrobial peptides with increased therapeutic potential. They generally have properties of extreme importance as antimicrobial selective toxicity, rapid action, specific mechanisms of action and a broad spectrum of antimicrobial action. Many of these features can be found in peptides isolated from frog skin secretions.

The main factor that differentiates antimicrobial peptides from other commonly antibiotics used in the conventional therapy is related to their mechanism of action. The driving force for much of the action of antimicrobial peptides is their ability to lysis cell membranes, rapidly killing a broad spectrum of microorganisms. Accordingly, the conformation of the peptide has a great importance in their interaction with the amphiphilic structure of biological membranes. The determination of the tridimensional structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique allows the identification of the spatial position of each amino acid residue and highlighting those that are important for its action and, therefore, could be modified to increase the antimicrobial activity. The study of the three-dimensional structure of peptides in solution is an advantage of the NMR spectroscopy, since it can simulate the physiological environment, by means of surfactants.

In this context, the tridimensional structures of two synthetic peptides: ocellatin-P1G16 (GLLDTLKGAAKNVVGGLASKVMEKL-NH_2), isolated from the amphibians *Leptodactylus labyrinthicus*, and hylin a1

(IFGAILPLALGALKNLIK-NH_2), isolated from *Hypsiboas Albopunctatus,* were proposed by NMR.

The amphipathic caracter can be visualized by separation of the helix into two distinct sides, one hydrophobic (nonpolar) and the other hydrophilic (polar). The peptide hylin a1 in presence of SDS-d_{25} showed helical structure between residues Ile-5 to Ile-17 and the peptide ocellatin-P1G16 in SDS-d_{25} micelles showed a α-helical structure between residues Leu-3 to Lys-24, both are presented in amphipathic α-helix

Finally, the molecular analyses of amphipathicity, electrostatic interaction, polarity and exchange hydrogen/deuterium, corroborate the proposed model, suggesting a model of parallel orientation to the peptide hylin a1 and the peptide ocellatin-P1G16 a parallel orientation, but with the c-terminal portion immersed in the micelle SDS-d_{25} between residues Ser-19 to Leu-25, as observed by analyzing exchange hydrogen/deuterium. These structural characteristics make these peptides promising candidates for the development of a new antimicrobial drug.

1. INTRODUÇÃO

Em 1839, o químico holandês Gerardus Mulder Johannes, ao analisar substâncias albuminosas, propôs a formula geral comum as albuminosas a partir da composição $C_{40}H_{62}O_{12}N_{10}$, chamou então esta versátil classe de compostos orgânicos de proteínas, que significa “mais importante”. Atualmente as proteínas são consideradas elementos de importância crucial para a vida (Asimov, 1973).

1.1. Estrutura dos peptídeos

Uma molécula de peptídeo é formada por um conjunto de dois ou mais resíduos de aminoácidos unidos por ligações covalentes, sendo que cada aminoácido individual em um peptídeo é chamado de resíduo. Eles são constituídos por um grupo amino e carboxílico, ambos ligados ao carbono alfa, que quando em solução se apresentam em equilíbrio entre a forma não iônica e a forma zwitteriônica (Metzler, 2003).

A Figura 1.1 mostra a estrutura geral para os aminoácidos que participam da formação de um peptídeo; um grupo carboxilato (COO^-) e um grupo amino protonado (NH_3^+), ligados a um átomo de carbono C_α (Carbono alfa). O grupo R, designado por cadeia lateral, é o que diferencia um aminoácido do outro (Harvey *et al*., 2001). Dentre uma das características de grande importância nos aminoácidos é apresentarem carácter zwiteriônico, ou seja, apresentam polaridades opostas em uma mesma molécula, sendo uma das extremidades pK_a (COOH) ácido e a outra pK_a (NH_2) básico.

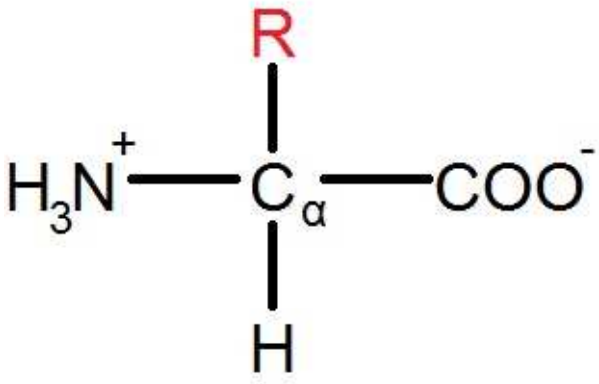


Figura 1. 1. Estrutura geral de um aminoácido

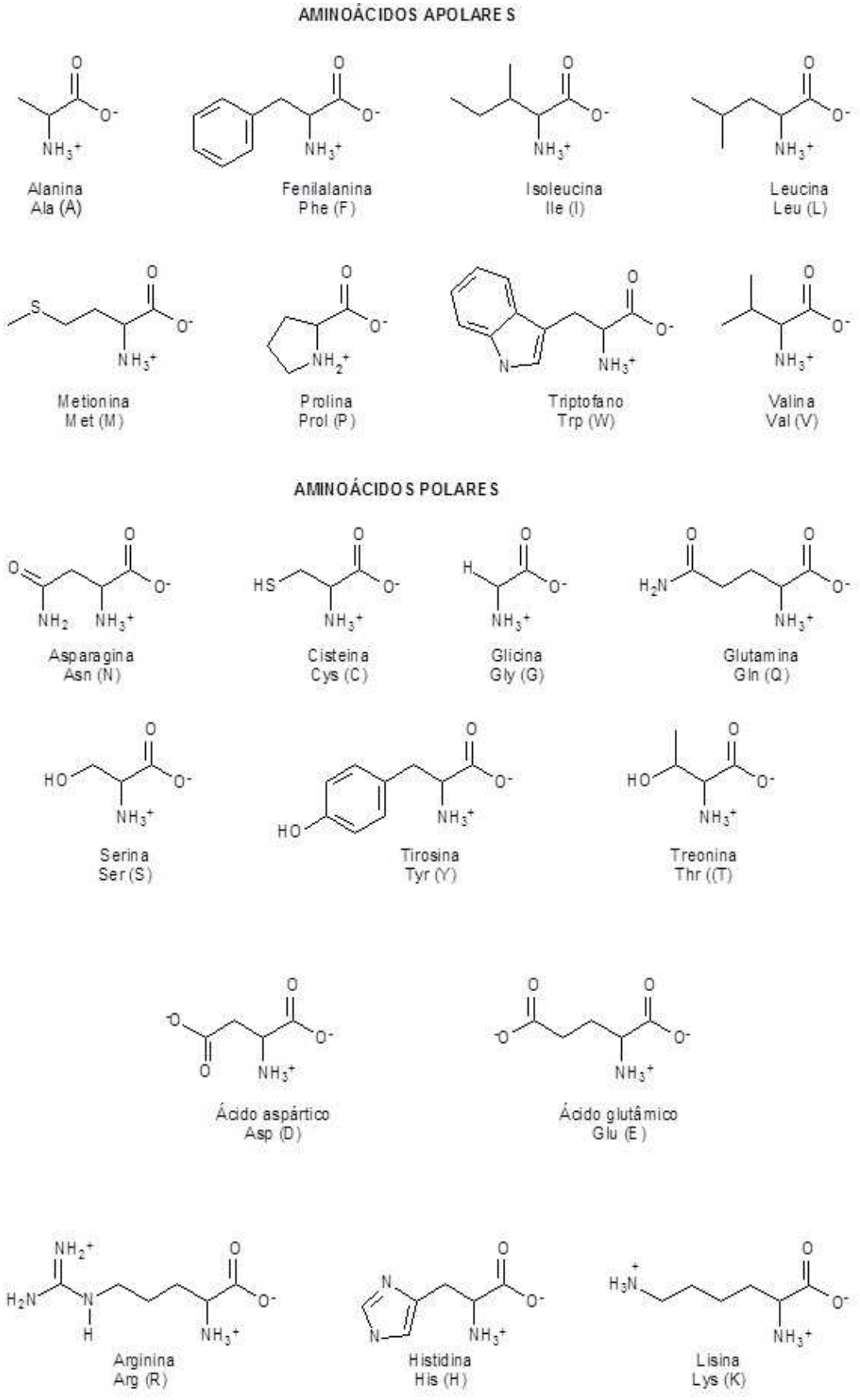


Figura 1. 2. Aminoácidos típicos de proteínas.

Os grupos amino e ácido carboxílico dos aminoácidos se encontram, normalmente, na forma ionizada em solução aquosa. Em meio neutro o grupo carboxila tende a ceder um próton para a água e nessas condições é encontrado na forma de carboxilato (COO^-). O grupo amino tende a ligar-se ao íon H^+ em solução, por isso tipicamente se apresenta na forma NH_3^+. A associação/dissociação do próton está ligada à concentração destes íons em solução, ou seja, o pH (Lehninger, 1995). A Figura 1.2 mostra os 20 aminoácidos padrões em proteínas, em pH fisiológico de 7,4.

De forma simplificada, a formação da ligação peptídica envolve a condensação de dois aminoácidos, eliminando uma molécula de água pela remoção da hidroxila do grupo carboxílico de um aminoácido e a remoção de um hidrogênio de outro aminoácido (Figura 1.3). Esse processo resulta na formação de um peptídeo com a sequência (-N-$C_{\alpha 1}$-C-N-$C_{\alpha 2}$-C-) que se repete por toda a cadeia peptídica designada como cadeia principal (Figura 1.4). Por convenção, as sequências primárias dos peptídeos se iniciam com o resíduo N-terminal à esquerda e terminam com o resíduo C-terminal à direita.

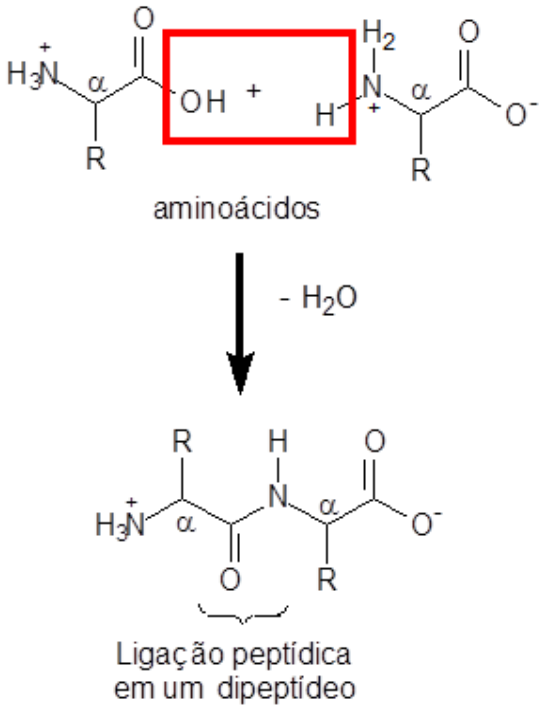


Figura 1. 3. Formação de uma ligação peptídica a partir da condensação de dois aminoácidos.

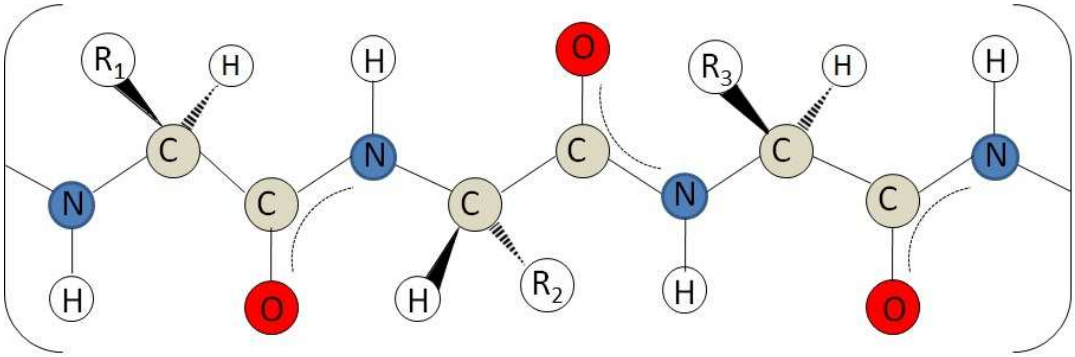


Figura 1. 4. Representação da cadeia principal peptídica.

A geometria da cadeia principal dos peptídeos apresenta alguns aspectos importantes a sua estruturação. A planaridade da ligação peptídica, que apesar de apresentar ligações simples entre o carbono carbonílico e o átomo de nitrogênio, possui o caráter de ligação dupla parcial devido à conjugação entre os elétrons não ligantes do nitrogênio anímico com os elétrons π da ligação C=O.

Embora a ligação peptídica seja plana, as ligações carbono-carbono e carbono-azoto em cada resíduo de aminoácido possuem grande liberdade de torção, resultando em estruturas semirrígidas delimitadas pelos ângulos ψ e ϕ. As rotações ao redor das ligações ao carbono alfa é o que permite a ocorrência de uma grande diversidade de estruturas. Os ângulos ψ e ϕ (Figura 1.5) podem variar de resíduo para resíduo em um peptídeo, possibilitando assim um grande número de conformações possíveis, como por exemplo, Figura 1.6.

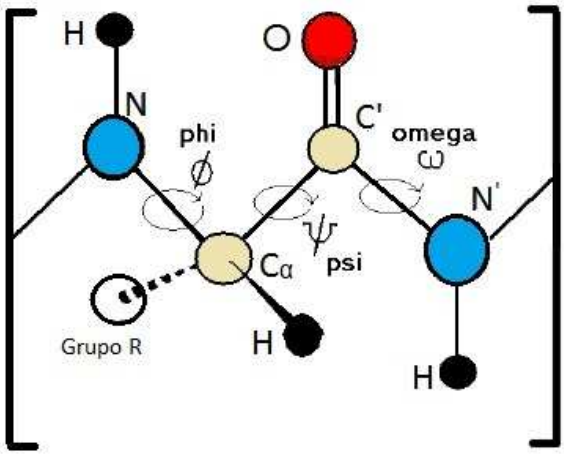


Figura 1. 5. Típica ligação peptídica mostrando ângulos ψ, ϕ e ω.

As estruturas de peptídeos e proteínas podem ser descritas em quatro níveis estruturais: primário, secundário, terciário e quaternário. Todos possuem uma influência direta na atividade biológica observada (Apponyi, 2004).

A estrutura primária, que corresponde ao nível estrutural mais simples, refere-se à sequência específica linear de aminoácidos ligados covalentemente ao longo da cadeia polipeptídica. A estrutura secundária relaciona a forma que a cadeia polipeptídica assume no espaço, podendo ser *α*-hélice folha-*β*, *coil* e *turns* (Figura 1.6), sendo as duas primeiras mais comumente observadas.

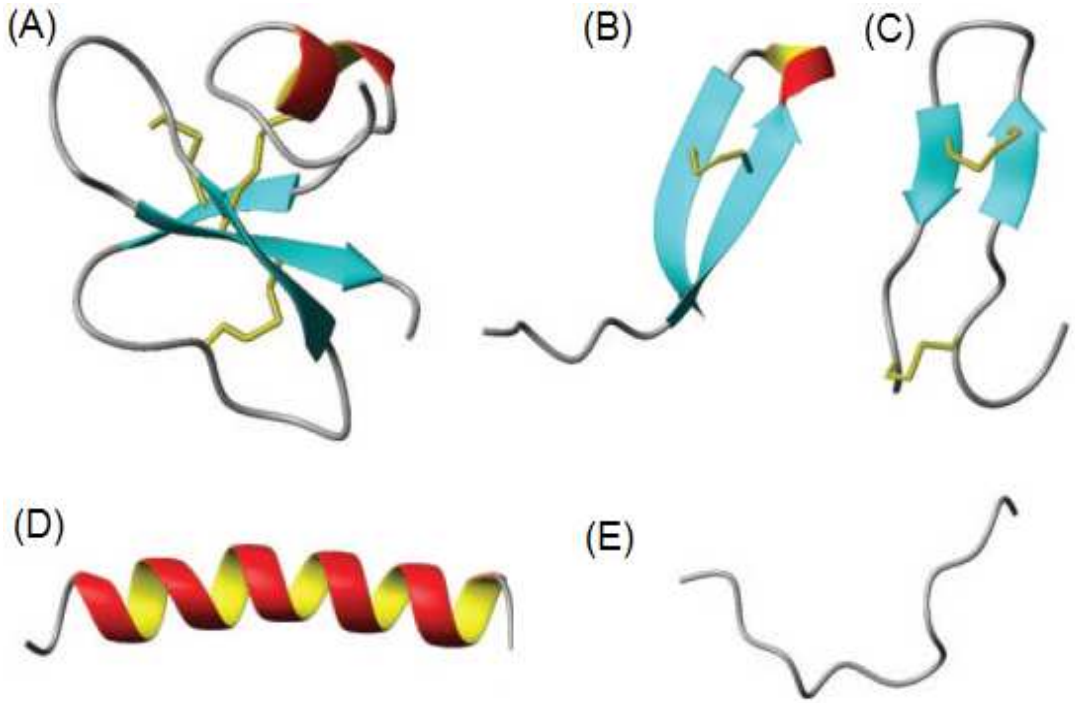


Figura 1. 6. Classes estruturais de peptídeos antimicrobianos. Estrutura (A) mista *β*-defensina-2 (código PDB 1FQQ) Sawai, 2001 (B) *β*-curvada thanatina (código PDB 8TFV) Mandard, 1998 (C) folha-*β* polifemusina (código PDB 1RKK) Powers, 2004 (D) *α*-hélice magainina-2 (código PDB 2MAG) Gesell, 1997 (E) *coil* indolicidina (código PDB 1G89) Rosek, 2000. As pontes de dissulfeto estão indicadas em amarelo. Adaptado de Jenssen, 2006.

Para a maioria dos peptídeos antimicrobianos as estruturas em *α*-hélices são formadas apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana, sua principal estabilização pode ocorrer principalmente pelas

interações de hidrogênio entre o grupo CO de um aminoácido e HN do aminoácido a quatro unidades à frente na sequência peptídica. As estruturas folhas-*β* podem ser estabilizadas por ligações de hidrogênio e dissulfeto, sendo a primeira entre o grupo H_N de uma fita *β* com o grupo CO de outra fita *β*, formando assim uma estrutura em folha.

As estruturas terciárias descrevem todos os aspectos do espaço tridimensional das proteínas e peptídeos, elas correspondem às relações da cadeia polipeptídica no sentido de estabilizar a conformação tridimensional. Dentre as interações químicas que ocorrem para garantir a estabilidade das cadeias polipeptídicas estão; ligações covalentes, interações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações fracas de van der Waals, interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas.

As estruturas helicoidais ocorrem na maior parte dos casos em meio extracelular, e são formadas na interação do peptídeo com a superfície externa da membrana, em soluções aquosas a maioria dos peptídeos se apresentam em conformação randômica (Dathe e Wieprecht, 1999; Yeaman e Yount, 2003).

1.2. Peptídeos antimicrobianos

A pele dos anfíbios é fonte de uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas. Essas substâncias são responsáveis por: proteção contra abrasão, respiração cutânea, osmorregulação e secreção de substâncias protetoras contra parasitas e predadores (Clarke, 1997). Dentre as substâncias que são excretadas pelas glândulas granulosas dos anfíbios, podem-se destacar os peptídeos, que são potenciais agentes bioativos, como a bombinina, extraída do espécime Bombina variegata (Csordas e Michel, 1969), ela representa o primeiro relato de atividade antimicrobiana de peptídeos.

O surgimento de fungos, bactérias e vírus resistentes a múltiplas drogas tem impulsionado o interesse na descoberta de novas classes de agentes antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação. A necessidade crescente da indústria farmacêutica por novos medicamentos com eficácia maior aos já existentes no mercado gera a perspectiva de um

retorno satisfatório do investimento no desenvolvimento de medicamentos (Theuretzbacher, 2009).

Nos dias atuais, tem sido bastante explorado o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos antimicrobianos, com atividade apoptótica e necrótica a todas as classes de câncer, incluindo leucemia, melanoma, inibidores de tumores e atividade imunoestimulatoria, que estimulam o sistema imunológico do paciente em tratamento, além de prevenirem metástase (Bhutia e Maiti, 2008). Theuretzbacher (2009) apresenta perspectivas para os próximos 5-7 anos para novos antibióticos que poderão estar disponíveis para o tratamento de patógenos resistentes.

Mais de 3700 peptídeos antimicrobianos, provenientes de peixes, plantas, anfíbios mamíferos e outras fontes, já foram isolados e identificados (Brouwer, 2011). Atualmente, no Antimicrobial Peptide Database (2011), encontram-se cadastrados 1815 peptídeos antimicrobianos, apresentando uma média de 31 resíduos por peptídeo. Destes, são relatados 122 peptídeos antivirais, 566 antifúngicos, 1418 antibacterianos, 42 antiparasitários, 20 inseticidas, 9 espermicidas, 85 anti-HIV, 122 anticâncer e 20 quimiotáticos. Entretanto, apenas 234 peptídeos possuem as estruturas terciárias conhecidas, sendo 224 estabelecidas por RMN e 10 por difração de raios-X. A Tabela 1.1 apresenta alguns exemplos de peptídeos antimicrobianos descritos na literatura.

O grande potencial terapêutico destes peptídeos se deve à sua capacidade em promover a morte de patógenos humanos, fornecendo uma toxicidade baixa e ação rápida (Matsuzaki, 1999). Além disso, são altamente específicos para os seus alvos, apresentam boa penetrabilidade nos tecidos e sinergismo com quimioterápicos clássicos, não estimulam o aparecimento de resistência pelas células (Hancock e Scott, 2000; Brouwer *et al.*, 2011) e possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana (Barra e Simmaco, 1995).

Tabela 1. 1. Estudos relacionados a peptídeos biologicamente ativos.

Peptídeo	Atividade	Referência
Filoseptinas	Antibacteriano e tripanomicida, podendo ser usado na transfusão de sangue.	Leite *et al.*, 2005
Dermaseptina e magainina-a	Antiprotozoária, antibacteriana, antiviral, antifúngica e espermicida (contraceptivo vaginal).	Brand *et al.*, 2006 Zairi *et al*., 2005; Reddy *et al.*, 1996
Magainina	Inibe o crescimento de bactérias e fungos e induz a lise osmótica de protozoários	Zasloff, 1987 Zasloff, *et al*., 1988
Dermaseptina, caerina 1.1, caerina 1.9 e maculatina 1.1	Contra bactérias, fungos filamentosos e inibe completamente a infecção pelo vírus HIV.	Vancompernolle *et al*., 2005
Pequenos peptídeos: dynastin, electrin, fletcherin, lesueurin, mactulatin, rubellidin, signiferin e tryptophyllin	Antifúngica, antimalárica, antitumoral e antibacteriana.	Apponyi *et al*., 2004
Gaegurin	Contra tumores resistentes induzindo apoptose das células tumorais.	Kim *et al*., 2003
Caspases	Induz a morte da célula cancerígena por apoptose indiretamente, atingindo sinais responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular.	Alam, 2003
LL-37	Bactericida, porém não possui especificidade por cargas, se ligando também a células eucariontes.	Papo e Shai, 2005
Hecate, phor e análogos	Atuam em receptores hormonais, exibindo uma potente atividade anticâncer (próstata, mama, ovário e testículo)	Leuschner e Hansel, 2005
CA-4-P, DMXAA, AVE8062 e ZD6126	Causam a necrose do tumor sanguíneo, deixando o fluxo sanguíneo e tecidos normais relativamente intactos.	Tozer *et al.*, 2005

Os peptídeos antimicrobianos são bastante diferentes dos antibióticos atualmente utilizados nos processos terapêuticos, tanto em sua estrutura quanto em seu mecanismo de ação. Os mecanismos de ação dos peptídeos geralmente não são específicos, portanto o surgimento de resistência a eles pelos microrganismos ocorre a uma taxa bem inferior que aos antibióticos convencionais (Conlon *et al.*, 2004). Podem ainda ser utilizados concomitantemente com antibióticos clássicos. Esta estratégia está se mostrando bastante útil no combate às infecções por patógenos resistentes (Yeaman e Yount, 2003).

1.3. Peptídeos de estudo

1.3.1. Ocellatina-P1G16

O peptídeo ocellatina-P1G16, é um análogo do peptídeo ocellatina (Libéro, 2009), extraído da rã *Leptodactylus labyrinthicus* (Figura 1.7), diferindo somente em um resíduo de aminoácido serina na posição 16, modificado por uma glicina na ocellatina-P1G16 (Conlon, 2008) Essa modificação de serina para glicina é conhecida como mutação conservativa. Testes realizados pelo grupo da Profª. Drª. Mariana de Souza Castro do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB) mostraram que o peptídeo em estudo ocellatina-P1G16 possui uma efetiva ação às bactérias patogênicas.

O gênero *Leptodactylus* pertence à família Leptodactitidae, contém 81 espécimes espalhadas nas Américas do Norte e do Sul, e nas Índias Orientais (Frost, 2011). Entre os muitos espécimes que possuem peptídeos biologicamente ativos estão *L. knudseni, L. pentadactylus e L. Labyrinthicus.* Os três espécimes de anuros apresentam em comum um peptídeo com a mesma sequência primária: G-L-L-D-T-L-K-G-A-A-K-N-V-V-G-S-L-A-S-K-V-M-E-K-L, que por uma questão de terminologia antes era chamado de pentadactilina (Hedges, 2007) e passou a ser chamado de ocellatina (Conlon, 2008).

L. labyrinthicus, também conhecida como rã-pimenta, é uma rã de grande porte. O peptídeo pentadactilina retirado desse espécime *L. pentadactylus,* macho de rãs, da América do Sul, inibiu bactérias Gram-

negativas (*Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa*) e bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Enterococcus faecalis e Streptococcus B*), mostrando baixa atividade hemolítica contra eritrócitos. (Libério, 2008; King, 2005).

O peptídeo bioativo ocellatina foi avaliado em ensaios biológicos utilizando células de fibroblastos, porém se mostrou menos efetivo que para células tumorais. Estudos de mecanismos de ação revelaram que a ocellatina causa alteração morfológica, disrupção da membrana, fragmentação do DNA, paralisa o ciclo da célula na fase S e altera o potencial da membrana mitocondrial, sugerindo assim morte celular por apoptose (Libério, 2009).

Figura 1. 7. Imagem da rã *Leptodactylus labyrinthicus.* (eol enciclopédia of life, 2011).

1.3.2 Hilina a1

Hypsiboas albopunctatus é um anuro que ocorre na região central, sul e sudeste do Brasil, leste da Bolívia, nordeste da Argentina, Paraguai e norte do Uruguai (Muniz, 2008). O peptídeo hilina a1 cuja sequência primária está na Tabela 1.2, foi o primeiro peptídeo isolado do espécime *H. albopunctatus* (Figura 1.8), proveniente da América do Sul (Castro *et al*., 2009).

Em testes *in vitro*, o peptídeo hilina a1 exibiu uma elevada atividade antimicrobiana, principalmente quando testada em bactérias gram-positivas. Esse peptídeo apresentou também atividade antifúngica frente à *Candida* albicans, *Enterococcus faecalis* e *Cryptococcus neoformans*. A hilina a1 e seus análogos sintéticos, ativos aos mesmos microrganismos, podem ser usados como compostos antifúngicos, provavelmente apresentando menor toxicidade ao ser humano, que agentes clássicos como fluconazol e anfotericina B, usados neste tipo tratamento. Apesar do peptídeo hilina a1 apresentar atividade a eritrócitos humanos, esta é menor que a de peptídeos clássicos como melitina, um peptídeo hemolítico e antimicrobiano encontrada no veneno de abelhas (Castro , *et al*., 2009).

Figura 1. 8. Imagem da perereca *Hypsiboas Albopunctatus.* (eol enciclopédia of life, 2011).

O trabalho realizado por Crusca e colaboradores (2011) mostrou que as alterações realizadas na sequência do peptídeo hilina a1 (Tabela 1.2) influenciou na hidrofobicidade, anfipaticidade e na porcentagem de hélice, influenciando consequentemente no índice terapêutico e na especificidade frente a diferentes bactérias.

O peptídeo nativo foi sintetizado gerando quatro análogos (Tabela 1.2). Promoveram-se modificações nas cargas N-terminal nos sintéticos K0-W6-Hy-a1 e D0-W6-Hy-a1 e substituição da leucina na posição 6 por

triptofano para os quatro análogos. A modificação da carga no N-terminal nos peptídeos análogos aumentou a especificidade contra bactérias e fungos, apresentando uma menor atividade hemolítica que seu nativo. Provavelmente as modificações realizadas nos análogos, adição do triptofano, tenha sido responsável pelo aumento da afinidade do peptídeo pela membrana, uma vez que este possui uma maior afinidade à superfície da membrana (Crusca, 2011).

O aumento da hidrofobicidade resulta no aumento da toxicidade às células eucarióticas que, em alguns casos, leva a uma menor especificidade antimicrobiana, portanto, o ideal é que o peptídeo possua uma moderada hidrofobicidade (Yeaman e Yount, 2003), pois um alto grau de hidrofobicidade conduz a um domínio hidrofóbico com maior toxicidade para células compostas por fosfolipídios neutros (células eucariontes), devido ao aumento da atividade de permeabilização (Dathe e Wieprecht, 1999).

Tabela 1. 2. Modificações realizadas no peptídeo nativo

Peptídeo	Sequência de aminoácidos
Hilina a1	IFGAILPLALGALKNLIK
W6-Hy-a1	IFGAI**W**PLALGALKNLIK
Ac0-W6-Hy-a1	Ac-IFGAI**W**PLALGALKNLIK
K0-W6-Hy-a1	**K**IFGAI**W**PLALGALKNLIK
D0-W6-Hy-a1	**D**IFGAI**W**PLALGALKNLIK

1.4. Seletividade

Existem algumas diferenças fundamentais entre as células eucariontes e microbiana, que geram a afinidade seletiva de vários peptídeos antimicrobianos. As mais significantes distinções estão na composição da membrana, polarização, potencial energético e características estruturais (Yeaman e Yount, 2003).

Uma característica essencial para qualquer biomembrana é a bicamada fosfolipídica, ela possui um caráter anfipático, ou seja, é composta por uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. No caso de células eucarióticas, a membrana celular é composta principalmente por fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, esfingomielina e esteróis (Yeaman e Yount, 2003). A membrana eucariótica, em geral, não possui carga total, em contraste com as membranas de muitos microrganismos (bactérias) são constituídas de

fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatidilserina e fosfolipídios hidroxilados, que resultam em uma rede de carga altamente negativa, permitindo a atração dos peptídeos catiônicos (Matsuzaki, 1999).

Outra diferença entre as células eucarióticas e procarióticas está na separação de cargas entre as faces intracelular e extracelular. Esse gradiente eletroquímico resulta na diferença da extensão e taxa de fluxo de prótons através da membrana, chamado de potencial transmembrana. Isso ocorre, pois as células eucariontes exibem um potencial transmembranar entre -90 e -110 mV. Já para as células microbianas, esse potencial está entre -130 e -150 mV (Yeaman e Yount, 2003). Portanto, a diferença do potencial transmembrana é um parâmetro adicional para a seletividade dos peptídeos antimicrobianos (Hancock, 1997).

1.5. Aspectos estruturais relevantes para a atividade e seletividade antimicrobiana

Grande parte dos peptídeos antimicrobianos provenientes da secreção de anuros possuem características em comum, como: possuem entre 12 e 50 resíduos de aminoácidos, vários resíduos hidrofóbicos, carga total positiva devido ao excesso de resíduos de lisina, histidina e arginina (Hancock e Scott, 2000), alto momento hidrofóbico e conformação em *α*-hélice anfipática (Hancock e Chapple, 1999).

As atividades biológicas dos peptídeos podem ser influenciadas por cinco interações complexas como: conformação (***X***), carga (Q), hidrofobicidade (H), anfipaticidade (A) e ângulo polar (θ) (Powers e Hancock, 2003). Alterações nestes fatores podem causar um grande efeito na relação estrutura/atividade do peptídeo em solução. Portanto, a eficácia de ação dos peptídeos está nessas relações relevantes (área sombreada), e como elas se relacionam (Figura 1.9).

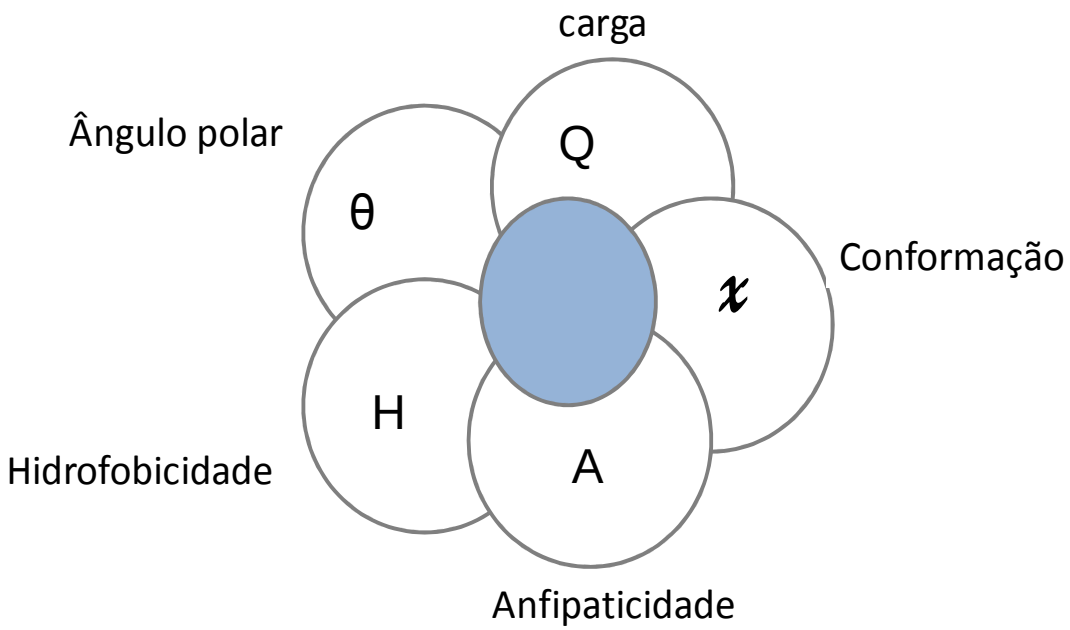


Figura 1. 9. Inter-relação entre os fatores que influenciam a atividade peptídica. Fatores como carga (Q), anfipaticidade (A) e hidrofobicidade (H) são influenciados pela composição e sequência de aminoácidos. Conformação (*X*) e ângulo polar (θ) influenciam a estrutura tridimensional. (Adaptado de Yeaman e Yount, 2003).

1.5.1. Conformação

Os peptídeos podem apresentar adaptações estruturais durante sua interação com as membranas fosfolipídicas. Em grande parte dos casos sua estrutura até então randômica (em solução), quando em contato com a membrana sofrem adaptações resultando em inclinação ou torção da estrutura, e até mesmo reorientação das cadeias laterais (Nyholm, *et al*. 2007).

Apesar dos peptídeos antimicrobianos poderem apresentar uma grande diversidade estrutural, é possível agrupá-los em quatro classes distintas de estruturas secundárias (Jenssen *et al.*, 2006).

Estudos mostram a influência da dinâmica conformacional do peptídeo antimicrobiano na sua toxicidade seletiva (Zhang *et al*., 2001; Unger *et al*., 2001 e Tam *et al*., 2000). Segundo pesquisas realizadas por Dathe e colaboradores (1996), existe uma relação entre helicicidade e atividade. Observou-se que uma baixa helicicidade resulta em uma baixa

afinidade e permeabilidade em membranas neutras, por exemplo, glóbulos vermelhos do sangue (eritrócitos).

1.5.2. Carga

Existem modelos que mostram a importância do caráter catiônico para a atração de peptídeos à superfície das membranas de bactérias e de outros microrganismos (Bechinger, 2004). A cationicidade que geralmente varia entre +2 e +9, favorece uma maior afinidade dos peptídeos pelos fosfolipídios ácidos (carregados negativamente) presentes nas membranas dos microrganismos. O caráter catiônico ocorre devido à presença de resíduos de aminoácidos alcalinos: arginina, lisina e histidina. Estudos realizados por Lorin e colaboradores (2005) mostram que o aumento da carga positiva do peptídeo e redução da hidrofilicidade está relacionado a uma maior seletividade antimicrobiana e menor toxicidade a células eucariontes (Lorin *et al.*, 2005).

Existe uma alta afinidade catiônica do peptídeo carregado positivamente pela membrana, devido às forças eletrostáticas. Porém o excesso de cationicidade pode, em alguns casos, aumentar a atividade hemolítica e reduzir a atividade antimicrobiana dos peptídeos, devido ao aumento da repulsão eletrostática intermolecular nos poros, levando a diminuição e desestabilização do poro (Dathe e Wieprecht, 1999). Foi observado que, quando as interações eletrostáticas diminuem devido à redução da carga da bicamada lipídica, ocorre também a diminuição dessa afinidade. Em contrapartida, a interação hidrofóbica se torna mais pronunciada (Dathe *et al*, 1996 e Wieprecht *et al*, 1996). Em casos de bactérias Gram-negativas, Hancock e Scott (2000) propõe que o peptídeo interage com a membrana, matando as células em um mecanismo envolvendo ataques em vários alvos aniônicos.

1.5.3. Hidrofobicidade

O momento hidrofóbico apresenta um pequeno papel na permeabilização de membranas lipídicas altamente carregadas, no entanto, influencia substancialmente os efeitos dos peptídeos antimicrobianos em

membranas lipídicas neutras (Dathe e Wieprecht, 1999). A hidrofobicidade de um peptídeo depende da porcentagem de resíduos hidrofóbicos, sendo um fator essencial para o aumento das interações entre as cadeias acil dos lipídios e a porção hidrofóbica da *α*-hélice. Quando ocorre a interação do peptídeo com a membrana, as cadeias laterais polares e apolares dos resíduos de aminoácidos se posicionam adequadamente, de forma que a face hidrofóbica interaja com a membrana e a hidrofílica com o solvente e as cabeças polares dos fosfolipídios (Conlon, 2007). Assim, ela se faz necessária para que haja uma efetiva permeabilização na membrana.

1.5.4. Anfipaticidade

Muitos peptídeos, quando em contato com a superfície da membrana, sofrem mudanças conformacionais adotando uma estrutura anfipática (Bechinger, 2004). A anfipaticidade é caracterizada pela separação do peptídeo em duas faces distintas: uma face hidrofóbica e outra hidrofílica, normalmente com carga líquida positiva, no caso de estruturas *α*-helicoidais.

A extensão da *α*-hélice anfipática pode influenciar a atividade do peptídeo, pois ela reflete a habilidade em formar domínios hidrofóbicos e hidrofílicos. Se, portanto, a interação peptídica for anfipática, sua maior afinidade será pelas membranas neutras e zwitteriônicas (Dathe e Wieprecht, 1999).

1.5.5. Ângulo polar

A proporção relativa de facetas polares versus não polares de um peptídeo em *α*-hélice é chamada ângulo polar. Se uma das facetas é composta apenas por resíduos hidrofóbicos e a outra por hidrofílicos, então o ângulo polar será de 180°. O aumento da proporção hidrofílica de um peptídeo em *α*-hélice pode reduzir o ângulo polar, levando a maior capacidade de permeabilizar membranas e a uma maior estabilidade e meia vida dos poros (Yeaman e Yount, 2003). Em contrapartida, o aumento do ângulo polar diminui a atividade hemolítica e reduz o momento hidrofóbico (Dathe e Wieprecht, 1999).

1.6. Mecanismos de ação

O que difere os mecanismos de ação de antibióticos clássicos e de peptídeos é que o primeiro se baseia em inibições enzimáticas, sendo relativamente lentos, e o segundo interage de forma imediata à superfície de células bacterianas, causando geralmente perturbações na estrutura da bicamada lipídica, provocando a lise celular. Dessa forma, a resistência contra peptídeos bioativos se torna menos provável (Zasloff, 2002).

O mecanismo pelo qual os peptídeos permeabilizam a membrana bacteriana e como exercem sua atividade antimicrobiana ainda não é completamente definido. Porém todos chegam ao comum acordo de que ocorre uma ruptura seletiva da membrana celular e que a estrutura anfipática dos peptídeos possui um papel fundamental neste mecanismo (Reddy *et al*., 2004). Existem diferentes propostas de mecanismos para descrever a interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas (Brodgen, 2005; Bechinger, 1999; Valcarcel, 2001; Rinaldi, 2002; Papo e Shai, 2003). Os mecanismos propostos para peptídeos em *α*-hélice são: formação de barril, carpete, *Shai Matsuzaki Huang* (SMH), poro toroidal *e detergente*.

1.6.1. Modelo carpete

O modelo carpete (*Carpet-like*), Figura 1.10 A, descreve a saturação da superfície da membrana pelas moléculas de peptídeos. Elas são adsorvidas paralelamente na superfície da membrana, cobrindo toda sua superfície como um “carpete”, assim os peptídeos se ligam preferencialmente às cabeças dos fosfolipídios. O alinhamento ocorre de modo que a face hidrofílica esteja em contato com as cabeças fosfolipídicas ou com as moléculas de água. Em seguida ocorre a reorientação, onde as cadeias laterais são direcionadas para o interior da bicamada fosfolipídica (região hidrofóbica) da membrana, resultando em uma tensão na curvatura da membrana. O peptídeo desintegra a membrana rompendo a bicamada, através da quebra de sua curvatura (Shai, 2001 e Reddy *et al*., 2004).

1.6.2. Modelo Poro Toroidal

Este modelo é usado para peptídeos que interagem fortemente com grupos lipídicos. Ele envolve a ligação inicial do peptídeo, paralelamente a superfície da membrana de modo que a face polar do peptídeo se associe a cabeça dos grupos lipídicos (Figura 1.10 B). Após atingirem determinada concentração, se inserem perpendicularmente na camada lipídica (Brogden, 2005), formando um poro aquoso. A parede celular forma monômeros de peptídeo intercalados com lipídios da membrana biológica (Yeaman e Yount 2003).

1.6.3. Modelo *barril*

O mecanismo *barrel-stave* (Figura 1.10 C) ilustra esse modelo, mais aplicável para peptídeos citolíticos de células bacterianas e mamíferos. Neste mecanismo, peptídeos helicoidais se ligam à superfície da bicamada lipídica de acordo com sua anfipaticidade, orientando-se paralelamente com a face catiônica voltada para os grupos fosfatos, presentes na superfície da bicamada lipídica. Ocorre assim a inserção perpendicular de monômeros em *α*-hélice anfipática na membrana formando poros.

O peptídeo mantém as regiões hidrofóbicas ligadas à região apolar da membrana, enquanto as regiões hidrofílicas ficam expostas, facilitando o fluxo de íons e moléculas pequenas através da bicamada lipídica (Shai, 2002). Assim a face hidrofóbica interage com o núcleo lipídico da membrana e a face hidrofílica reveste o centro, formando um poro aquoso que aumenta conforme o acumulo dos monômeros, (Sanderson, 2005).

A formação dos poros pode ser confirmada pela aferição do aumento da condutividade (Reddy e Aranha 2004). O tamanho dos poros pode variar de acordo com a concentração de monômeros de peptídeo na membrana (Pukala *et al.*, 2006), levando ao vazamento do conteúdo celular e consequentemente a morte da célula (Shai e Oren, 2001).

1.6.4. Modelo Shai-Matsuzaki-Huang

O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH), ilustrado na Figura 1.10 D, se aplica a grande parte dos peptídeos antimicrobianos. Esse modelo é utilizado para pequenos peptídeos que não podem atravessar completamente a membrana, como no modelo de *barrel-stave* (Wang *et al.*, 2005). O peptídeo interage com a superfície da membrana, como ocorre no mecanismo de carpete*.* O poro é formado pela adesão do peptídeo a membrana que estica a bicamada, permitindo assim a passagem do peptídeo para o citoplasma celular (Nascimento *et al.* 2003). Assim o mecanismo SMH propõe que os peptídeos antimicrobianos de anfíbios podem ter múltiplos alvos nas bactérias, sendo por rompimento da bicamada lipídica ou por interação com alvos intracelulares (Zasloff, 2002 e Reddy *et al*., 2004).

1.6.5. Modelo de detergente

O modelo de detergente (*detergent-like*), Figura 1.10 E, é uma representação mais geral para a atividade de moléculas anfipáticas. Ele é baseado na intercalação de peptídeos nas bicamadas lipídicas pela interação do peptídeo com a membrana lipídica, formando um agregado micelar na própria bicamada (Wildmanr, 2003). O fator predominante neste modelo de detergente é o potencial de agregação de cada peptídeo, que varia de acordo com sua natureza como carga e caráter hidrofóbico. Neste modelo os monômeros de peptídeos se alinham à superfície da membrana de tal forma que os resíduos hidrofóbicos fiquem em contato com os grupos cabeças fosfolipídios, se reorientado para o interior da membrana hidrofóbica. Assim, ocorre a desintegração da membrana pelo rompimento da bicamada (Bechinger e Lohner, 2006).

Este modelo está de acordo com Babakhani e colaboradores (2008), que simularam um modelo de inserção de um peptídeo na membrana. A dinâmica e propriedade estrutural do peptídeo durante o processo de agregação foi analisada e um modelo termodinâmico de inserção e agregação do peptídeo hidrofóbico na membrana hospedeira foi proposto.

Observou-se que, se os peptídeos não se inserirem profundamente na camada lipídica e que o processo de agregação se torna termodinamicamente desfavorável (Babakhani *et al*., 2008).

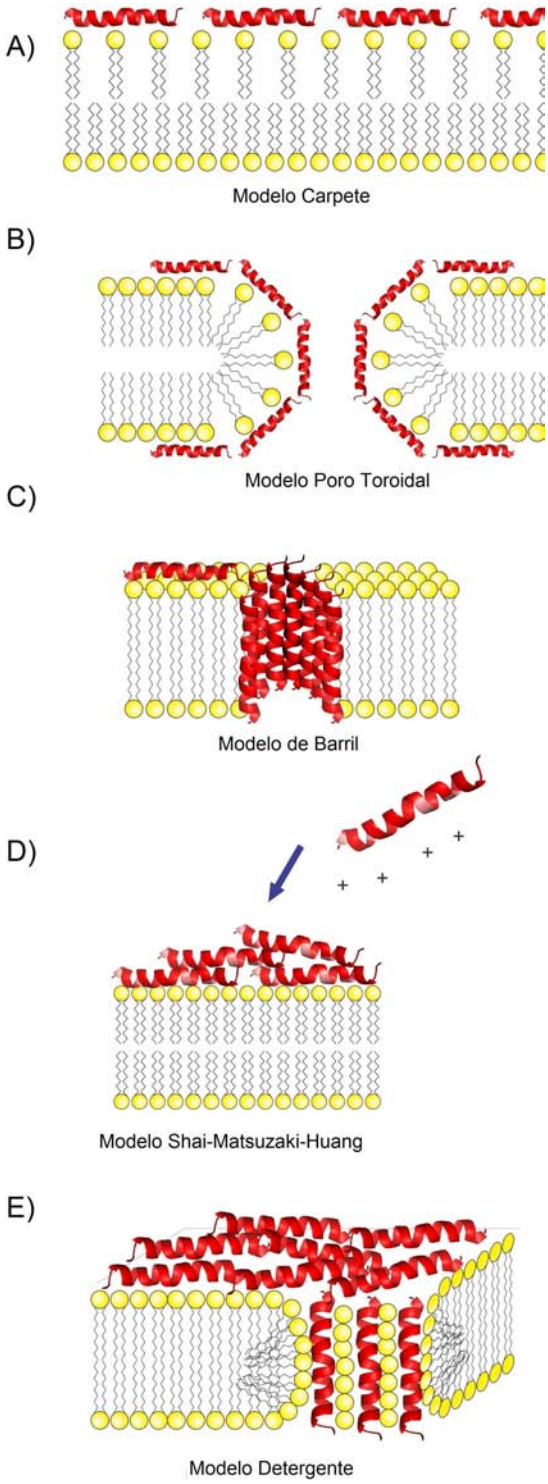


Figura 1. 10. Ilustração dos modelos descritos: a) *Carpete*, b) Poro toroidal, c) *Barril,* d) Shai-Matsuzaki-Huang e e) Detergente.

1.7. Determinação da Estrutura de Peptídeos

1.7.1. Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) é uma ferramenta de grande importância para a RMN, pois mostram mudanças estruturais de peptídeos e proteínas, essenciais para a sua função biológica. Ela facilita a obtenção das condições ideais para a realização de experimentos de RMN. O CD indica as preferências conformacionais de macromoléculas e mostra a relação de estabilidade em diferentes temperaturas, pH e meios miméticos (Sreerama, 2001).

A espectroscopia de dicroísmo circular é bastante utilizada para estudar mudanças estruturais e estabilidade de peptídeos e proteínas. Ela possibilita o estudo estrutural de moléculas em ambientes que mimetizam as condições de membrana celular (Kelly *et al.*, 2005).

A espectroscopia de CD se baseia no fato de que o plano da luz linearmente polarizada pode ser visto como um somatório de duas componentes circularmente polarizadas e de mesma magnitude, porém girando em sentidos contrários, uma em sentido horário (*Er*) e outra em sentido anti-horário (*El*) (Kelly *et al.*, 2005). Se Er e El são absorvidos igualmente, a recombinação regenera a radiação linearmente polarizada original, se portanto, ao atravessarem a mostra Er e El são absorvidos em extensões diferentes, então a luz passa a apresentar uma diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares, resultando na polarização elíptica (luz elipticamente polarizada). Sendo assim os espectrômetros de CD medem a diferença de absorbância das componentes circulares da luz polarizada linearmente ($\Delta E = EL\text{-}ER$) em função do comprimento de onda. Esta diferença é descrita em termos de elipcidade (Kelly, 2000).

A espectroscopia eletrônica de CD baseia-se no fenômeno da absorção preferencial de uma das componentes circulares da luz polarizada linearmente pelos cromóforos quirais (opticamente ativo) presentes em proteínas ou peptídeos, tais cromóforos afetam a estrutura eletrônica produzindo assim sinais característicos (Sreerama, 2001).

Os sinais de CD surgem somente quando ocorre absorção de radiação por grupos cromóforos, que no caso de peptídeos são representados em maior parte pelos grupos amida (R_1-(C=O)-NH-R_2) e em menor parte pelos grupos aromáticos (Krittanai, 1997). O padrão típico dos espectros de dicroísmo circular para cada tipo de estrutura (*α*-hélice, *β*-folha e randômica) pode ser visualizado na Figura 1.11. Cada tipo de estrutura apresenta transições e absorção características, que estão relacionadas aos ângulos ϕ e ψ de cada estrutura secundária. Dessa forma, com o uso dos princípios básicos desta técnica pode-se estimar a fração de estrutura secundária de peptídeos e proteínas.

A estrutura randômica apresenta transição n → π* em comprimento de onda de 212 nm positivos e π → π* em 195 nm negativos. A estrutura folha-*β* tem transição π → π* em 196 nm positivos e n → π* em 218 nm negativos. A estrutura *α*-hélice é caracterizada por bandas intensas com máximo de absorção da transição π → π* positivas em 192 nm, e negativas em 209 nm, além da transição n → π* em 222 nm negativos (Kelly, 2000).

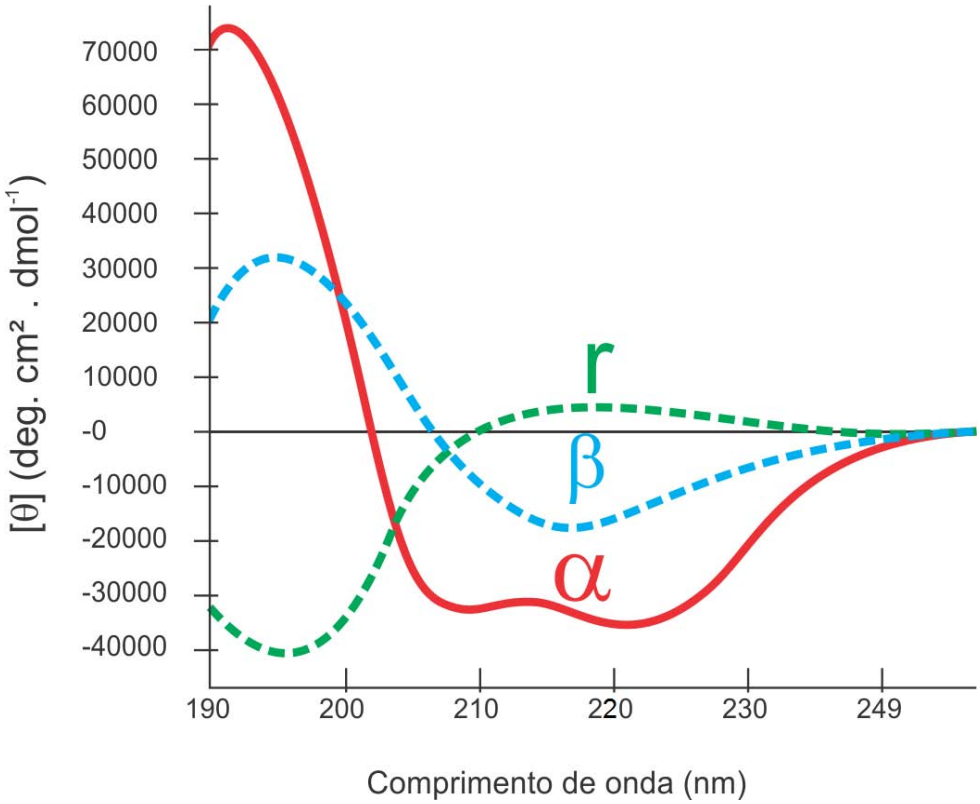


Figura 1. 11. Espectros de dicroísmo circular típicos para peptídeos estruturados. Verde: espectro característico de estrutura randômica; azul:

espectro característico de estrutura em folha-*β* e vermelho: espectro característico de *α*-hélice.

1.7.2. Técnicas existentes de determinação de estruturas terciárias

As técnicas existentes que podem ser utilizadas para propor modelos estruturais de peptídeos e proteínas são a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica e difração de raios-X de cristais (Protein Data Bank, 2011).

Microscopia eletrônica é usada para determinar as estruturas de complexos macromoleculares. Um feixe de elétrons é usado para gerar um mapa de densidade 3D. Esta técnica utiliza métodos semelhantes à difração de raios X. Para sistemas bem-comportados, a difração de elétrons produz dados em nível atômico, mas normalmente, a microscopia eletrônica não permite a visualização de cada átomo, havendo, portanto, a necessidade de se combinar esta técnica à cristalografia de raios X ou espectroscopia de RMN para resolver os detalhes em nível atômico.

A difração de raios X pode fornecer informações muito detalhadas em nível atômico. No entanto, o uso desta técnica requer a formação de monocristais, um processo considerado difícil e pode impor restrições sobre os tipos de moléculas a serem estudadas por este método. Difração de raios X é um excelente método para determinação de estruturas que formam cristais ordenados, devido à necessidade do posicionamento de várias moléculas alinhadas exatamente na mesma orientação.

A espectroscopia de RMN de alta resolução pode fornecer informação estrutural em nível atômico. Por meio da utilização desta técnica de espectroscopia é possível construir um modelo da proteína ou peptídeo mostrando a localização de cada átomo presente na molécula. Esta técnica possui a vantagem de fornecer informações estruturais em solução e também possibilita estudar as estruturas atômicas de moléculas flexíveis. Fornece informações a respeito das interações pepídeo/membrana de forma dinâmica, possibilitando descrever sua forma de interação (Veglia e Ramamoorthy, 2010).

1.7.2.1. Importância da espectroscopia de ressonância magnética nuclear na determinação estrutural em 3D.

A partir da década de 80, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tornou-se uma ferramenta indispensável para a elucidação estrutural de moléculas biológicas em solução, principalmente proteínas e peptídeos (Wüthrich, 1986; Cavanagh, 1996). Surgiram então os primeiros trabalhos de estudos de RMN para a obtenção de estruturas tridimensionais de biomacromoléculas com a determinação estrutural do hormônio polipeptídico glucagon (Braun *et al.*, 1981) e o estudo conformacional do polipeptídeo I5A, uma toxina de escorpião, em solução aquosa (Arseniev *et al.*, 1984).

Tal método tornou-se mais aceito após a determinação estrutural por RMN do tendamistato (Kline *et al.*, 1986), pois apresentava resultados similares aos obtidos por difração de raios-X, até então única técnica aceita para determinação estrutural.

A principal vantagem dos estudos de RMN é o fato de se poder analisar a conformação estrutural dos peptídeos em solução, mantendo características semelhantes às de seu estado natural. A espectroscopia de RMN pode mostrar informações sobre o comportamento dinâmico da molécula, enquanto a cristalografia de raios-X só possibilita estudos de moléculas na forma de cristais ordenados (Brünger, 1997).

Nos estudos estruturais pela espectroscopia de RMN são usados detergentes, pois são considerados boas representações da membrana celular. Os detergentes comportam-se como bicamada lipídica e representam uma classe de compostos anfipáticos, consistido de uma cabeça hidrofílica e uma calda hidrofóbica. Suas cabeças volumosas impedem a auto-associação em estruturas planares como bicamadas, promovendo somente a associação em micelas. (Bordag e Keller, 2010).

As simulações da dinâmica tridimensional de peptídeos antimicrobianos geralmente são realizadas na presença de detergentes como dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilfosfocolina (DPC), os quais são responsáveis por fornecer um ambiente mimético, sendo assim, são usados como modelo de membranas celulares. Tais sistemas atuam como modelo

de interface de membranas de bactérias e mamíferos, respectivamente (Khandelia e Kaznessis, 2006). As moléculas de SDS possuem carga líquida negativa e as moléculas de DPC possuem carga líquida nula devido serem zwitteriônicas (Khandelia, 2008).

A associação peptídica à camada lipídica geralmente está ligada ao caráter hidrofóbico, anfipático e efeitos eletrostáticos. Estas interações provocam mudanças conformacinais dos peptídeos, para formas estruturadas de maior estabilidade. Os detalhes da estrutura e dinâmica destas interações na superfície da membrana são frequentemente controlados pela interação específica de determinados resíduos de aminoácidos a diferentes partes da camada lipídica (Khandelia *et al.*, 2008).

Os atuais desenvolvimentos da espectroscopia de RMN a torna a única capaz de monitorar e discriminar processos moleculares como, por exemplo, mudanças conformacionais (Thennarasu, 2005). A investigação dos movimentos dinâmicos pode fornecer informações úteis sobre a interação peptídeo-receptor permitindo caracterizar detalhes termodinâmicos e cinéticos de interação (Chi, 2002). A estratégia de otimização da atividade química do peptídeo bioativo é baseada no estudo da relação estrutura/atividade, sendo produzidos, quando necessário, derivados sintéticos com o objetivo de aumentar sua eficácia, seletividade e especificidade (Vlieghe *et al.*, 2010).

O conhecimento da estrutura de peptídeos e proteínas é uma maneira de se atuar no desenvolvimento de novos fármacos. A compreensão do mecanismo de ação se faz importante na compreensão da sua função, muito útil no desenvolvimento de peptídeos mais potentes para aplicações farmacêuticas. Neste contexto, a espectroscopia de RMN permite a determinação da estrutura terciária de peptídeos, fornecendo informações em nível atômico, por exemplo, da forma de interação com o alvo, bem como acerca do comportamento cinético, por exemplo, da troca hidrogênio/deutério (Chi, *et al.*, 2002).

Os resíduos de aminoácidos presentes na cadeia peptídica são ricos em hidrogênio, que os torna excelentes alvos para estudos por RMN em solução. Cada resíduo de aminoácido constitui um sistema de *spins* com

composições químicas e estruturais diferentes, de tal modo que os deslocamentos químicos de hidrogênio aparecem agrupados em regiões distintas num espectro de RMN. Uma vez que o acoplamento escalar possibilita alcançar átomos distantes até três ligações químicas, os experimentos de ***TO****tal* ***C****orrelation* ***S****pectroscop****Y*** – TOCSY e ***CO****rrelation* ***S****pectroscop****Y*** – COSY ajudam a identificar o deslocamento químico de ^{1}H de cada resíduo de aminoácidos. Estes experimentos mostram correlações *spin-spin* que são usadas para identificação de padrões de sistema de *spins,* correlacionando núcleos diferentes via acoplamento a três ligações (^{3}J) (Wider e Wüthrich, 1999). Experimentos de TOCSY ^{1}H ajudam a identificar os sinais de NOE (Efeito Nuclear Overhauser) corresponde a cada resíduo de aminoácido. O processo de análise de TOCSY é auxiliado pelo conhecimento prévio da sequência dos resíduos de aminoácidos da cadeia principal do peptídeo.

1.7.2.2. Efeito Nuclear Overhauser

Experimentos de NOESY são dependentes do Efeito Nuclear Overhauser – NOE (***NOE S****pectroscop****Y***). Tal técnica depende do acoplamento dipolar de spins de núcleos espacialmente próximos e possibilita investigar a distância entre os respectivos átomos. O NOE é o resultado de processos de relaxação, onde o campo local experimentado por um *spin* interage dipolarmente com campos magnéticos vizinhos. Essa interação resulta da transferência de polarização entre núcleos acoplados dipolarmente (próximos espacialmente) via trilhas de relaxação *spin*-rede. Sendo assim, experimentos com NOE fornecem informações relevantes sobre movimentos nucleares e distâncias intermoleculares (Claridge, 2009).

As correlações através do espaço constituem a informação geométrica fundamental para se determinar a estrutura de um peptídeo (Wider e Wüthrich, 1999). A determinação da estrutura de peptídeos é baseada em uma rede densa de limites de distâncias, derivados de NOEs, entre átomos de hidrogênio espacialmente próximos na molécula (Wüthrich, 1986). Portanto, o efeito NOE juntamente com o acoplamento escalar é muito importante para determinação estrutural de peptídeos.

As estruturas em *α*-hélice geralmente fornecem informações até quatro ligações espacialmente próximas, isso devido a sua característica estrutural espiralada. A presença de ligações de hidrogênio Inter-residuais (i-i+3) e (i+4) é importante para a confirmação da presença ou não de *α*-hélice. Desta maneira, o experimento de NOESY ^{1}H-^{1}H permite identificar os resíduos de aminoácidos próximos espacialmente em uma estrutura peptídica.

Os sinais de NOE aparecem através de distâncias entre átomos de hidrogênio A e B localizados na posição i e j, respectivamente. Essas distâncias são definidas na direção do N-terminal para o C-terminal da cadeia polipeptídica e recebem a notação (i, i+1) correspondente a determinado hidrogênio de um aminoácido se correlacionando com o aminoácido seguinte a ele na cadeia peptídica, (i, i+2) correspondente a determinado aminoácido se correlacionando com um aminoácido duas posições à frente dele na cadeia peptídica e assim por diante. A Figura 1.12 mostra as possíveis correlações típicas de um peptídeo em estrutura helicoidal, tanto entrarresiduais quanto inter-residuais, espacialmente próximos.

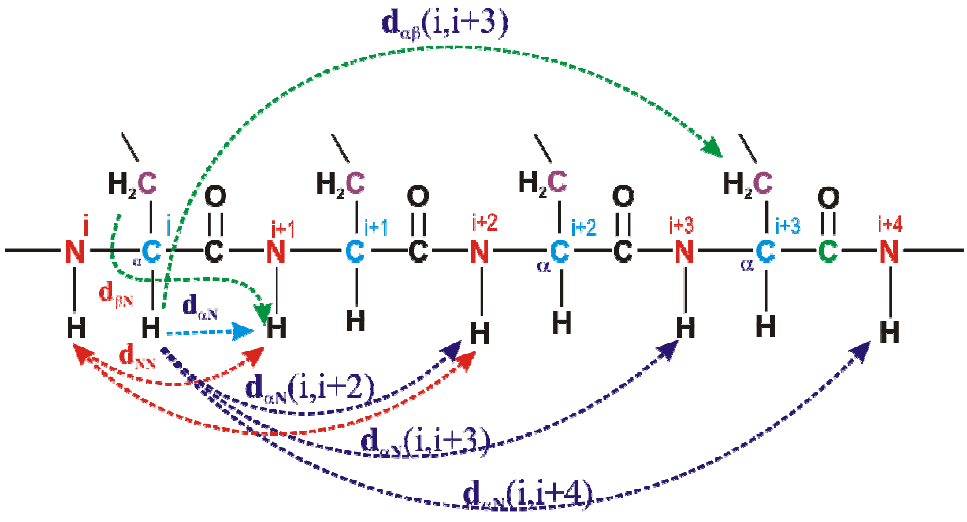


Figura 1. 12. Representação de NOEs típicos de uma estrutura secundária em *α*-hélice.

A Figura 1.13 apresenta um modelo de estrutura terciária enfatizando as ligações de H que contribuem para direcionar o enovelamento em uma estrutura helicoidal.

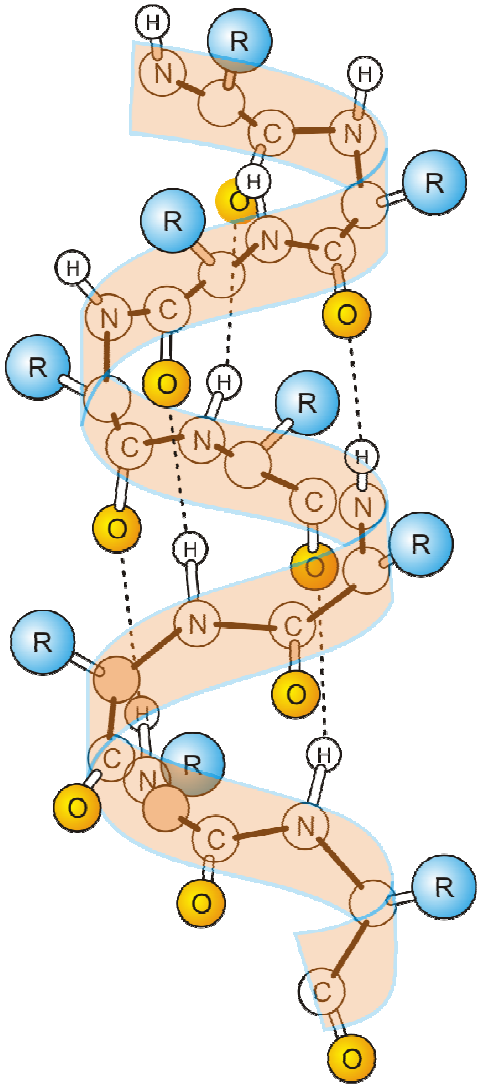


Figura 1. 13. Representação tridimensional de uma estrutura secundária em *α*-hélice.

1.7.2.3. Cálculo estrutural

Os resultados obtidos nos experimentos de RMN não podem ser usados diretamente na determinação estrutural dos peptídeos. Os dados necessitam serem convertidos em restrições geométricas conformacionais e somente depois, usados para os cálculos das estruturas (Wüthrich, 1986; Cavanagh *et al.*, 2006). Para tanto, foi desenvolvido por Wüthrich (1986) uma metodologia de atribuição sequencial, que combinou mapas de contornos bidimensionais, a fim de montar mapas de conectividades, através

do conjunto de restrições de distâncias Interatômicas, obtidas a partir do volume dos sinais de NOE. Essas distâncias obtidas são então utilizadas no cálculo da estrutura (Cavanagh, 1996).

Para os cálculos estruturais são usados restrições de distâncias, ângulos diedros e às vezes orientacionais. As restrições de distância são obtidas através do mapa de contornos NOESY. A intensidade ou volume (V) do sinal de NOE é dependente do valor médio do inverso da distância à sexta potência (r_{ij}) entre dois núcleos *i* e *j* que interagem entre si, multiplicado por um fator *f* (τ_c), relativo a efeitos globais e movimentos internos da molécula, conforme apresentado na Equação 1.1 (WÜTHRICH, 2003).

$$V = (r_{ij}^{-6})\ f\ (\tau_c) \qquad \textbf{Equação1. 1}$$

As restrições de ângulos diedros ψ e ϕ (Figura 1.5) e as distâncias Interatômicas possuem seus valores restritos. Os parâmetros já determinados empiricamente, provenientes de experimentos de difração de Raios-X, e valores de constante de acoplamento escalar do tipo ^3J, podem ser convertidos em valores angulares por meio da relação de Karplus (1959), descrita na equação 1.2 (Griesinger *et al.*, 1985).

$$^3J(\theta) = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C \qquad \textbf{Equação1. 2}$$

Onde θ descreve o ângulo diedro entre os quatro átomos envolvidos com os valores das constantes A, B e C dependentes dos *spins* e da eletronegatividade dos átomos acoplados.

O conjunto de restrições obtidas do mapa de contornos de NOESY, juntamente com informações de geometria, como comprimento e ângulo de ligações, raios de Van Der Waals e quiralidade são interpretados por um algoritmo de arrefecimento simulado, conhecido como *simulated annealing* (SA). Essa técnica é a mais difundida no cálculo de estruturas a partir de dados de RMN (Güntert, 1998).

O SA é um procedimento de minimização de energia por dinâmica molecular (Verlet, 1967), baseado num aquecimento rápido do sistema,

garantindo que os átomos superem locais de energia e, posteriormente, resfriamento lento e controlado (Brunger *et al.*, 1990). Esta metodologia foi abordada pela primeira vez em refinamento cristalográfico por Brünger e colaboradores (1987). No entanto, para a obtenção das estruturas, essa variação de temperatura é apenas simulada teoricamente, mostrando-se bastante eficiente (Nilges *et al.*, 1988). A molécula é tratada como um conjunto de corpos rígidos com ligações fixas, permitindo somente o movimento rotacional. As funções de energias potencial e cinética definidas são utilizadas a fim de reduzir o número de variáveis no espaço cartesiano (Güntert *et al.*, 1991).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivos gerais

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo realizar estudos estruturais de dois peptídeos antimicrobianos sintéticos, ocellatina-P1G16 e hilina a1, por meio da espectroscopia de RMN de ^{1}H.

Devido à carência nacional de profissionais especializados na determinação estrutural de peptídeos e proteínas, utilizando a espectroscopia de RMN, objetiva-se ainda a formação de recursos humanos, contribuindo assim para consolidação dessa linha de pesquisa no IQ/UFG.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as modificações conformacionais dos peptídeos frente ao aumento de temperatura por meio da espectroscopia de CD em presença de micelas de SDS- d_{25}.

- Determinar a conformação estrutural dos peptídeos ocellatina-P1G16 e hilina a1 na presença de micelas de SDS- d_{25}, por meio das técnicas de RMN de ^{1}H.

- Compreender o mecanismo molecular de interação dos peptídeos ocellatina-P1G16 e hilina a1 com a membrana bacteriana, por meio de estudos de localização dos peptídeos na superfície de micelas que mimetizam o meio membranar.

- Identificar a importância de cada resíduo de aminoácido na interação peptídeo/alvo.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo relata a caracterização estrutural dos peptídeos ocellatin-P1G16 e hilina a1, cujas estruturas primárias estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1. Sequência primária dos peptídeos de estudo.

Ocellatina-P1G16	GLLDTLKGAAKNVVGGLASKVMEKL-25
Hilina a1	IFGAILPLALGALKNLIK-18

Ambos os peptídeos apresentam a região C-terminal amidada. Amostras sintéticas dos petídeos ocellatina-P1G16 e hilina a1 foram gentilmente cedidas pela Profª. Drª. Mariana de Souza Castro do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

3.1. Dicroísmo Circular (CD)

As análises conformacionais de CD foram realizadas a partir das soluções estoques dos peptídeos ocellatina-P1G16 e hilina a1, à concentração de 1 mM, na presença de 100 mM de SDS. Estas soluções foram diluídas em água deionizada, o primeiro peptídeo para 42,3 µM e o segundo para 39,7 µM .

Os experimentos de CD no UV-distante foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), em um espectropolarímetro Jasco J-815, utilizando celas de 1,00 mm, variando a temperatura 25°C a 95°C, com incrementos de 10°C. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, com velocidade de varredura de 50 $nm.min^{-1}$, tempo de resposta de 8 s e resolução de 0,05 nm. Obtiveram-se espectros finais pela acumulação de 4 varreduras e realizou-se posteriormente a subtração do branco de cada peptídeo.

Com o auxílio da equação 3.1, tratou-se os resultados obtidos a fim da elipticidade observada, θ (miligraus), ser convertida em elipticidade molar média, [θ] (graus cm^2/mol), pela relação:

$$[\theta] = \theta / 10.l.c.n \qquad \textbf{Equação 3. 1}$$

Onde θ é a elipticidade observada, l é o caminho óptico em centímetros, c é a concentração do peptídeo em molar e n número de resíduos do peptídeo (modificado de Sharon, 2005). A concentração de cada peptídeo foi encontrada calculando-se as diluições (Murphy e Kies, M.W. 1960):

A porcentagem de *α*-hélice (f_H) presente nos peptídeos hilina a1 e ocellatina-P1G16 foram encontradas através da equação 3.2.

$$[\theta]_{222}^{obs} = (f_H - ik/n).[\theta]_{\infty} \qquad \textbf{Equação 3. 2}$$

Onde $[\theta]_{222}^{obs}$ é a elipticidade observada no comprimento de onda de 222 nm, *i* número de segmentos helicoidais (considerado 1 para esses peptídeos), *k* constante dependente do comprimento de onda (2,57), *n* número total de resíduos e $[\theta]_{\infty}$ elipticidade residual máxima para uma hélice de tamanho infinito (-39500 deg.cm^2.dmol^{-1}) (Chen, 1974).

3.2. Experimentos de RMN de ^{1}H

Os experimentos foram realizados nas instalações do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ/UFG). Todos os experimentos foram adquiridos em um espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE lll 500 (11,75 T), utilizando sonda TBI (*Triple Broad Band Inverse detection*), Figura 3.1, operando à frequência de 500,13 MHz, para o núcleo de ^{1}H.

Para as análises de RMN, as amostras foram preparadas pela dissolução do peptídeo sintético a uma concentração final de 1 mM e 100 mM de SDS-d_{25} em 500μL de solução H_2O/D_2O (9:1), contendo TMSP-d_4 (propianato de trimetilsilil tetradeuterado), usado como referência interna.

Os experimentos realizados para o peptídeo ocellatina-P1G16 foram realizados a 36℃ a fim de aumentar a resolução e pH 4,3. Já para o peptídeo hilina a1 foram realizados a 25℃ e pH 7,0 em tampão PBS.

Figura 3. 1. Espectrômetro BRUKER AVANCE lll 500.

Inicialmente coletaram-se experimentos de hidrogênio em 1D, a fim de ajustar alguns parâmetros que seriam utilizados nos experimentos em 2D, como por exemplo, O_1 e p_1.

Foram utilizados pulsos de radiofrequência curtos e de alta potência (*hard pulse*), que não são seletivos e longos de baixa potência (*soft pulse*), que são seletivos e irradiam em uma região específica do espectro. Nos experimentos em questão, foram utilizadas soluções contendo 90% de H_2O e 10% de D_2O, sendo então necessária a supressão do sinal da água (solvente), utilizando-se para isso um pulso de baixa potência. Assim, o sinal da água, para todos os experimentos do trabalho, foi suprimido usando a sequência zgcppr (*Composite Pulse Presaturation Sequence*), otimizada por O_1 para se obter uma melhor supressão.

Foram adquiridos experimentos de RMN de ^1H bidimensionais homonucleares de: *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* (NOESY) *e Correlation Spectroscopy* (COSY).

Os valores da frequência de transmissão (O_1); pulso de radiofrequência de 90º (p_1); janela espectral (SW), correspondente à faixa de

frequências observadas para um determinado núcleo; o número de experimentos acumulados (NS); o número de pontos no domínio do tempo (TD); o tamanho dos dados (SI) e a potência de pré-saturação (Pl_9), para cada um dos experimentos estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3. 2. Parâmetros utilizados para cada experimento e peptídeo.

Parâmetros	TOSCY	NOESY	COSY
Ocellatina-P1G16			
SW (Hz)	5530,97	5530,97	8012.820
NS	56	88	176
O_1 (Hz)	2350.74	2352.05	2349.32
p_1 (µsec)	8,66	9,30	8,95
TD	F_2 = 4096; F_1 = 256	F_2 = 4096; F_1 = 512	F_2 = 4096; F_1 = 256
SI	4096	1024	1024
Pl_9 (dB)	52	52	52
Tempo de mistura (ms)	60	200	-
Hilina a1			
SW (Hz)	8012,82	8012,82	8012,82
NS	184	104	256
O_1 (Hz)	2350,38	2350,38	2350,38
p_1 (µsec)	8,95	8,95	8,95
TD	F_2 = 4096; F_1 = 256	F_2 = 4096; F_1 = 512	F_2 = 4096; F_1 = 256
SI	4096	1024	1024
Pl_9 (dB)	56	56	56
Tempo de mistura (ms)	60	200	-

O pulso de 90° (p_1) no experimento de RMN foi calibrado da seguinte forma: o valor de p_1 calculado pelo equipamento através do comando pulsecal foi multiplicado por 2, a fim de se aplicar um pulso de 180° e não mais de 90°. Ao aplicar o pulso de 180° ocorre a inversão da população de

spins que se direciona para o eixo –z. Alguns sinais de pouca intensidade foram observados, indicativo de que o pulso não estava calibrado, pois como o detector se localiza em y não deveria ser detectado nenhum sinal dos *spins* em –z, sendo assim variou-se o p_1 de forma que o experimento não apresentasse nenhum sinal e então o valor de p_1 foi dividido por 2. Dessa forma, pode-se garantir que quando aplicado um pulso de 90° todos os prótons fossem detectados em máxima intensidade.

3.3. Processamento dos dados

O programa NMRPipe (Delaglio, 1995) foi utilizado para processar os dados. Inicialmente ajustou-se a fase, a linha de base, e aplicaram-se as funções matemáticas LB e GB. A função principal do LB (*line-broadening*) é o ganho de sensibilidade, pois o FID é multiplicado exponencialmente, melhorando a relação sinal/ruído. A função principal do GB (*Lorentz-Gauss*) é o ganho de resolução. O LB foi otimizado a 0.5 Hz para a primeira dimensão (F2) e GB 5.0 Hz para a segunda dimensão (F1) para ambos os peptídeos. A correção de fase dos experimentos foi realizada nas duas dimensões, de forma a aumentar a relação sinal/ruído.

Utilizou-se o programa NMRView (Johnson e Blevins, 1994) para visualizar e interpretar os mapas de contornos. Todos os programas utilizados no trabalho foram executados em sistema operacional Linux.

3.4. Determinação estrutural dos peptídeos

O anexo A mostra os deslocamentos químicos, descritos na literatura e já Tabelados, para os 20 aminoácidos mais comuns. Com o auxílio desses valores foi possível analisar os experimentos de TOCSY e COSY e encontrar os deslocamentos químicos dos hidrogênios das cadeias principal e lateral dos peptídeos em estudo.

Os procedimentos para a determinação de estruturas dos peptídeos, utilizando a espectroscopia de RMN, foram baseados no método descrito por Wüthrich *et at*. (1986). As análises realizadas só foram possíveis com o conhecimento prévio da estrutura primária do peptídeo.

A seguir será descrito o procedimento para a determinação da estrutura tridimensional. A metodologia descrita abaixo se aplica para o peptídeo ocellatina-P1G16 e hilina a1.

3.4.1. Identificação dos sistemas de *spins* para o peptídeo hilina a1

Os sistemas de *spins* foram identificados individualmente através das correlações resultantes dos acoplamentos escalares, observados nos experimentos bidimensionais de TOCSY ^{1}H-^{1}H e COSY ^{1}H-^{1}H.

3.4.1.1. Análises de TOCSY ^{1}H-^{1}H

Adquiriram-se experimentos de TOCSY para detectar o acoplamento entre núcleos pertencentes a um mesmo sistema de *spins* (Figura 3.2).

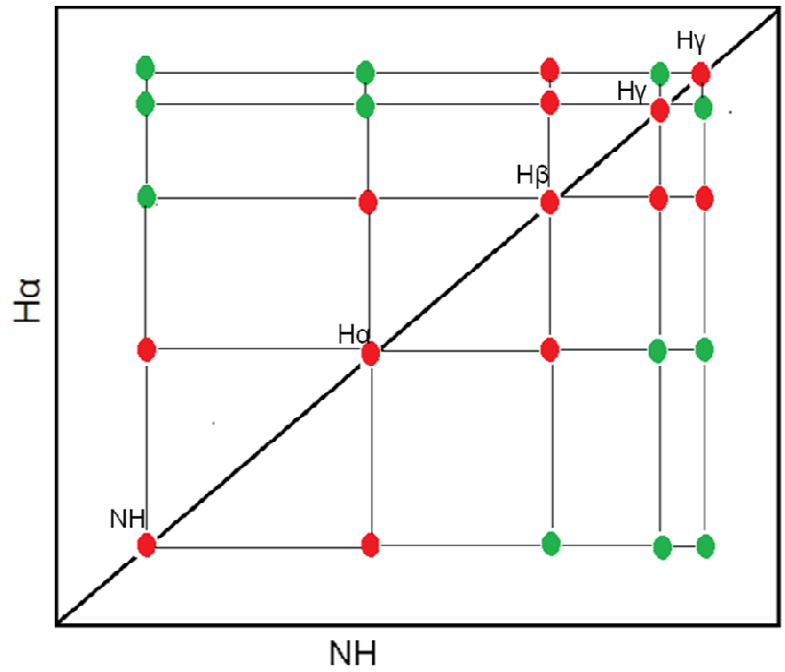


Figura 3. 2. Esquema representativo dos sinais cruzados esperados para um espectro de TOCSY.

Iniciou-se a análise do mapa de contornos de TOCSY, selecionando-se a região de impressão digital compreendida entre δ 7,0-8,6 em F2 e δ 2,7-4,3 em F1, respectivamente referentes aos hidrogênios H_N e H_α. Em seguida analisou-se a região de cadeias laterais H_N-H_α, H_N-H_β, H_N-H_γ, H_N-H_δ e H_N-H_ε compreendidos entre δ 7-8,6 em F2 e δ 0,8-2,2 em F1. A parte inferior da

diagonal, que também compreende a região de cadeia lateral *δ* 0,8-4,0 em F2 e *δ* 2,7-4,3 em F1 foi analisada.

A análise realizada no mapa de contornos de TOCSY possibilitou a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios presentes na cadeia principal de cada resíduo de aminoácido.

3.4.1.2. Análise de COSY ^{1}H-^{1}H

Para complementar as informações obtidas no TOCSY realizou-se o experimento de COSY, que também detectou acoplamentos escalares entre *spins* (Figura 3.3), mas diferentemente do TOCSY, o COSY detecta no máximo até 3 ligações químicas (^{3}J). Dessa forma, foram obtidas informações de deslocamentos químicos dos hidrogênios da cadeia lateral de cada resíduo de aminoácido, conforme assinalamento dado por Wüthrich (1986).

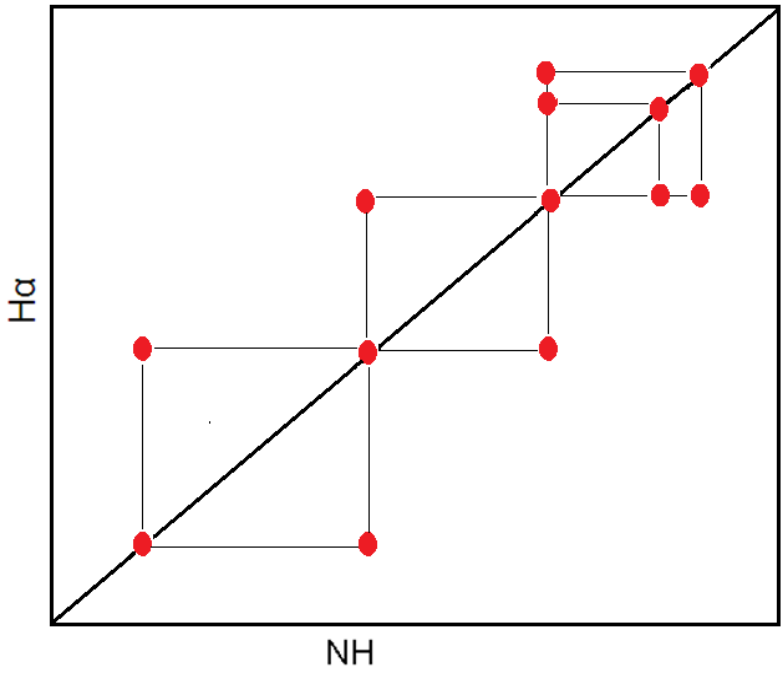


Figura 3. 3. Esquema representativo dos sinais cruzados esperados para um espectro de COSY.

A Figura 3.4 exemplifica como é feita a análise de cadeia lateral, para um determinado resíduo, no caso isoleucina. Observa-se H*α* em 3,94, H*β* em 1,95, H*γ* em 0,93 e H*δ* em 0,86. Esse raciocínio segue para todos os aminoácidos. Dessa forma, o experimento de COSY forneceu os

deslocamentos químicos dos hidrogênios das cadeias laterais, de cada um dos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo. Estes valores encontrados são inseridos em uma Tabela de deslocamentos que direcionará o programa NMRView (Johnson e Blevins, 1994) nas atribuições de NOE, indicando as possíveis correlações, afim de que o analista as verifique e assinale a atribuição correta.

Como cada resíduo de aminoácido possui deslocamentos químicos de hidrogênio específicos (anexo A), os sinais do mapa de contornos foram atribuídos com base nas correlações entre a região de impressão digital e cadeias laterais. No entanto, estes sinais atribuídos foram apenas propostos, sendo confirmados na análise do experimento de NOESY.

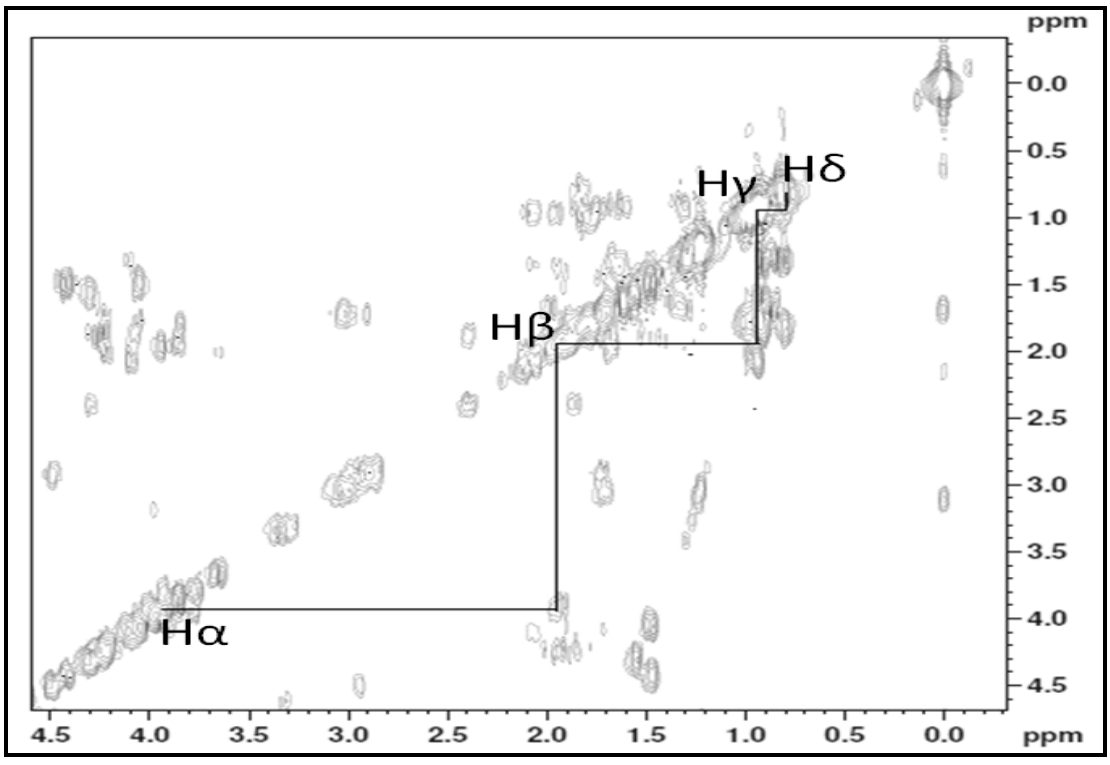


Figura 3. 4. Mapa de contornos de COSY. Ampliação da região de cadeia lateral**.** As correlações destacadas correspondem ao resíduo de aminoácido isoleucina.

3.4.1.3. Assinalamento dos sinais de NOE para o peptídeo hilina a1

Adquiriu-se experimento de NOESY para se observar os acoplamentos dipolares entre os *spins* através do espaço. Enumerou-se todo o mapa de contornos aleatoriamente e então se iniciou a observação

das conexões inter-resíduos dos sinais presentes na região de impressão digital H_N-H_α. A Figura 3.5 ilustra a sobreposição de dois mapas de contornos, sendo que em vermelho estão representados os sinais de TOCSY e em azul os de NOESY. A análise concomitantemente dos dois mapas fornecem informações relevantes de acoplamentos. No exemplo desta figura o resíduo 9 está acoplando com o resíduo 10, 11, 12 e 13 para frente (sinais azuis na horizontal) e com os resíduos 6, 7, e 8 para traz (sinais azuis na vertical).

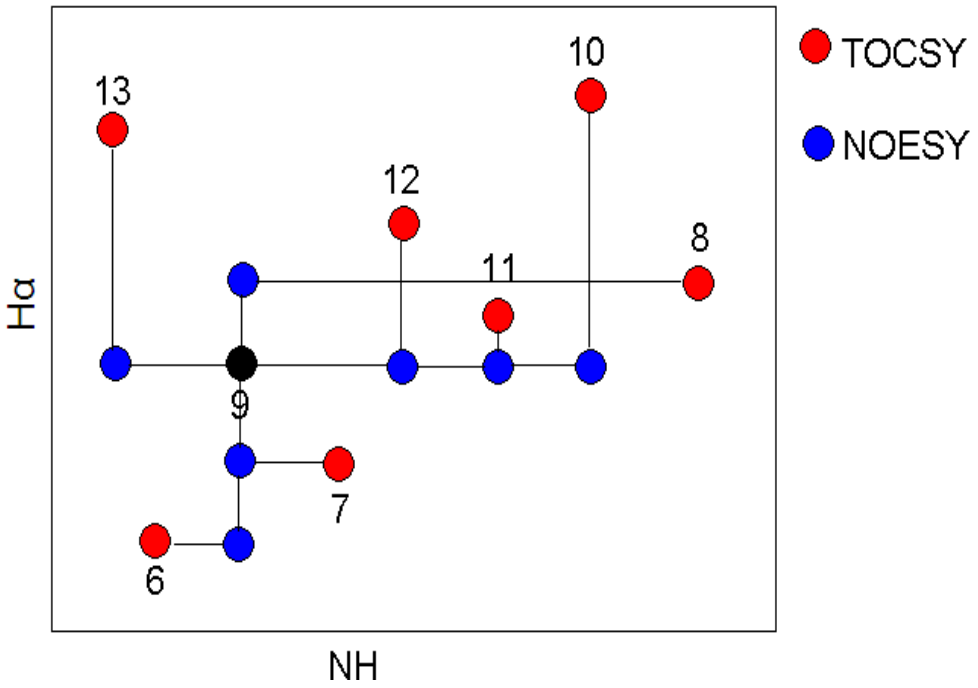


Figura 3. 5. Hilina a1 – Ampliação da região de impressão digital do mapa de contornos de TOCSY e NOESY.

Os sinais de NOESY foram atribuídos sempre pela sua análise concomitante ao TOCSY. Assim atribuíram-se os deslocamentos químicos referentes à estrutura primária e secundaria do peptídeo. Acoplamentos (i,i), (i,i+1), (i,i+2), (i,i+3) e (i,i+4) forneceram informações relevantes para a formação da estrutura terciária.

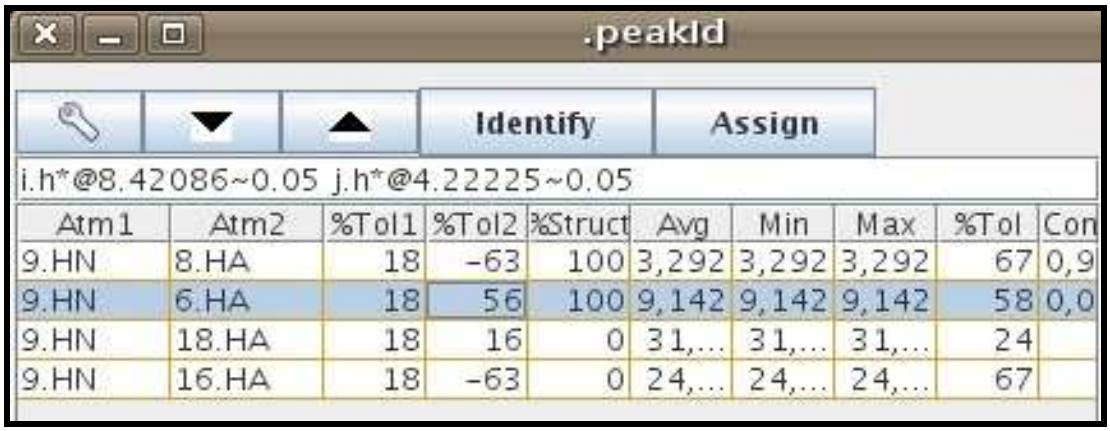
No programa nmrVIEW (Johnson e Blevins, 1994) o painel de NOE possibilitou calibrar as distâncias obtidas por meio do volume dos sinais do mapa de contornos de NOESY. Realizou-se a calibração usando a distância de 1,8 Å para os prótons β-geminais. Os volumes dos NOEs foram

classificados como forte, médio ou fraco, correspondendo a um limite máximo de distância interprotônica de 2,8, 3,4 e 5,0 Å, respectivamente. Cada pico assinalado no mapa de contornos de NOESY é analisado pelo programa que fornece as possíveis correlações automaticamente. Cabe então ao analista avaliar as sugestões e assinalar a opção correta.

A Figura 3.6 mostra como é realizada as sugestões de restrições pelo programa. Neste exemplo as correlações foram avaliadas pelo analista e a correlação correta assinalada. Tal assinalamento significa que o hidrogênio ligado ao nitrogênio na posição 9 (9 HN) está correlacionando com o hidrogênio alfa do resíduo de aminoácido anterior (6 HA) na posição 6.

A cada pico assinalado e atribuído são fornecidas restrições que determinam a que distância de um hidrogênio i em relação a outro j. Essas restrições são adicionadas a uma lista chamada de lista de restrições.

O assinalamento sequencial da estrutura primária ordenou os sistemas de *spin* na sequência correta, com o uso das conexões sequenciais. Após a identificação da região de impressão digital seguiu-se para o restante do Mapa de contornos, utilizando sempre o mapa de contornos de TOCSY concomitante ao NOESY.



Atm1	Atm2	%Tol1	%Tol2	%Struct	Avg	Min	Max	%Tol	Con
9.HN	8.HA	18	-63	100	3,292	3,292	3,292	67	0,9
9.HN	6.HA	18	56	100	9,142	9,142	9,142	58	0,0
9.HN	18.HA	18	16	0	31,...	31,...	31,...	24	
9.HN	16.HA	18	-63	0	24,...	24,...	24,...	67	

Figura 3. 6. Possíveis correlações propostas para determinado sinal de NOESY.

3.4.1.4 Cálculo estrutural

Os cálculos de modelagem foram realizados com o programa XPLOR-NIH (Schwieters *et al.*, 2006) versão 2.28. O algoritmo base desta aplicação

é o método de minimização *simulated annealing* (*S.A.*) (Schwieters *et al.*, 2003), partindo de uma estrutura gerada randomicamente e amidada no C-terminal para ambos os peptídeos. As simulações no S.A. exploram o espaço conformacional, baseado na variação randômica dos ângulos de torção entre a cadeia de aminoácidos. A variação desses ângulos é obtida pelo aumento da temperatura em um *simulated annealing* que inclui as restrições de distância obtidas a partir dos NOEs.

Seguiram-se então diversas etapas de refinamento. Na etapa inicial, 50 estruturas foram geradas e 10 estruturas de menor energia foram analisadas, porém percebeu-se a presença de erros nas atribuições, optando assim pela retirada de todas as atribuições anteriormente adicionadas inserindo uma por vez, e verificando os gráficos de ramachandran frequentemente. A cada etapa eram adicionadas e verificadas as ocorrências de violações referentes aos dados de distâncias inseridos. Na ocorrência de violações de distância a restrição adicionada era reavaliada. Nas etapas finais do refinamento um total de 200 estruturas era gerado e as 20 conformações de menor energia eram analisadas. As estruturas formadas eram visualizadas através do programa Pymol (DeLano, 2002).

Finalmente após a adição de um número suficiente de restrições e a ausência de violações, as 20 conformações com menor energia foram consideradas para análise.

A qualidade da família de estruturas foi analisada após o cálculo da média dos desvios médios quadrados (*Root of Mean Square Deviations* - RMSD). O valor de RMSD é fornecido pelo programa Pymol pela sobreposição das 19 estruturas de menor energia com a primeira estrutura de menor energia. A análise de qualidade da família de estruturas também foi possível pelo gráfico de Ramachandran, obtido por meio do programa PROCHECK-NMR (Laskowski, 1996), que considera os ângulos ϕ e ψ, classificando-os em quatro regiões: mais favorecida, permitida, menos permitida e proibida.

3.5. Localização dos peptídeos na micela

Utilizou-se o experimento de troca hidrogênio-deutério (troca H/D) para determinar a orientação dos peptídeos na micela de SDS-d_{25}. Para a realização dessas análises foram liofilizadas as soluções previamente preparadas de ambos os peptídeos a uma concentração de 1 mM da amostra e 100 mM de SDS-d_{25}.

A amostra liofilizada do peptídeo ocellatina-P1G16 foi ressuspendida em solução H_2O/D_2O (5:5, v/v) em um volume final de 500µL, utilizando TMSP-d_4 como padrão de referência. Adquiriram-se experimentos de TOCSY a cada 2 horas, na temperatura de 36°C.

Para o peptídeo hilina a1, a amostra liofilizada foi resuspendida em solução H_2O/D_2O (1:9, v/v) alcançando o volume final de 500µL, utilizando TMSP-d_4 como padrão de referência. Os experimentos de TOCSY foram adquiridos a cada 1 hora, a 25°C. A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros de aquisição utilizados na obtenção dos experimentos de troca H/D para o peptídeo ocellatina-P1G16 e hilina a1.

Tabela 3. 3. Parâmetros utilizados nos experimentos de TOCSY troca H/D, relativo a cada peptídeo.

	Ocellatina-P1G16	Hilina a1
SI	1024	1024
TD (F_1)	128	128
TD (F_2)	1024	1024
Pl_9 (dB)	56	56
Tempo de mistura (ms)	60	60
SW(Hz)	8012,820	8012,820
NS	48	24
p1	6,5	8,5

Os dados foram processados utilizando-se o *programa* nmrPIPE (Delaglio *et al.*, 1995), usando LB de 0,5 e GB de 5 para todos os experimentos de troca H/D. Os mapas de contornos foram visualizados por meio do programa nmrVIEW (Johnson e Blevins, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Investigação estrutural do peptídeo ocellatina-P1G16

4.1.1. Análise de dicroísmo circular (CD)

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar as estruturas secundárias dos peptídeos, permitindo assim a confirmação da presença de estruturas em *α*-hélice. A técnica também possibilitou verificar a dependência da estruturação com a variação de temperatura.

A presença de valores positivos $\lambda_{máx}$ próximos a 190 nm e mínimos intensos em λ_{max} 208 e 222 nm (Krittanai,1997), indicaram que o peptídeo ocellatina-P1G16 apresenta estruturação em *α*- hélice na presença de micelas de SDS-d_{25} (Figura 4.1).

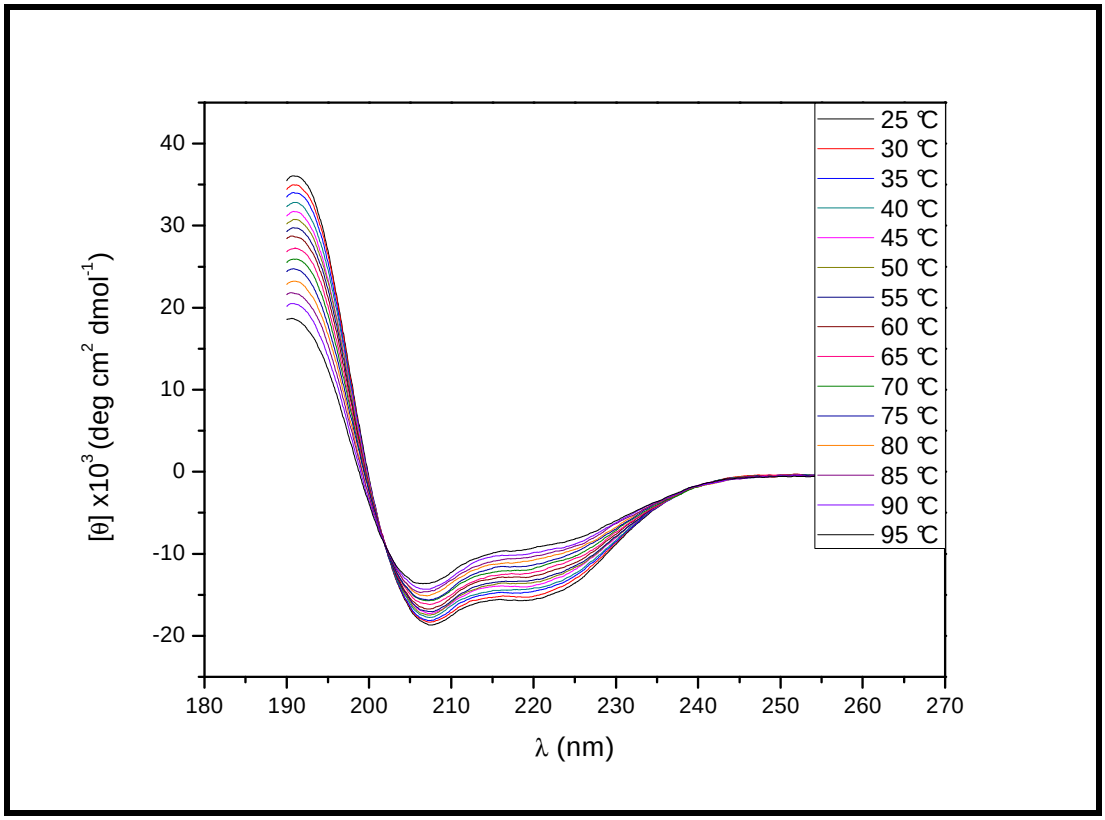


Figura 4. 1. Espectros de CD de 42,3 µM do peptídeo ocellatina-P1G16 em SDS e H_2O, sendo $[\theta]_{222nn}$ em função de λ (nm).

Estudos com variação de temperatura (25 a 95 ºC) foram utilizados para se obter informações a respeito da estabilidade dos peptídeos. Observou-se que com o aumento da temperatura, os mínimos em λ_{max} 208 e 222 nm, ficaram menos intensos indicando a diminuição da estruturação em

α-hélice (Figura 4.1). À temperatura de 25 ºC os peptídeos apresentaram o máximo de conformação equivalente a 48%.

A Figura 4.2 mostra dois espectros de CD a 25 ºC. Em preto, o espectro de CD do peptídeo antes de ser submetido ao aumento de temperatura e em vermelho após elevar a temperatura no CD a 95 ºC e resfriá-lo novamente a 25 ºC. Observa-se que a elevação da temperatura não causou modificações físicas em sua conformação tridimensional após sua renaturação, indicando assim uma estabilidade conformacional.

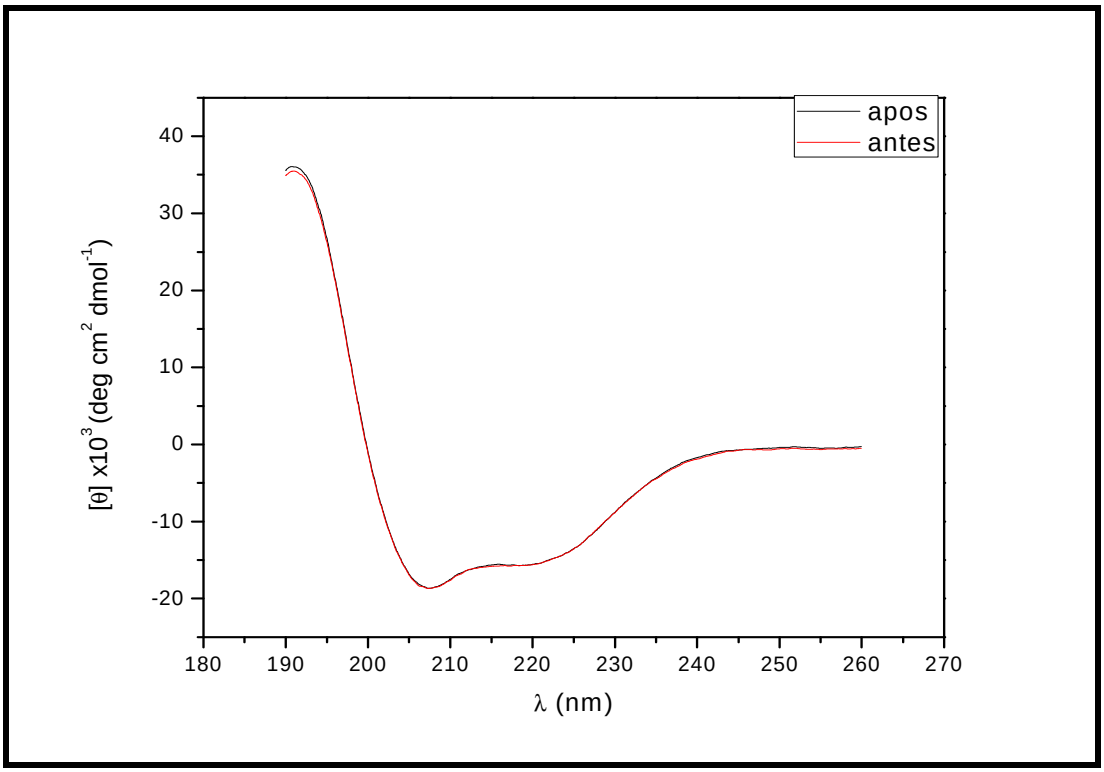


Figura 4. 2. Espectros de CD da ocellatina-P1G16 em SDS à temperatura de 25 ºC, antes e após submetê-la ao aumento de temperatura.

4.1.2. Atribuição dos sinais dos hidrogênios da ocellatina-P1G16, através dos experimentos bidimensionais.

Através do experimento de TOCSY foram atribuídos os deslocamentos químicos de hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema de *spins*, para cada aminoácido presente no peptídeo, conforme descrito no tópico 3.4.1.1 (pág. 37). O hidrogênio da ligação N-H, do resíduo glicina na posição 1, não pôde ser observado uma vez que este próton é mais lábil que os prótons seguintes na cadeia principal, por estar na extremidade da cadeia

peptídica. Dessa forma, seu contato com o solvente é maior sendo rapidamente trocado com o próton do solvente.

Conforme descrito no tópico 3.4.1.2 (pág. 38), por meio do experimento de COSY, são observados os acoplamentos *spin-spin* de prótons ligados em carbonos vicinais e geminais. Dessa forma, foram atribuídos os deslocamentos químicos dos hidrogênios das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Para o peptídeo ocellatina-P1G16 foram observados no mapa de contornos de COSY os deslocamentos químicos referentes aos H_{α}, H_{β}, H_{γ}, H_{δ} e H_{ε}, porém para alguns resíduos não foi possível se observar os H$\boldsymbol{\varepsilon}$ uma vez seus sinais estavam alinhados horizontalmente ou sobrepostos com outros sinais. Esses valores encontrados estão apresentados na Tabela 4.1 (quarta e quinta coluna).

A Figura 4.3 mostra a atribuição dos sistemas de *spins* e as cadeias laterais correspondentes a cada resíduo de aminoácido. Porém, não foi possível inferir sobre a posição dos resíduos de aminoácidos na sequência peptídica, a determinação dessas posições foi possível somente com o experimento de NOESY.

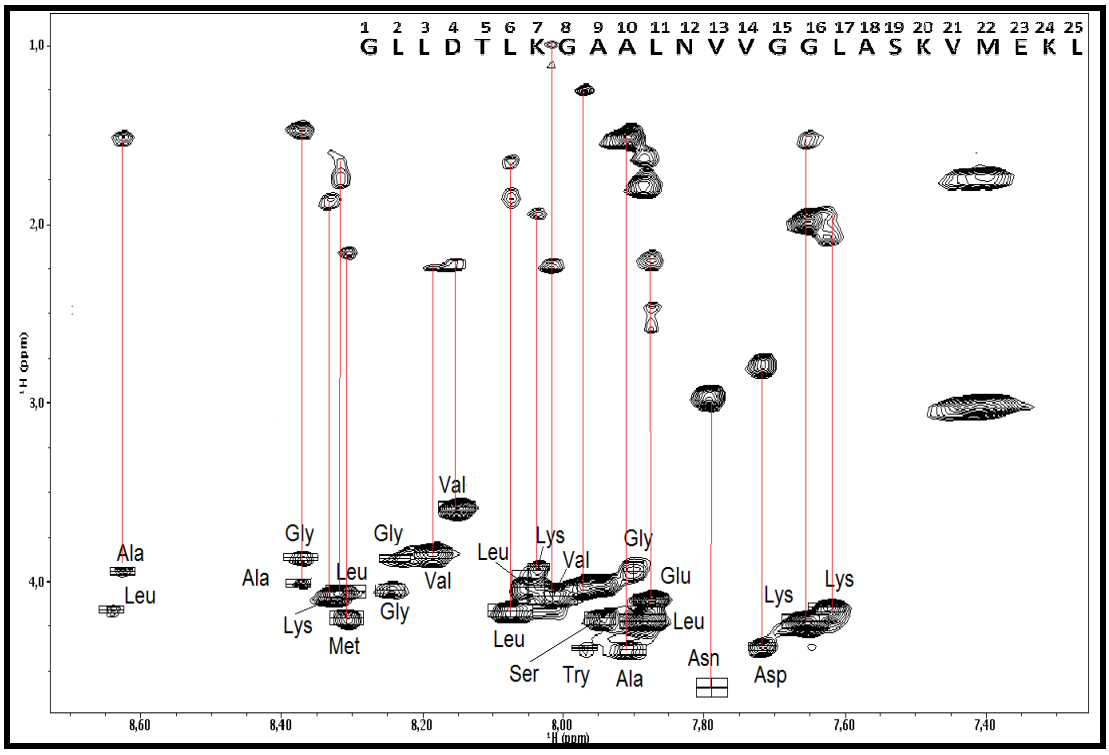


Figura 4. 3. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1) para a ocellatina-P1G16. Ampliação da região de H_N-H_{α} e cadeias laterais.

As informações de conectividade foram obtidas através do experimento de NOESY que forneceu informações de acoplamentos de prótons próximos a uma distância inferior a 5 Å (Wüthrich, 1986).

Tabela 4. 1. Deslocamentos químicos de ^{1}H (ppm) para o peptídeo ocellatina-P1G16 na presença de 100 mmol.L^{-1} de SDS-d_{25}, a 36℃.

Resíduo	**δ_{NH}**	**$\delta_{H\alpha}$**	**$\delta_{H\beta}$**	**δ_{outros}**
Leu 2	8,65	4,16	1,65 1,67	γ 1,57
Leu 3	8,35	4,06	1,75 1,56	γ 1,83
Asp 4	7,73	4,37	2,78 2,82	-
Try 5	7,98	4,38	4,01	γ 1,24
Leu 6	8,08	4,15	1,65 1,55	γ 1,85 δ 1,9
Lys 7	8,34	4,11	1,61 1,86	γ 1,47
Gly 8	8,25	4,05 3,88	-	-
Ala 9	8,38	4,01	1,53	-
Ala 10	7,91	4,38	1,49	-
Lys 11	8,04	3,93	1,95	γ 1,38 δ 1,63 ε 3,00
Asn 12	7,79	4,60	2,94 2,91	-
Val 13	8,02	4,06	2,26	γ 1,14 γ 1,01
Val 14	8,19	3,85	2,25	γ 1,06 γ 1,02
Gly 15	7,90	3,87	-	-
Gly 16	8,38	3,95	-	-
Leu 17	8,05	4,04	1,73	
Ala 18	8,63	3,95	1,53	-
Ser 19	7,95	4,21	4,00	-
Lys 20	7,63	4,15	1,83 1,65	γ 1,52
Val 21	8,16	3,59	2,23	γ 1,06; 0,95
Met 22	8,31	4,21	2,15 1,97	γ 2,62 δ 2,76
Glu 23	7,88	4,11	2,22 2,2	γ 2,59; 2,47
Lys 24	7,66	4,23	1,98 1,71	γ 1,53 δ 1,71 ε 2,98
Leu 25	7,89	4,23	1,74 1,78	δ 1,60

Para se determinar a estrutura secundaria de forma rápida e simples adotou-se um método chamado índice de deslocamento químico (CSI) que prevê a estrutura secundária da cadeia principal (Wishart, 1992). A Figura 4.4 mostra a extensão de estrutura secundária em α-hélice pela presença de no mínimo quatro ‘‘-1’’ (não necessariamente consecutivos), sendo o ponto

de terminação caracterizado pela primeira aparição de dois ‘‘0’’ consecutivos.

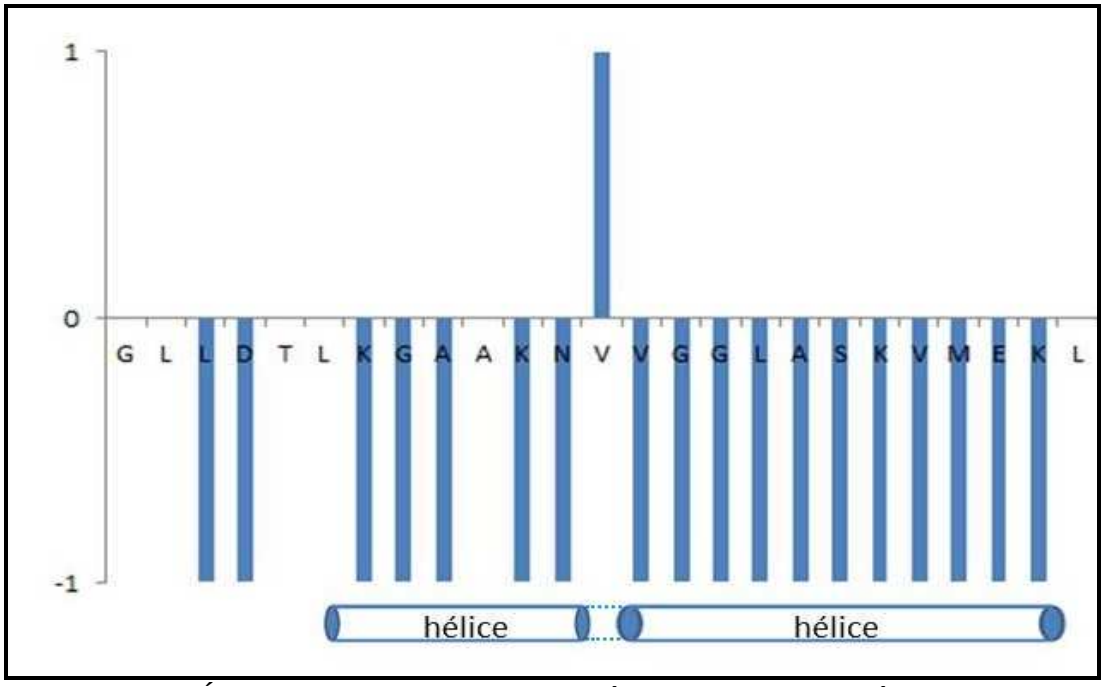


Figura 4. 4. Índice de deslocamento químico para o peptídeo ocellatina-P1G16 a 1 mM em 100 mM *SDS-d_{25}* e 36℃.

Durante a atribuição observou-se um deslocamento químico referente ao resíduo Val-13 acima do esperado para valina, porém dentro da faixa de variação de deslocamento químico (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*). Sugere-se então que não existe a quebra da estrutura nesta região devido à presença de +1 nesta posição, mas que a este valor ocorreu devido ao ambiente químico deste resíduo estar modificado pela sua vizinhança com a Asn-12, como observado pelo painel de NOE, Figura 4.5. Dessa forma pela analise de CSI propõem-se a extensão de hélice compreendida entre os resíduos Leu-6 ao Lys-17.

Por meio de uma análise dos sinais de NOESY, pôde-se observar a presença de NOEs clássicos de estruturas helicoidais. O grande número de correlações observadas entre os hidrogênios amínicos pode ser associado à alta estabilização estrutural deste peptídeo. Observaram-se correlações inter-residuais i,i+3 e i,i+4 para a maioria dos resíduos, que são característicos de estruturas em *α*-hélice, indicando assim a presença de um

segmento helicoidal. A Figura 4.5 apresenta o diagrama de conectividade de NOE a fim de se prever a extensão helicoidal do peptídeo em estudo.

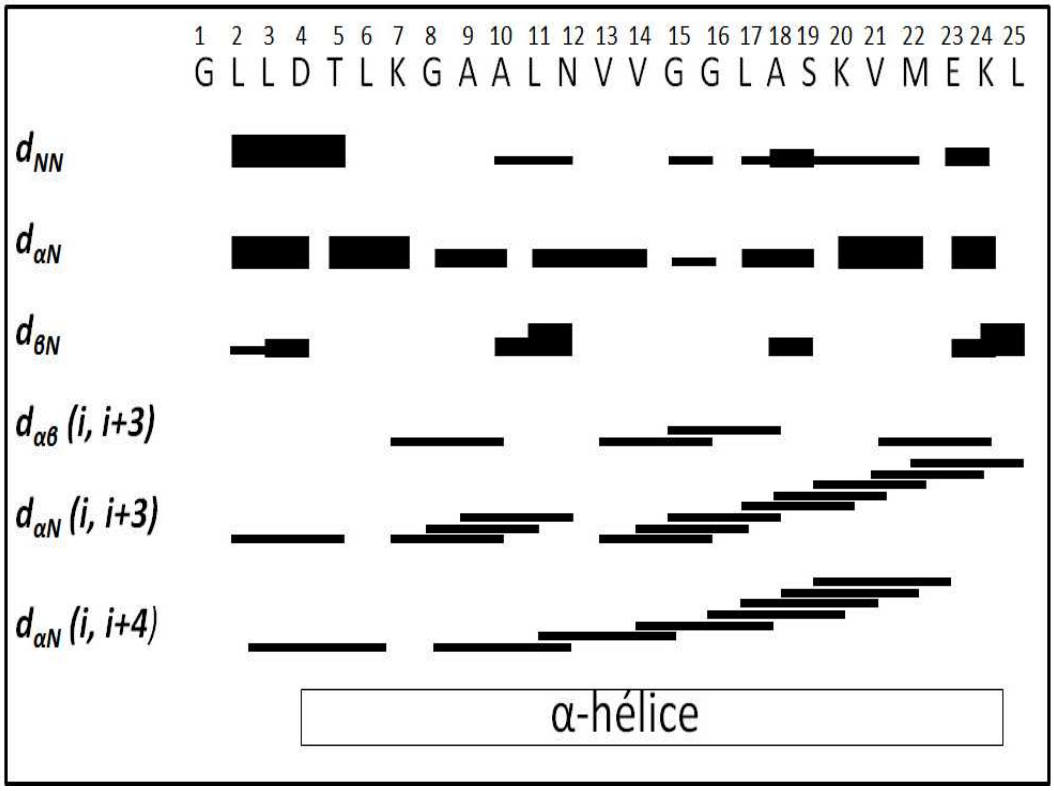


Figura 4. 5. Diagrama de conectividade de NOE. As intensidades das interações d_{NN}, $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama com linhas de diferentes espessuras, elas variam de acordo com as intensidades dos sinais, como: fraca, media e forte. As interações de media distância estão representadas pelas linhas finas $d_{\alpha N}$(i,i+3), $d_{\alpha\beta}$(i,i+3), sendo que a extensão de hélice do peptídeo está indicada pelo retângulo na parte inferior do diagrama.

Foi detectado NOE inter-residual (i,i+4) envolvendo o segundo resíduo (leu-2), isto sugere a existência de um pequeno ordenamento estrutural a partir desse resíduo. O painel de NOE sugere uma estruturação em hélice entre os resíduos Leu-2 a Lys-24.

A Figura 4.6 apresenta a ampliação do mapa de contornos de TOCSY na região H_N-H_α de impressão digital, onde se destaca a atribuição e posição encontrada após as análises de correlações do NOESY de cada aminoácido presente no peptídeo ocellatina-P1G16.

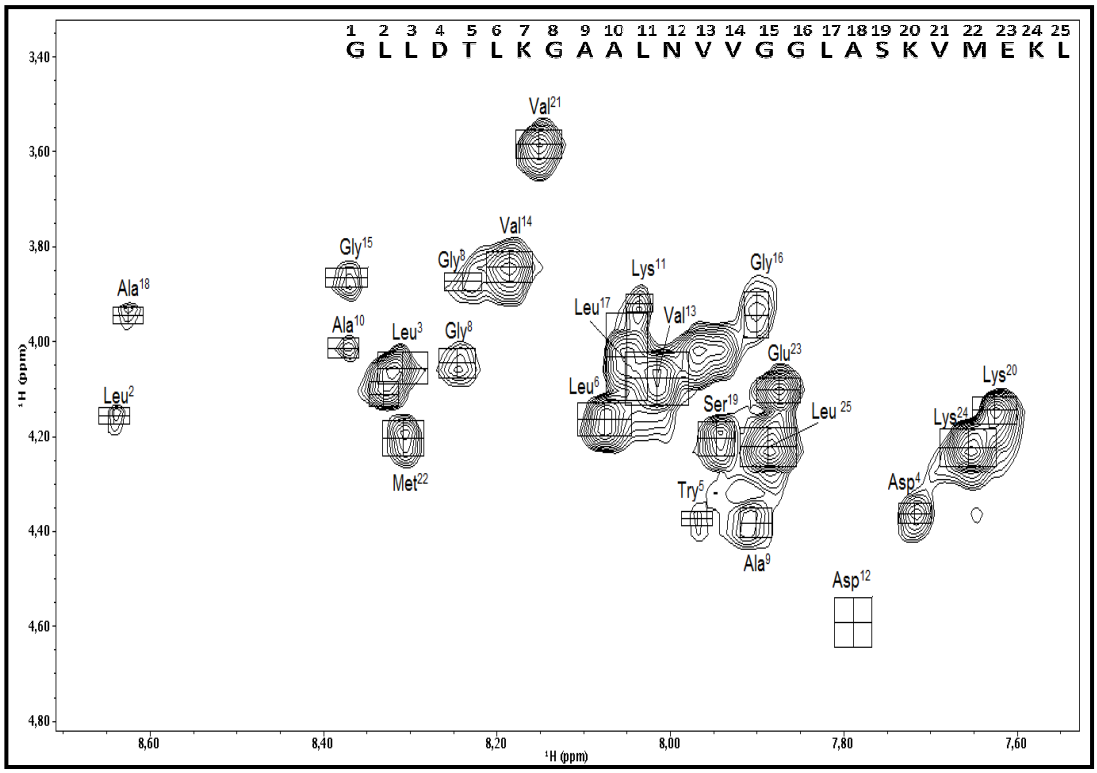


Figura 4. 6. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1). Região ampliada de H_N-H_α do peptídeo ocellatina-P1G16 em 100 mmol.L^{-1} de micelas de SDS-d_{25}.

A numeração observada acima dos sinais (Figura 4.7) corresponde às correlações encontradas para cada resíduo na sequência primária do peptídeo em estudo. Estas e outras correlações encontradas são de extrema importância para o cálculo estrutural.

As correlações inter-residuais observadas possibilitaram ordenar os sistemas de *spins* na sequência peptídica, conforme observado na Tabela 4.1. Essa numeração representa à seguinte sequência de aminoácidos na cadeia peptídica: Gly-1 Leu-2 Leu-3 Asp-4 Try-5 Leu-6 Lys-7 Gly-8 Ala-9 Ala-10 Lys-11 Asn-12 Val-13 Val-14 Gly-15 Gly-16 Leu-17 Ala-18 Ser-19 Lys-20 Val-21 Met-22 Glu-23 Lys-24 Leu-25. O resíduo de aminoácido Asn-12 não foi observado no mapa de contornos de TOCSY, provavelmente devido à maior dinâmica deste resíduo de aminoácido, contudo através mapa de contornos de NOESY ele pôde ser observado e sua posição atribuída.

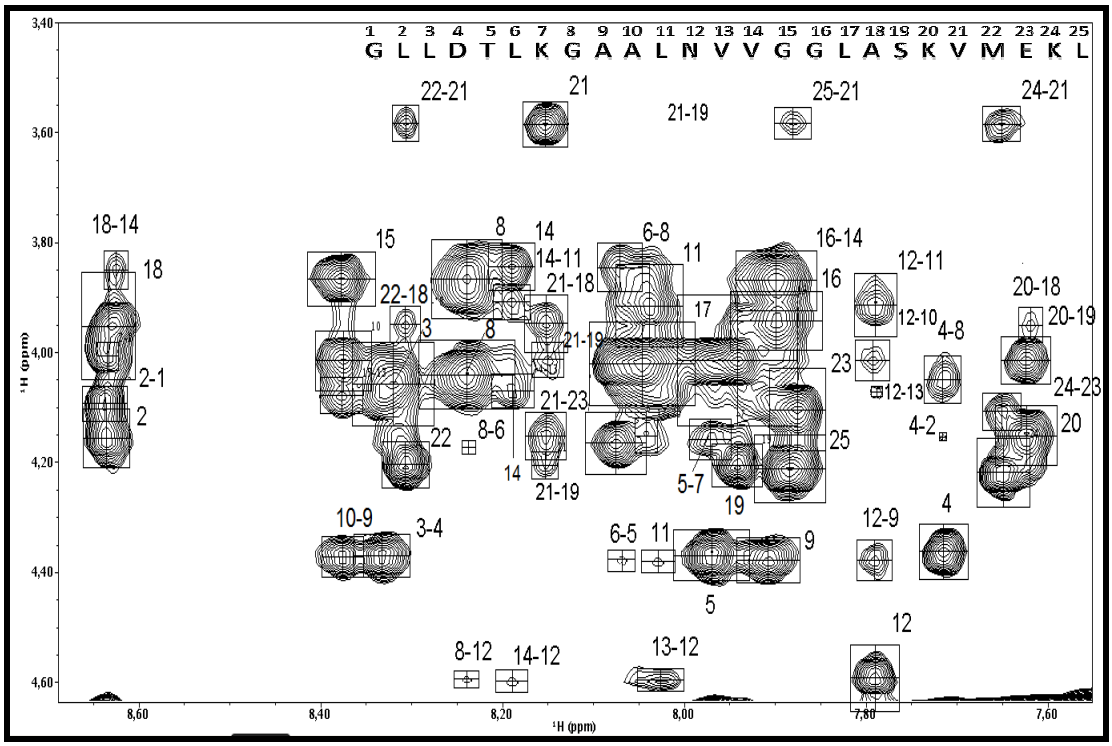


Figura 4. 7. Ocellatina-P1G16 – Mapa de contornos de NOESY, região de impressão digital, peptídeo em 100 mmol.L^{-1} de micelas de SDS-d_{25}, contendo as correlações atribuídas para esta região.

4.1.3. Análise estrutural – Ocellatina-P1G16

A partir do volume dos sinais presentes no mapa de contornos de NOESY, foram obtidas as restrições de distâncias correspondentes a cada correlação. Esses dados foram adicionados em uma Tabela de restrições. Conforme observado na Tabela 4.2 foi utilizado um conjunto de 196 restrições de distância, resultando em uma média final de 8,17 restrições para cada resíduo de aminoácido. O conjunto de restrições de média distância foi responsável pela maior parte das informações estruturais. Somente após certificada a presença de estrutura em *α*-hélice (isto para não forçar uma estrutura erroneamente) foi adicionada 40 restrições de distância, referentes às ligações de hidrogênios que são formadas nesse tipo de estrutura.

As restrições de ligação de hidrogênio foram inseridas a cada quatro resíduos de aminoácidos (n + 4). Isso porque as *α*-hélices são estruturas espiraladas, portanto estabilizadas por uma rede de interações de hidrogênio

ao longo do esqueleto peptídico entre os grupos C=O e N−H (Deber e Li, 1995).

Tabela 4. 2. Estatística para as 20 estruturas do peptídeo ocellatina-P1G16.

Restrições utilizadas	196
Intra-residuos	57
Sequencial	46
Média distância (1<|i-j|<5)	53
Ligação de hidrogênio	40

4.1.4. Estruturas calculadas para o peptídeo ocellatina-P1G16

Após as etapas descritas no tópico 3.4.1.4, obtiveram-se 20 estruturas finais de um total de 200 estruturas calculadas. Elas foram selecionadas para representar a família de estruturas do peptídeo ocellatina-P1G16 (Figura 4.8) devido apresentarem as estruturas de menor energia no arrefecimento simulado. Os hidrogênios nesta Figura foram omitidos para melhor visualização. A seta abaixo da figura indica a região N-terminal e C-terminal.

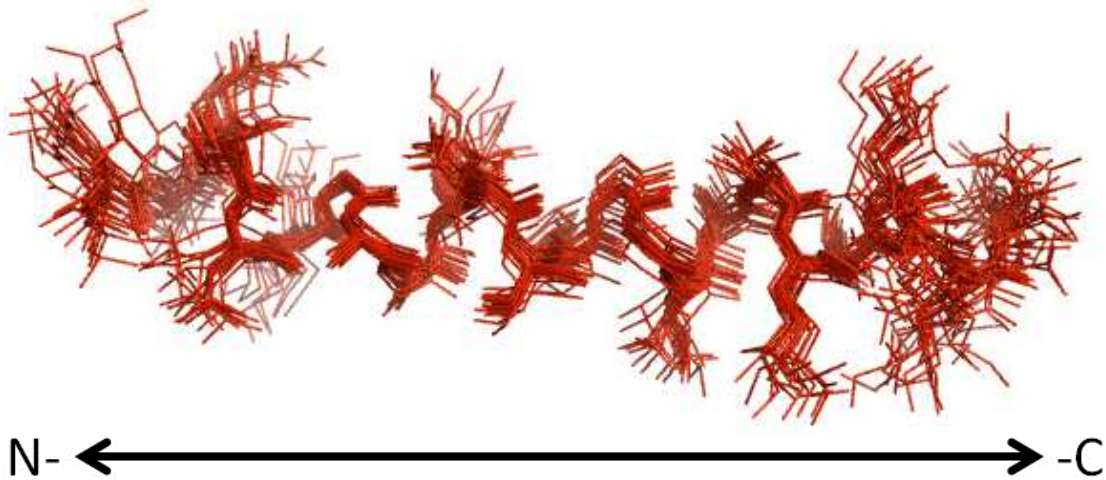


Figura 4. 8. Sobreposição das vinte estruturas de menor energia do peptídeo ocellatina-P1G16.

A estrutura do peptídeo ocellatina-P1G16 de menor energia (Figura 4.7), na presença de micelas de SDS-d_{25}, apresentou-se predominantemente helicoidal, em uma α-hélice regular que abrange a região entre os resíduos Leu-3 e Lys-24.

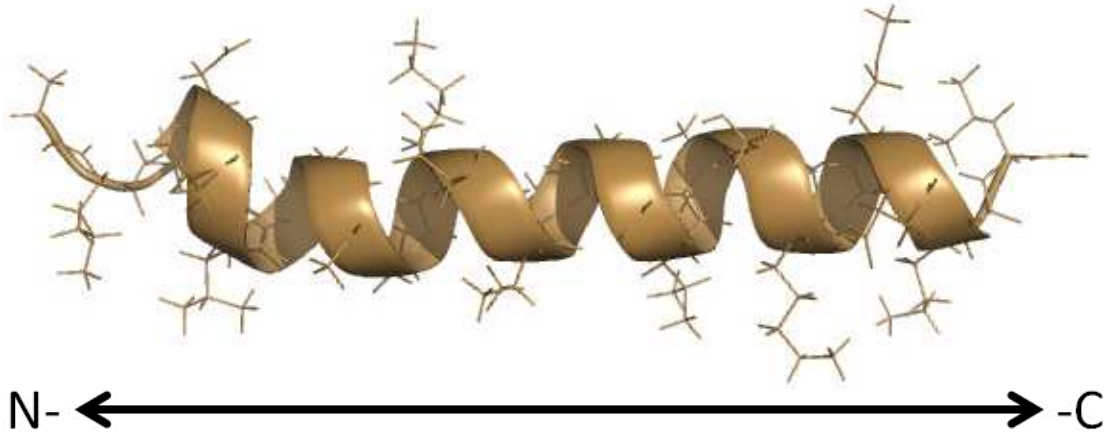


Figura 4. 9. Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo ocellatina-P1G16 em presença de micelas de SDS-d_{25}.

As estruturas obtidas no cálculo estrutural concordam com as estruturas esperadas a partir das análises de índice de deslocamento químico e diagrama de conectividade realizadas nos tópicos 4.1.2.

4.1.5. Mínimos de desvio médio quadrático (RMSD)

As 20 estruturas com menor energia foram analisadas por meio do programa PyMOL (DeLano, 2002). Sendo RMSD a medida de quanto à posição de cada átomo em uma estrutura varia para um conjunto de conformeros, a sobreposição da cadeia principal das 19 estruturas de menor energia com a primeira estrutura de menor energia forneceu valores individuais de mínimos de desvio médio quadrático em relação à estrutura de menor energia. A média RMSD das 20 estruturas para o peptídeo ocellatina-P1G16 correspondeu a um bom valor de RMSD visto que este se apresenta 1 < RMSD > 0,5. Estes dados confirmam a boa geometria da família de estruturas obtidas visto que as cadeias laterais apresentam uma boa flexibilidade conformacional (Figura 4.10).

A Tabela 4.3 apresenta os valores de desvio médio quadrático para toda a cadeia principal do resíduo 1 ao 25 e para a região da cadeia principal em hélice entre os resíduos 3 e 24, respectivamente. A diferença entre os dois valores mostra a flexibilidade das extremidades não estruturadas.

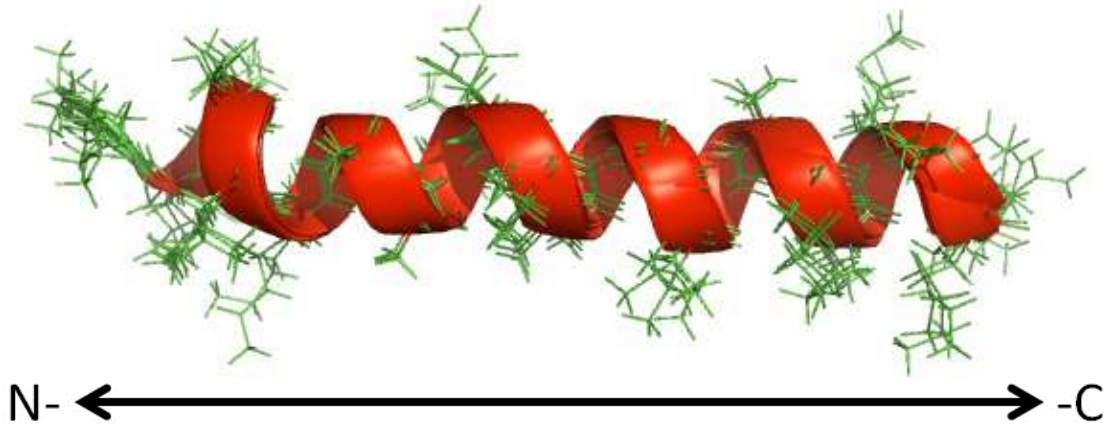


Figura 4. 10. Sobreposição das três estruturas de menor energia.

Tabela 4. 3. Estatística dos desvios médios quadráticos

RMSD	Å
Cadeia principal (resíduos 1-25)	0,87 ± 0,25
Cadeia principal (resíduos 3-24)	0,62 ± 0,24

4.1.6. Ramachandran

Em 1963, Ramachandran e seus colaboradores criaram um modelo de esferas rígidas, conhecido como gráfico de Ramachandran. Nele são mostradas regiões de ângulos ϕ e ψ estéricamente permitidos, com base nos ângulos de Van Der Waals. O método baseia-se na exclusão por impedimento estérico, ou seja, quando átomos ocupam o mesmo espaço (Ramachandran *et al*., 1963). Para determinar conformações permitidas, a distância de ligação entre resíduos de átomos adjacentes é examinada usando o critério de menor distância de contato de Van der Waals. O ângulo de torção ϕ é definido pela região C_{i-1}-N_i-$C_{\alpha i}$-C_i, e o ângulo ψ pela torção N_i-$C_{\alpha i}$-C_i-N_{i+1}(Ramakrishnan e Ramachandran, 1965).

As estruturas obtidas a partir de dados experimentais estão sujeitas a algumas fontes de erros, tanto experimental quanto na interpretação dos resultados, estes erros que podem ser introduzidos durante o processo de construção e refinamento das estruturas, podendo resultar em orientações peptídicas incorretas. Desta forma utilizando o modelo de Ramachandran é possível medir o quão bom o modelo final se ajusta aos dados experimentais (Kleywegt e Jones, 1996). Portanto é importante uma avaliação da qualidade

das estruturas, que foram analisadas através do gráfico de Ramachandran (Figura 4.11), gerado por meio do programa procheck (Laskowski, 1993).

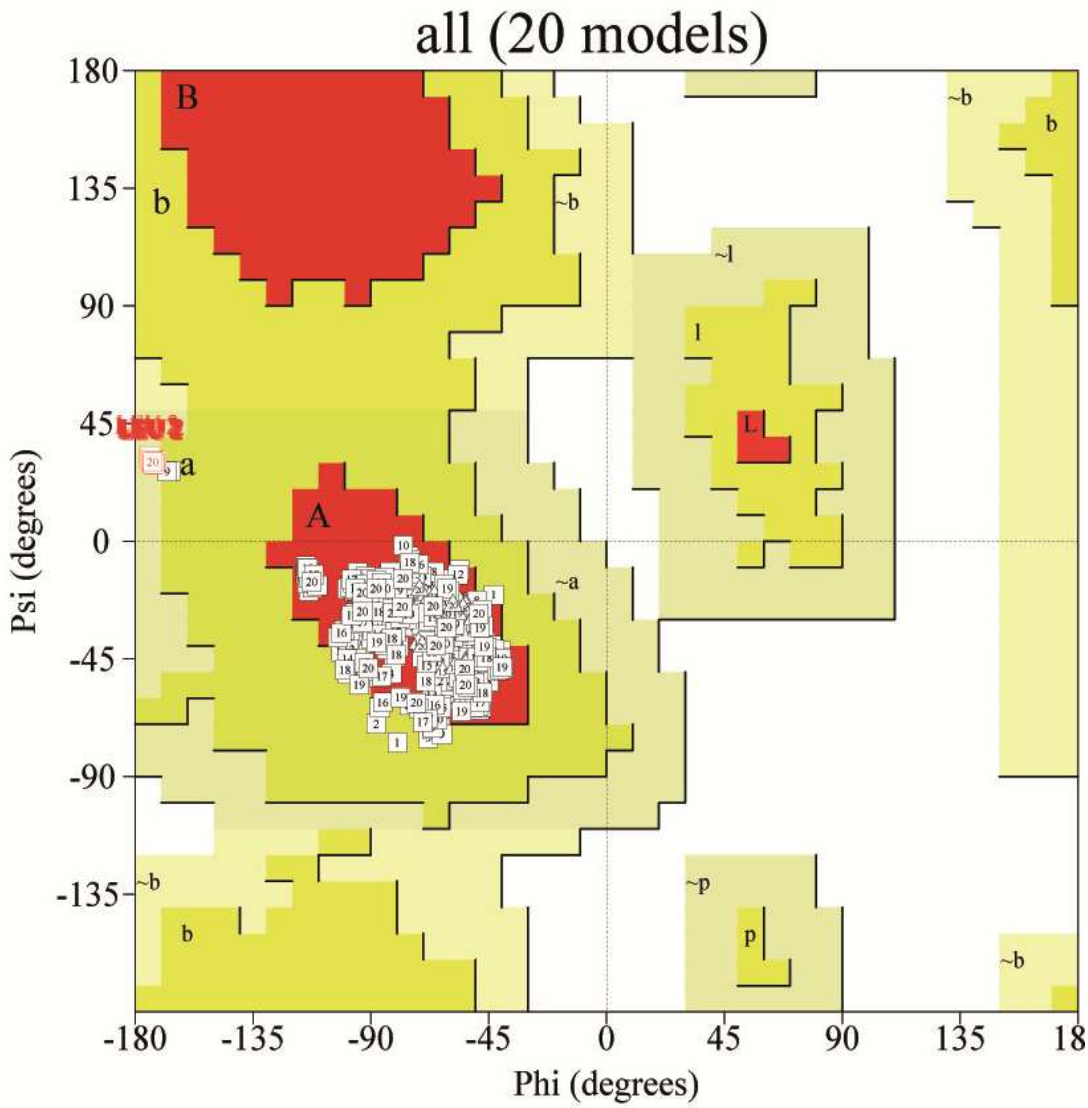


Figura 4. 11. Ocellatina-P1G16 - Sobreposição dos 20 diagramas de Ramachandran.

No gráfico de ramachandran observam-se: regiões em vermelho [A,B,L], que indicam que os resíduos integrantes dessa região apresentam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; regiões em amarelo escuro [a, b, l, p], que indicam conformações menos estáveis que a anterior, devido à aproximação de átomos e são denominadas de permitidas; regiões em amarelo claro [~a, ~b, ~l, ~p], que indicam que são acessíveis através da flexão dos ângulos e comprimentos da ligação, sendo energeticamente menos estável, mas

possíveis, e denominadas de menos permitidas. A área branca é uma região proibida com ocorrência de impedimentos estereoquímicos (Ramakrishnan e Ramachandran,1965).

As regiões A e L são regiões características de *α*-hélice e a região B de folhas betas. A média dos 20 diagramas de Ramachandran obtidos para cada estrutura mostra que 91% dos ângulos ϕ e ψ do peptídeo ocellatina-P1G16 encontram-se em regiões mais favorecidas de *α*-hélice, 4,5% em regiões permitidas, 4,5% em regiões menos permitidas e 0% na região proibida. A Figura 4.11 apresenta a sobreposição dos diagramas da família de 20 estruturas do peptídeo ocellatina-P1G16. A Leu-2 é o único resíduo observado em regiões menos permitidas isso porque ele está localizado próximo à extremidade *N*-terminal onde não ocorre a estabilização da hélice.

A análise dos diagramas de Ramachandran mostra que as estruturas obtidas apresentam um bom modelo devido à ausência de resíduos na região desfavorecida. Em contrapartida, a maior parte dos resíduos está localizada e agrupada na região mais favorecidas de *α*-hélice. A estrutura helicoidal fica evidenciada no gráfico de Ramachandran, devido à maioria dos resíduos localizarem-se nas regiões A e L, características de *α*-hélice (Hovmöller, 2002).

4.1.7. Troca hidrogênio-Deutério ocellatina-P1G16

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta também utilizada para estudar a dinâmica e estabilidade de peptídeos. Uma das formas para se realizar esse estudo é através do monitoramento, da troca do hidrogênio por deutério (troca H/D). Os experimentos de TOCSY podem fornecer informações sobre a exposição dos resíduos ao solvente através da troca dos hidrogênios ligados aos nitrogênios da cadeia principal por deutério (Chi *et al*., 2002). O deutério não apresenta sinal no mapa de contornos de RMN de ^{1}H.

Através desse experimento, foi observada a atenuação do sinal de alguns resíduos de aminoácidos na região H_N-H_α, indicando a troca de hidrogênio pelo deutério do solvente, que foi favorecida pela maior acessibilidade do solvente a determinados resíduos de aminoácidos. Esse

fato corrobora a informação de Chi e colaboradores (2002), o qual observou também que a cinética de troca H/D é governada pela localidade dos resíduos.

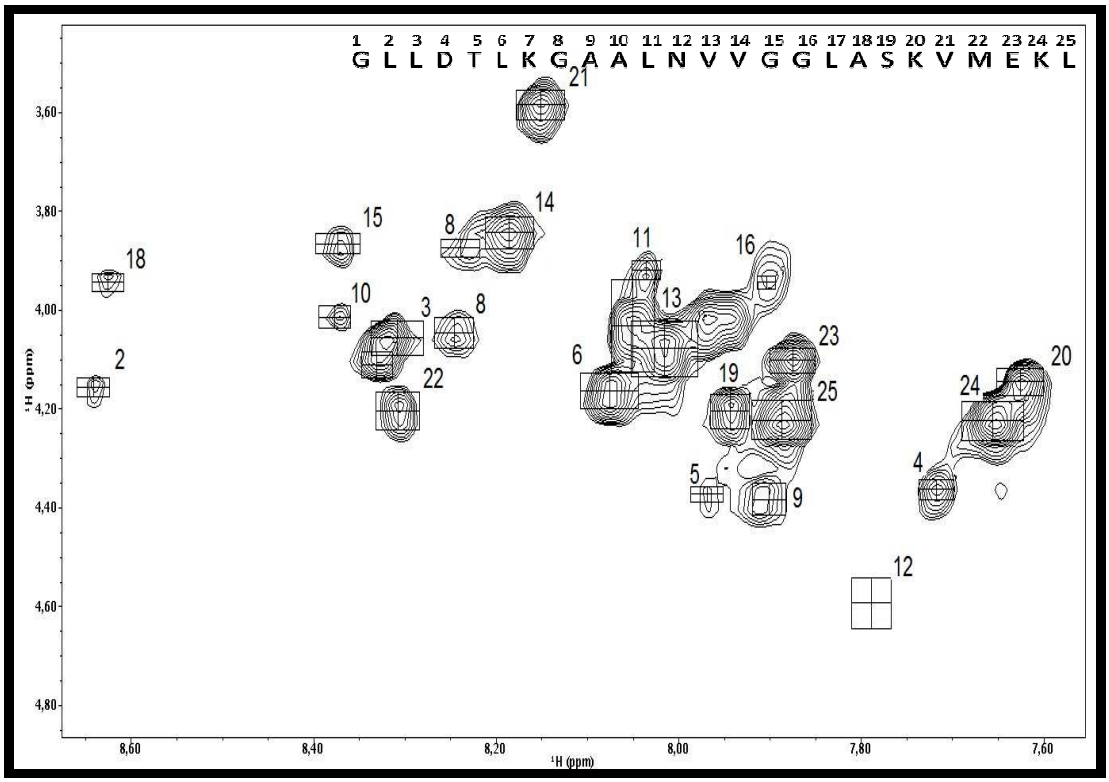
A cinética de atenuação dos sinais de correlação H_N-H_α dos mapas de contornos de TOCSY, após a adição de D_2O está apresentada na Figura 4.8, os números acima de cada sinal no mapa de contornos correspondem às suas posições na sequência primária do peptídeo.

Conforme pode ser observado na região de H_N-H_α, Figura 4.12 B, do mapa de contornos de TOCSY, a troca de hidrogênio por deutério ocorreu para os resíduos de aminoácidos Leu-2 Leu-3 Try-5 Leu-6 Gly-8 Ala-9 Asn-12 Gly-15 Ala-18, após 2 horas e 24 minutos e após 10 horas e 24 minutos havia trocado somente Leu-2 Leu-3 Try-5 Leu-6 **Lys-7** Gly-8 Ala-9 Asn-12 Gly-15 Ala-18. A rápida troca H/D indica a maior acessibilidade do solvente a estes resíduos de aminoácidos. Não foi possível inferir se houve troca H/D para os resíduos Gly-1 e Asn-12, pois são muito lábeis. Os mapas de contornos apresentados estão com baixa resolução devido ao pouco número de varreduras utilizado.

A pequena atenuação do sinal observada para os resíduos hidrofílicos Gly^{15} e Met^{22} é explicada pelo fato desses aminoácidos se encontrarem na transição da face hidrofóbica para a hidrofílica da α-hélice anfipática, encontrando-se na interface entre a região polar e o interior hidrofóbico da micela.

A Figura 4.13 (pág. 59) apresenta destacado em verde, os resíduos que sofreram a troca H/D e que, portanto, estão expostos ao solvente. Observaram-se os detalhes moleculares de exposição do peptídeo ocellatina-P1G16 ao solvente e assim, foi possível propor um modelo de interação dessa molécula com as micelas de SDS-d_{25}. A região da estrutura destacada em azul representa os resíduos de aminoácidos que não sofreram troca H/D, estando, portanto estes resíduos em contato com a micela ou formando ligaçoes de hidrogênio resistentes impedindo a troca.

a)



b)

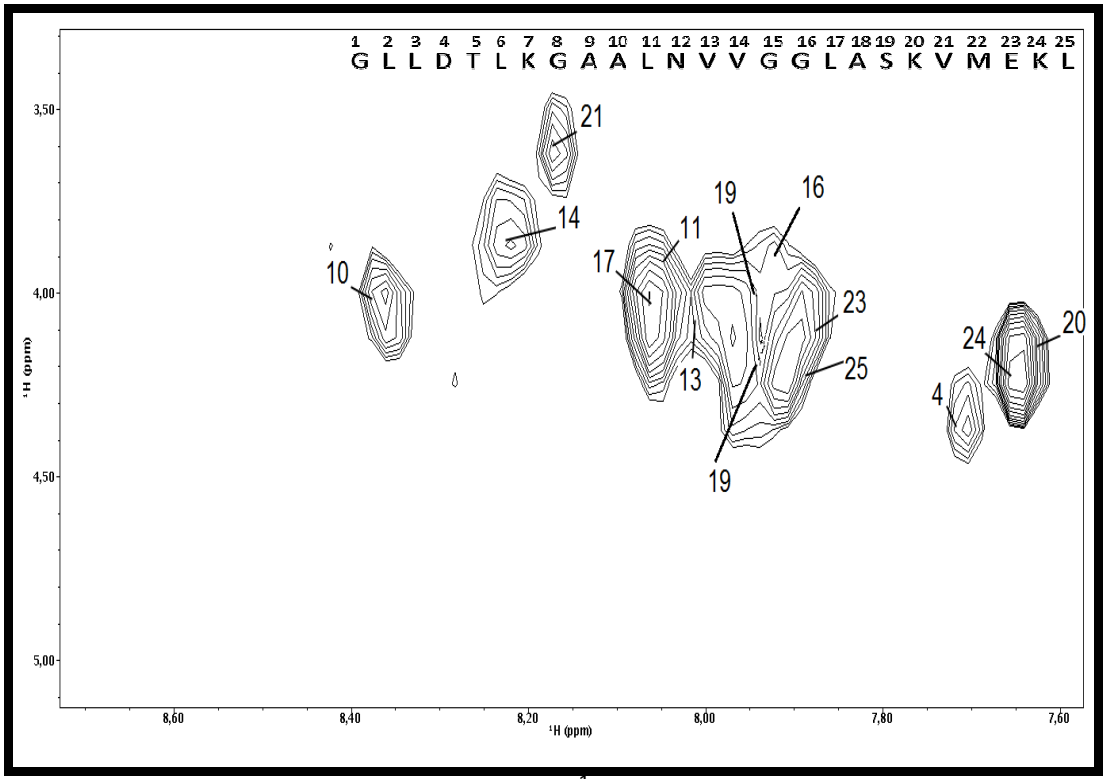


Figura 4. 12. Mapas de contornos de ^{1}H TOCSY da região de impressão digital (N_H-H_α) peptídeo ocellatina-P1G16 em *SDS-d_{25}*, a 36 ℃. A) antes da adição de D_2O e B) 10 horas e 24 minutos após a adição de D_2O.

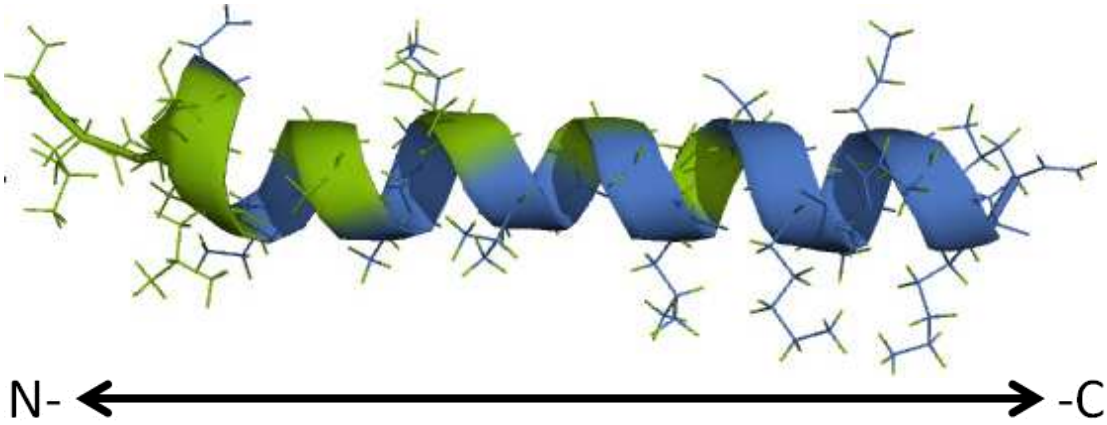


Figura 4. 13. Ocellatina-P1G16 - Estrutura de menor energia com os resíduos que sofreram troca H/D em verde e os resíduos que não trocaram em azul.

È importante enfatizar que os resíduos Ser-19 Lys-20 Val-21 Met-22 Glu-23 Lys-24 Leu-25 não trocaram, provavelmente por estarem protegidos. Sendo assim, com base na troca H/D e no experimento de dicroísmo circular propõem-se que o peptídeo ocellatina-P1G16 apresenta uma orientação paralela à superfície da membrana, porém com a porção C-terminal mergulhada na micela de SDS entre os resíduos Ser-19 e Leu-25. Este fato pode ser confirmado pelo experimento de dicroísmo circular (Figura 4.1) que mesmo a 95℃ o peptídeo ainda apresenta 33% de sua estrutura secundaria.

4.1.8. Efeitos eletrostáticos

A estrutura do ocellatina-P1G16 inclui quatro resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys^{7}, Lys^{11}, Lys^{20}, Lys^{24}) e dois carregados negativamente (Asp^{4}, Glu^{23}).

Bechinger (2004) em seu trabalho constatou a importância do caráter catiônico na interção do peptideo com a superficie das membranas de bactérias e de outros microrganismos, devido à cationicidade favorecer a afinidade dos peptídeos pelos fosfolipídios ácidos (carregados negativamente).

Para se observar a contribuição do caráter cationico do peptídeo na interação com o meio mimetico, destacaram-se os resíduos carregados positivamente em rosa (Figura 4.14).

A interação eletrostática na estabilização da conformação helicoidal foi constatada para o peptídeo ocellatina-P1G16, devido os resíduos catiônicos, destacados em rosa, apresentarem-se na face hidrofilica, correspondente a face proposta de interação com superfície da micela de SDS-$d_{25.}$ Esta constatação se confirmou os resultados de troca Hidrogênio/deutério e anfipaticidade.

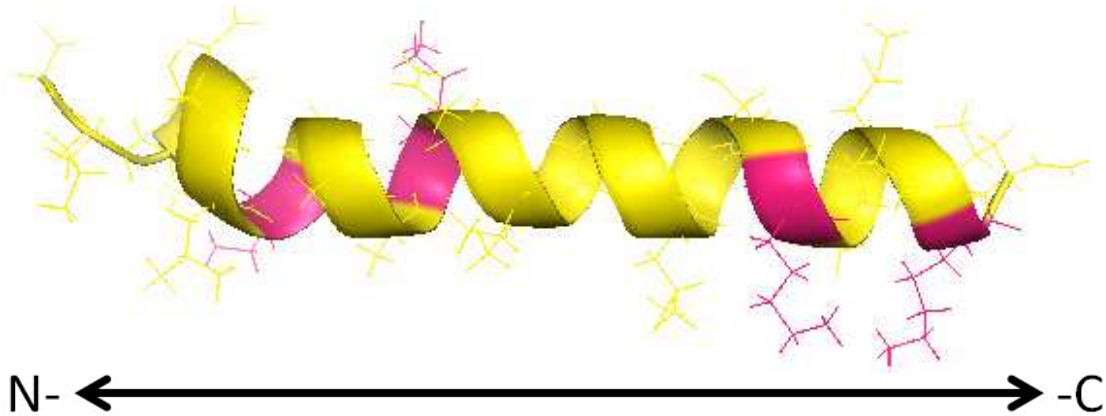


Figura 4. 14. Ocellatina-P1G16 – Estrutura helicoidal de menor energia, com os quatro resíduos catiônicos destacados em rosa.

4.1.9. Anfipaticidade

A anfipaticidade é caracterizada pela presença de duas faces distintas na estrutura do peptídeo, uma polar e outra hidrofóbica. Portanto para se observar a presença de anfipaticidade na estrutura do peptídeo ocellatina-P1G16, utilizou-se como base a sequência primária (Tabela 3.1), destacando-se os resíduos de acordo com sua polaridade na estrutura terciária.

A anfipaticidade do peptídeo foi calculada utilizando o mini aplicativo HydroMCalc, que utiliza a escala de hidrofobicidade consenso combinada (CCS) baseada na projeção de Edmundson (http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/HydroCalc/HydroMCalc.html#run).

A Figura 4.15 mostra a projeção de Edmundson para o peptídeo ocellatina-P1G16. Os cálculos de momento hidrofobico relativo indicaram que a estrutura do peptídeo apresenta-se com aproximadamente 36% em *α*-hélice anfipática. Essa característica explica a pouca afinidade deste peptídeo pelas membranas neutras e zwitteriônicas.

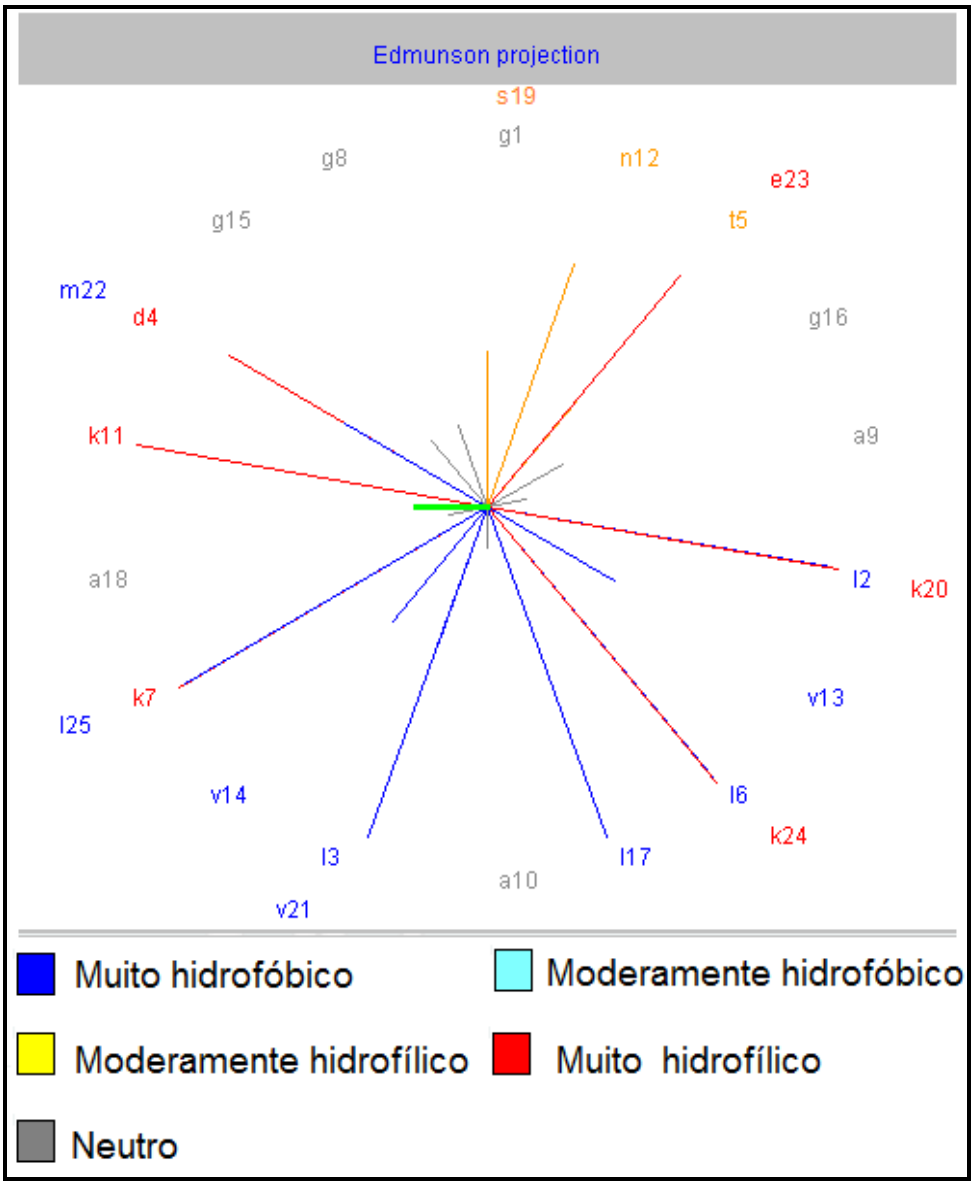


Figura 4. 15. Projeção de Edmundson para o peptídeo ocellatina-P1G16. O tamanho das barras é proporcional ao valor do índice de hidrofobicidade (Hi) do resíduo. Os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos são destacados através das cores.

A habilidade deste peptídeo em se estruturar numa conformação helicoidal com arranjo anfipático provavelmente está contribuindo para a atividade do mesmo, como observado por Giangaspero, que associou o aumento da atividade com o aumento da anfipaticidade (Giangaspero *et al*., 2001). Todos os resíduos hidrofóbicos, assinalados na Figura 4.15, Leu-2 Leu-3 Leu-6 Val-13 Val-14 Leu-17 Val-21 Met-22 Leu-25, estão localizados na mesma face hidrofóbica da estrutura calculada (Figura 4.16).

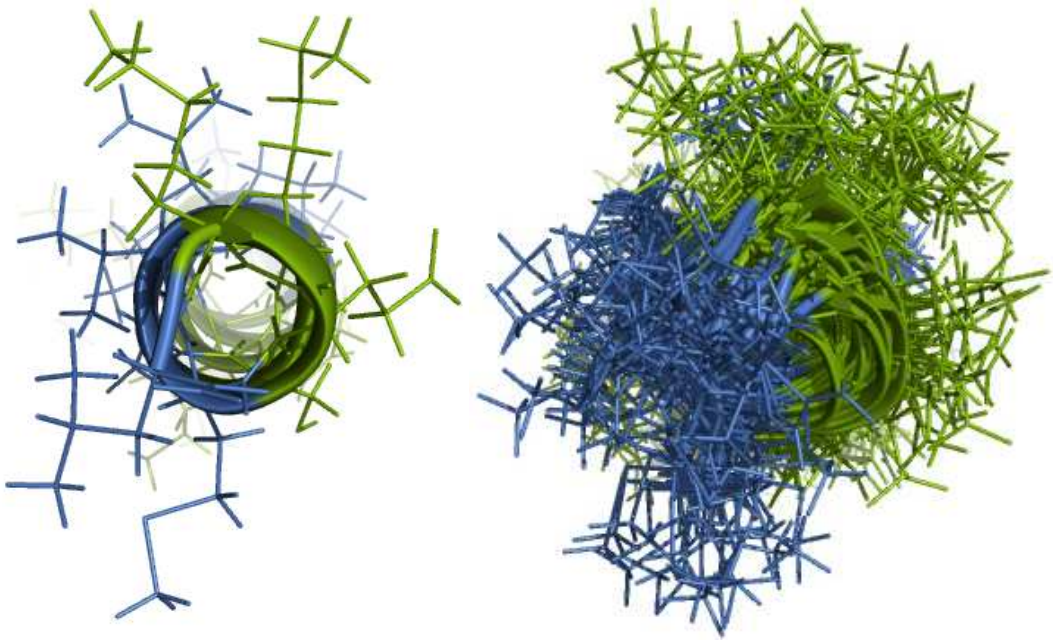


Figura 4. 16. Demonstração frontal a direita da estrutura de menor energia e a direita das 20 estruturas sobrepostas. Os resíduos hidrofóbicos foram destacados em azul e os hidrofílicos em verde, a região C-terminal sai do plano.

4.1.10. Modelo proposto para o peptídeo ocellatina-P1G16

As faces de interação proposta pelo experimento de troca H/D, pela análise de anfipaticidade e hidrofobicidade e de efeitos eletrostáticos apontam a mesma face de interação peptídeo/micela, sendo assim a Figura 4.17 apresenta um modelo ilustrativo, da provável forma de interação do peptídeo ocellatina-P1G16 a superfície da micela. Na figura os resíduos de aminoácidos destacados em azul correspondem aos resíduos polares e os verdes apolares.

Como observado pela troca H/D e confirmado pelo dicroísmo circular, o peptídeo se apresenta com a porção C-terminal mergulhado na micela, sendo assim a figura a seguir ilustra um modelo proposto a partir das análises realizadas neste trabalho.

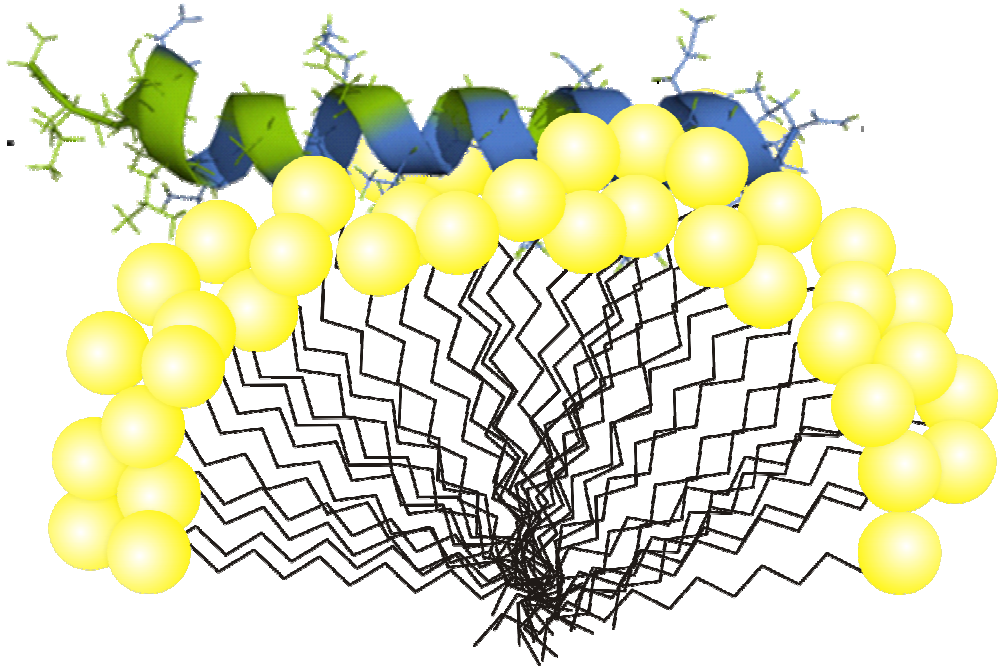


Figura 4. 17. Modelo proposto para a orientação do peptídeo ocellatina-P1G16 na superfície das micelas de SDS-d_{25}, em azul estão destacados os resíduos que não sofreram troca H/D e em verde resíduos que trocaram.

4.2. Investigação estrutural do peptídeo hilina a1

4.2.1. Análise de dicroísmo circular (CD)

O comportamento estrutural do peptídeo em função da temperatura foi avaliado através da análise de dicroísmo circular. A presença de valores positivos $\lambda_{máx}$ próximos a 190 nm e mínimos intensos em λ_{max} 208 e 222 nm, indicam a presença de estrutura em α-hélice (Krittanai, 1997). A 25 ºC, o peptídeo apresentou o máximo de conformação equivalente a 53% e a 95 ºC permaneceu ainda 18,5% da estrutura do peptídeo em hélice (Figura 4.18). Observou-se ainda, que a estabilidade desses peptídeos está diretamente ligada a variação da temperatura. Com o aumento de 25 ℃ para 95 ℃, os mínimos em λ_{max} 208 e 222 nm ficaram cada vez menos intensos, indicando a diminuição da estruturação em α-hélice.

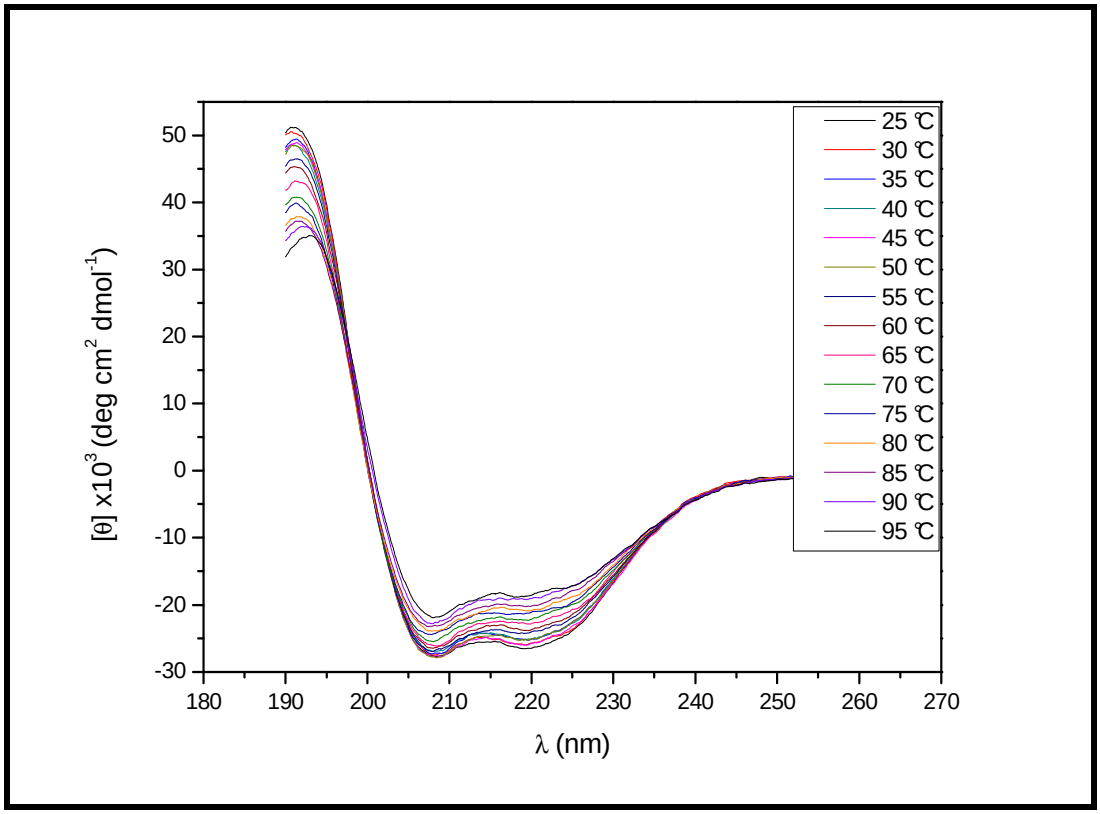


Figura 4. 18. Espectro de CD de 39,7 µM do peptídeo hilina a1 em SDS e H_2O, $[\theta]_{222\ nn}$ em função de λ (nm).

Estudos realizados por Castro e colaboradores (2009), através da espectroscopia de CD, mostraram que 83% da estrutura do peptídeo hilina

a1 apresentava-se em α-hélice na presença de TFE, este maior valor se deve indução de estrutura por parte deste meio mimético.

A Figura 4.19 mostra dois espectros de CD a 25 ºC. Em preto o espectro de CD do peptídeo antes de ser submetido ao aumento de temperatura e em vermelho após elevar a temperatura a 95 ºC e resfriá-la novamente a 25 ºC. Observa-se que mesmo após ser submetido a uma temperatura elevada o peptídeo não modifica sua estabilidade conformacional.

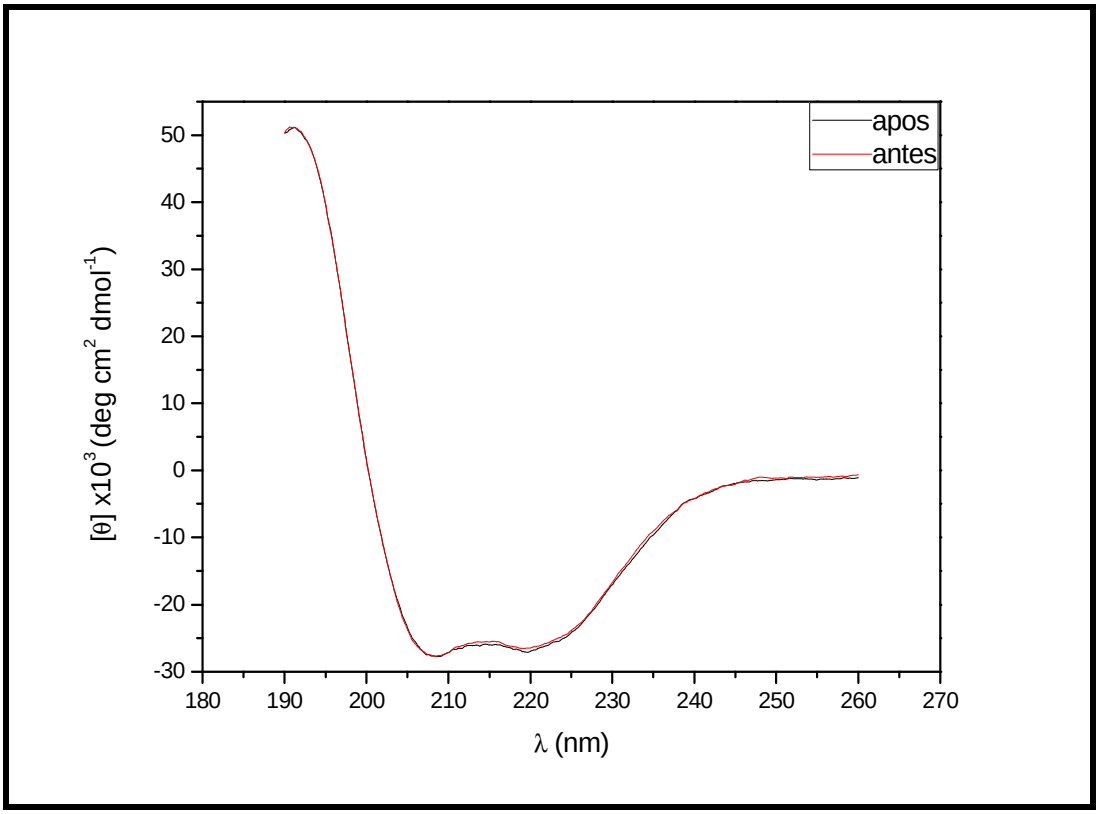


Figura 4. 19. Espectro de CD da hilina a1 na temperatura de 25ºC, antes e após submetê-la ao aumento de temperatura.

4.2.2. Atribuição dos sinais de RMN da hilina a1, através dos experimentos bidimensionais.

Os valores de deslocamentos químicos dos núcleos de ^{1}H para o peptídeo hilina a1 (Tabela 4.4), em micelas de SDS-d_{25}, foram encontrados utilizando como referência os valores Tabelados para os vinte aminoácidos essenciais do anexo A.

Os espectros de TOCSY e COSY forneceram informações a respeito do sistema de *spins* e deslocamentos químicos dos hidrogênios das cadeias laterais, respectivamente, conforme descrito no tópico 3.4.1.1 (pág.37) e 3.4.1.2 (pág. 38). Dessa forma, foram atribuídos os deslocamentos químicos dos hidrogênios das cadeias laterais (H_α, H_β, H_γ, H_δ e H_ε) dos resíduos de aminoácidos. Tais sinais foram observados facilmente uma vez que a cadeia peptídica é pequena e a sobreposição e/ou alinhamento de sinais é quase inexistente. Os valores encontrados de deslocamentos químicos das cadeias laterais estão apresentados na Tabela 4.4 (quarta e quinta coluna).

O hidrogênio da ligação N-H do resíduo prolina na posição, não pode ser observado, devido o nitrogênio estar ligado à cadeia lateral do aminoácido não apresentado assim próton aminico.

Conforme observado na a Figura 4.20 as técnicas de TOCSY e NOESY possibilitaram inferir somente sobre a o deslocamento químico dos resíduos de aminoácidos. Contudo a localização dos aminoácidos na sequência peptídica só foi possível com o experimento de NOESY.

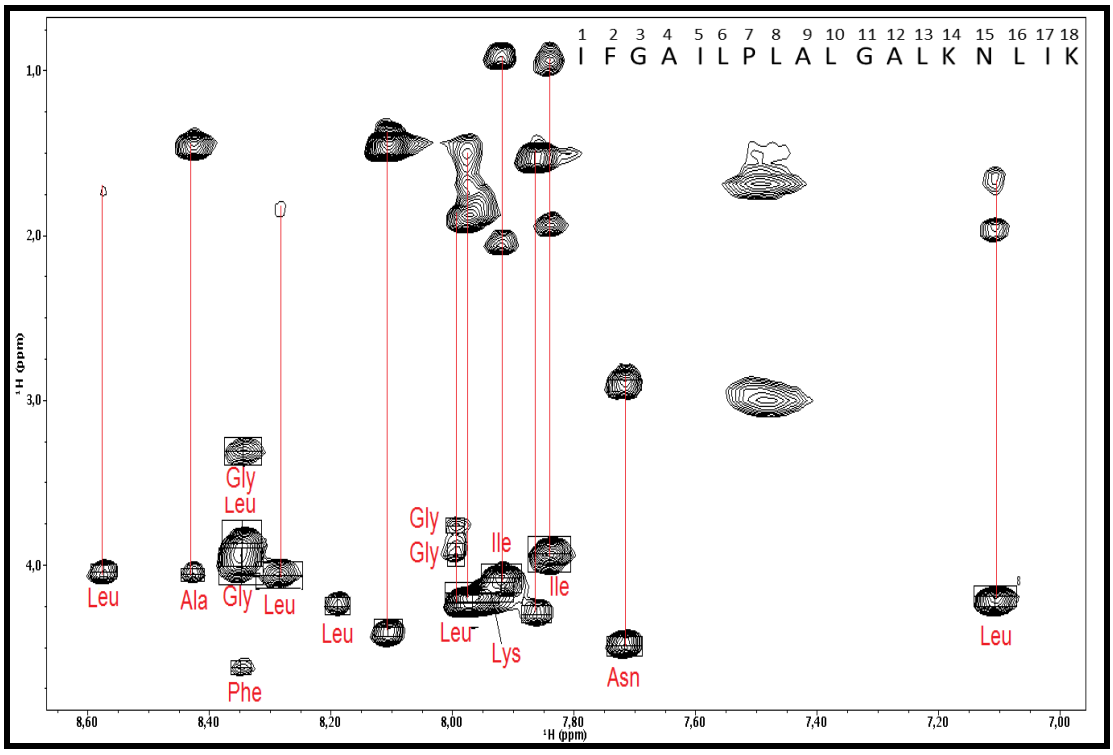


Figura 4. 20. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz, H_2O:D_2O – 9:1) para a hilina a1. Ampliação da região de H_N-H_α e cadeias laterais.

As correlações observadas no mapa de contornos de NOESY possibilitaram ordenar os sinais na sequência peptídica, conforme observado abaixo. Essa numeração representa à seguinte sequência de aminoácidos na cadeia peptídica: Ile-1 Phe-2 Gly-3 Ala-4 Ile-5 Lys-6 Pro-7 Leu-8 Ala-9 Leu-10 Gly-11 Ala-12 Leu-13 Lys-14 Asn-15 Leu-16 Ile-17 Lys-18.

As informações de conectividade foram obtidas através do experimento de NOESY que forneceu informações de acoplamentos de prótons que estão próximos a uma distância inferior a 5 Å.

Tabela 4. 4. Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H (ppm) para o peptídeo hilina a1 em solução micelar 100 mmol.L-SDS-d_{25}, a 25℃.

Resíduo	**δ_{NH}**	**$\delta_{H\alpha}$**	**$\delta_{H\beta}$**	**δ_{outros}**
Ile 1	8,34	3,84	1,8	γ 0,85; 1,28 δ 0,78
Phe 2	8,34	4,62	3,33 3,30	*δ* 7,27
Gly 3	8,35	4,01	-	-
Ala 4	8,10	4,38	1,48	-
Ile 5	7,92	4,08	2,06	*γ 1*,30; 0,95 δ 0,95
Lys 6	8,19	4,25	1,77 1,58	*γ* 1,61 δ 0,91
Pro 7	-	4,28	2,38 2,06	*γ* 2,09 *δ* 3,63
Leu 8	7,11	4,19	1,68 1,99	*δ* 0,93; 0,89
Ala 9	8,43	4,06	1,48	-
Leu 10	8,57	4,05	1,74	*γ* 1,68 *δ* 0,82; 0,87
Gly 11	7,99	3,94 3,78	-	-
Ala 12	7,86	4,30	1,53	-
Leu 13	8,28	4,07	1,82 1,66	*δ* 0,92; 0,99
Lys 14	8,34	3,86	1,89 1,90	*γ* 1,38 *δ* 1,68 *ε* 2,96; 7,49
Asn 15	7,72	4,49	2,93 2,88	*δ* 7,62 6,85
Leu16	7,96	4,19	1,69 1,88	*γ*1,68 *δ* 0,95 0,90
Ile 17	7,84	3,94	1,95	*γ* 0,93 1,27 *δ* 0,86
Lys 18	7,95	4,23	1,87 1,82	*γ* 1,49 *δ* 1,68 *ε* 3,01; 7,77

A determinação da estrutura secundaria de forma rápida e simples foi realizada pelo método do índice de deslocamento químico (CSI) (Wishart,

1992). A Figura 4.21 prevê a estrutura secundária da cadeia principal em α-hélice entre os resíduos Leu-6 e Leu-16.

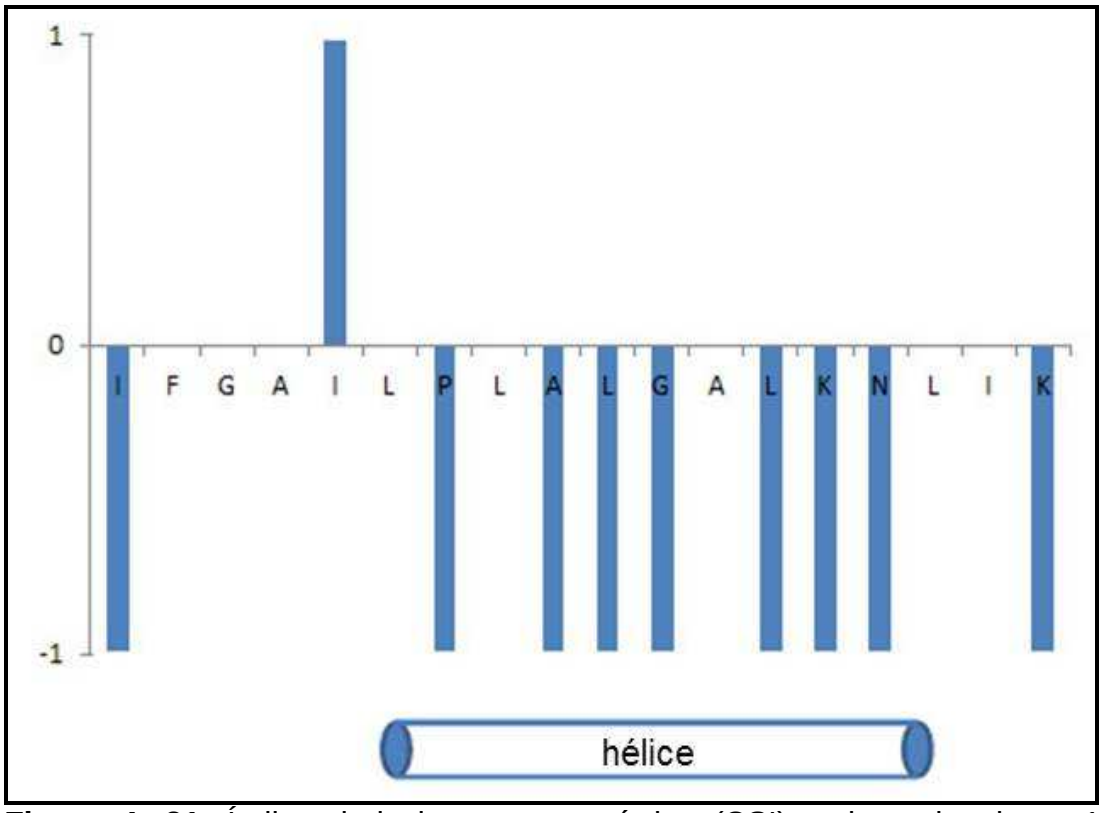


Figura 4. 21. Índice dedeslocamento químico (CSI), valores iguais a -1 indicam estruturação em hélice.

Os sinais de NOESY indicaram a presença de um segmento helicoidal devido a presença de NOEs inter-resíduais i,i+3 e i,i+4, para a maioria dos resíduos de aminoácidos. A Figura 4.22 ilustra as correlações de média distância de NOE observadas para a maioria dos resíduos, sugerindo um arranjo helicoidal bem definido.

Na análise dos dados da Figura 4.22, destaca-se inicialmente a não detecção de correlações envolvendo os sinais dos H_N dos resíduos 1 e 2, apresentando então um forte indício de que esses resíduos não estão muito bem estruturados. A extensão de hélice pôde ser prevista pela presença de hidrogênios amínicos, o painel sugere uma estruturação helicoidal entre os resíduos Gly-3 e Ile-17.

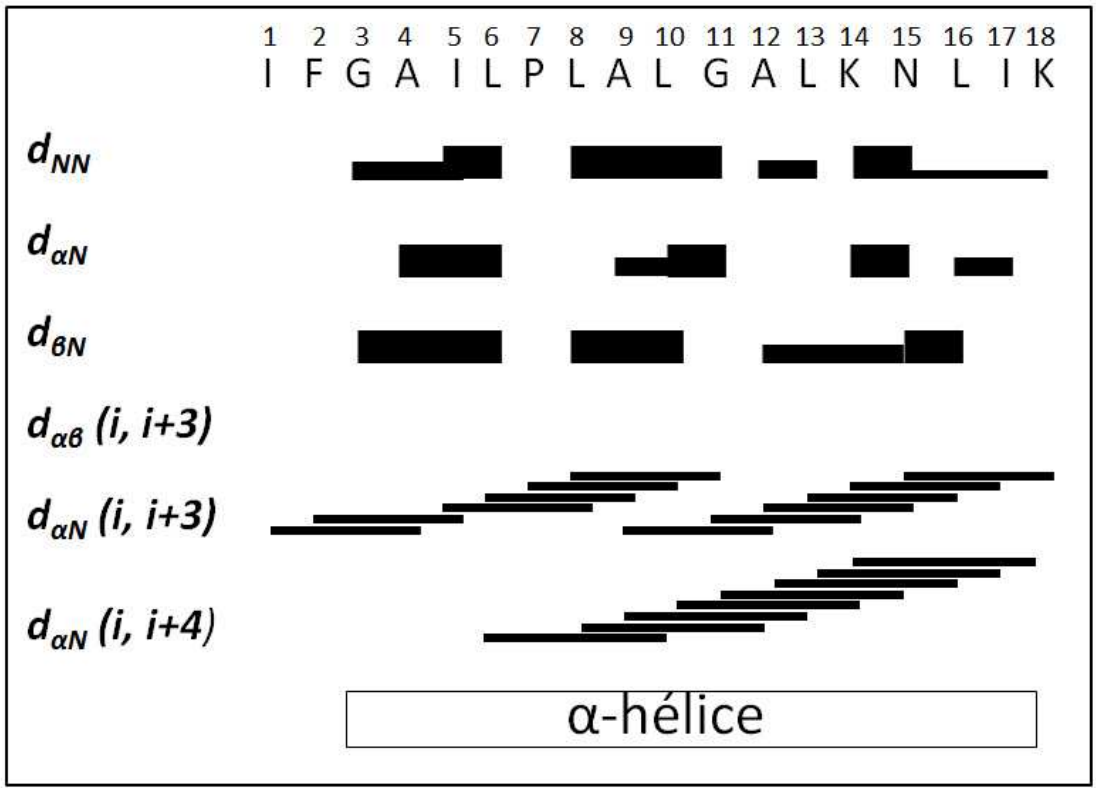


Figura 4. 22. Diagrama de conectividade de NOE inter-residuais, sequenciais e de médias distâncias. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama com linhas de diferentes espessuras, elas variam de acordo com as intensidades dos sinais, como: fraca, media e forte. As interações de media distância estão representadas pelas linhas finas $d_{\alpha N}$(i,i+3) e $d_{\alpha N}$(i,i+4), sendo que a extensão de hélice do peptídeo está indicada pelo retângulo na parte inferior do diagrama.

Na Figura 4.23, são observadas as atribuições das correlações dos resíduos de aminoácidos, correspondentes aos acoplamentos H_N-H_α de impressão digital.

As regiões do mapa de contornos de NOESY contendo NOEs de H_N-H_α (δ_2= 7-8,6 δ_1= 2,7-4,3), Figura 4.24, H_N-H_N (δ_2= 7,5-8,7 δ_1= 7,6-8,8), e cadeias laterais (δ_2= 7,5-8,7 δ_1= 0,8-3,2), forneceram informações a respeito da estrutura do peptídeo. As numerações acima dos sinais de NOESY equivalem às correlações encontradas de conectividade através do espaço de prótons próximos espacialmente.

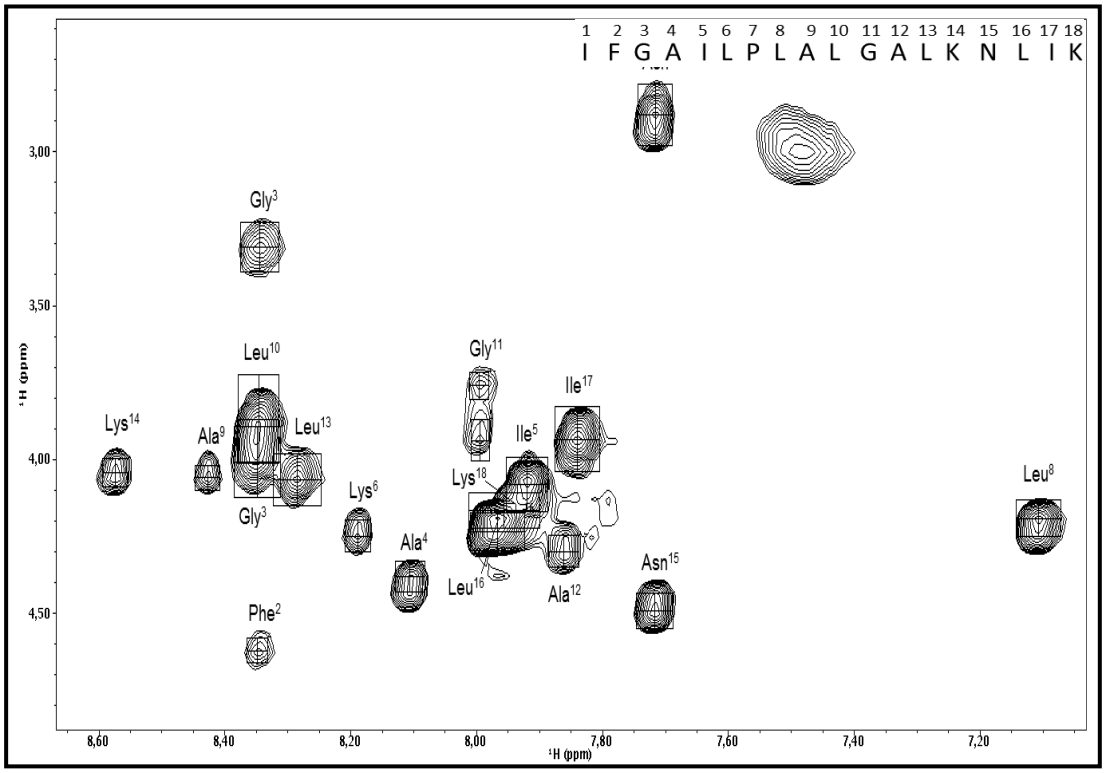


Figura 4. 23. Mapa de contornos de TOCSY (500 MHz). Região de H_N e H_α ampliada da hilina a1 em solução micelar de SDS-d_{25} 100 mmol.L^{-1}.

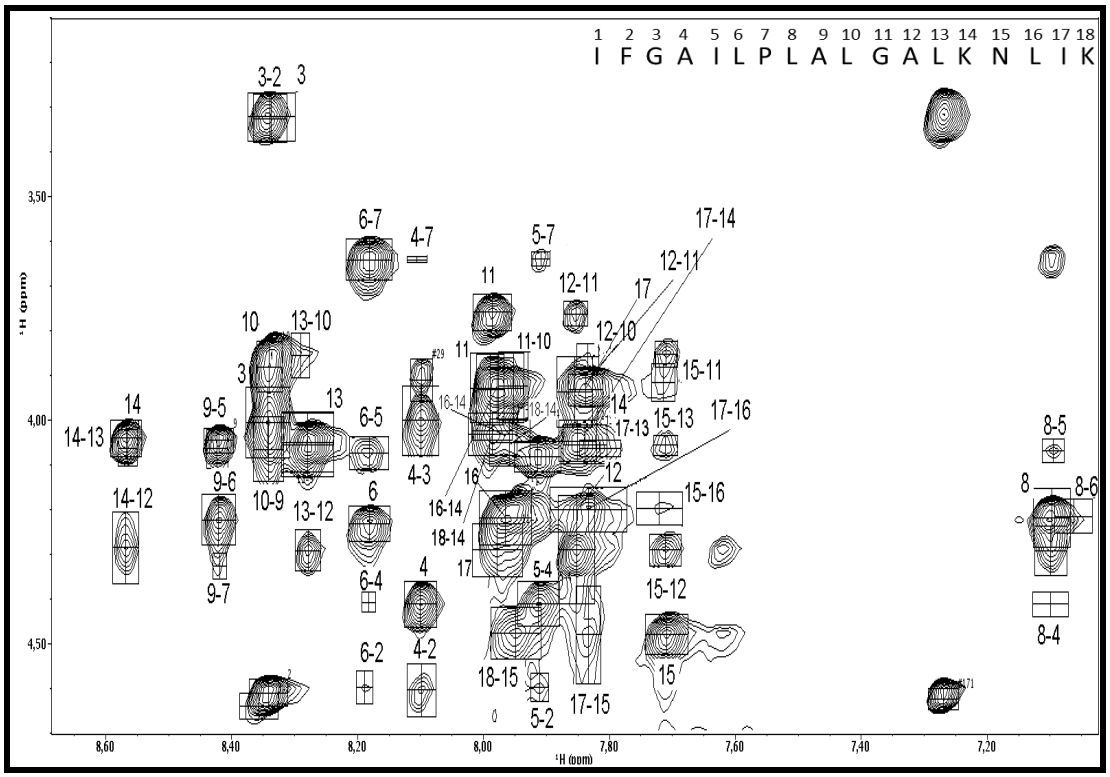


Figura 4. 24. Mapa de contornos de NOESY (500 MHz). Região de H_N-H_α ampliada correspondente ao peptídeo hilina a1 em solução micelar 100 mmol.L^{-1} de SDS-d_{25}.

Vale ressaltar que nos experimentos de RMN realizados para o peptídeo hilina a1, o tampão fosfato pode ter gerado interferências nos espectros, pois a tendência do fosfato é competir com o peptídeo pela micela, aumentando assim a dinâmica do peptídeo com o meio, ora micela, ora solução. Portanto sem o tampão fostato tem-se o peptídeo totalmente imerso na micela e sem ambiguidades de sinais, permitindo assim melhor determinação estrutural. Outro fator também importante, para melhorar a resolução dos experimentos, seria utilizar um meio mimético de TFE para melhor visualização da região de H_N-H_N.

4.2.3. Análise estrutural – hilina a1

A partir do volume dos sinais de NOE, foram obtidas as faixas de distâncias para cada sinal. Em posse desses dados construiu-se uma Tabela de restrições. A análise Estatística das restrições utilizadas está apresentada na Tabela 4.5. Utilizou-se um conjunto de 179 restrições de distância para o cálculo das estruturas do peptídeo hilina a1, resultando em uma média final de 9,9 por resíduo. Após certificada a presença da estrutura α-hélice, 22 restrições referentes à ligação de hidrogênio foram adicionadas.

Tabela 4. 5. Análise estatística das 20 estruturas do peptídeo hilina a1.

Restrições utilizadas	179
Intra-residuos	60
Sequencial	51
Média distância (1<|i-j|<5)	46
Ligação de hidrogênio	22

4.2.4. Estruturas calculadas para o peptídeo hilina a1

A estrutura calculada para o peptídeo hilina a1 é bem definida na região de α-hélice, entre resíduos Ile-5 a Ile-17, como evidenciado pela Figura 4.25 que mostra a superposição dos 20 modelos de menor energia. A extremidade N-terminal da estrutura não apresenta boa sobreposição devido a esses resíduos de aminoácidos não se apresentarem estruturados em α-helice, como já era esperado pelo painel de NOE.

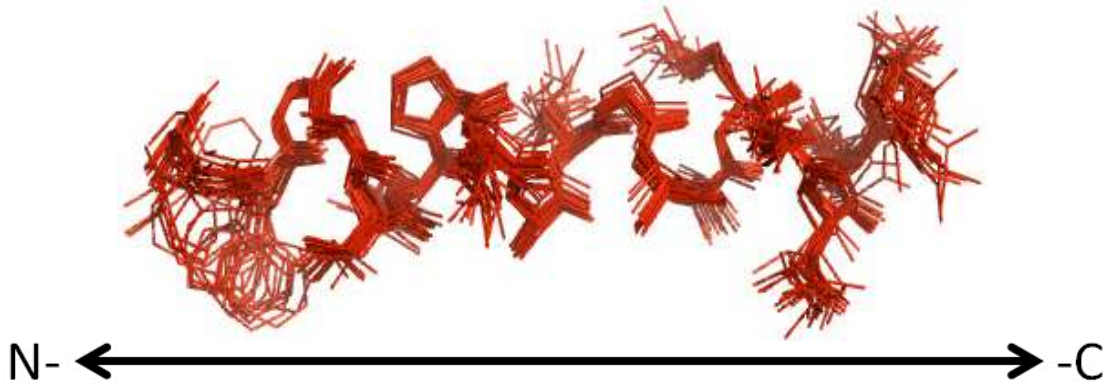


Figura 4. 25. Sobreposição da família de vinte estruturas de menor energia, os hidrogênios foram omitidos para melhor visualização.

A Figura 4.26 representa a estrutura de menor energia do conjunto de 20 estruturas. Pode-se observar que o peptídeo na presença de micelas de SDS-d_{25} apresenta uma α-hélice regular entre os resíduos Ile^{5}-Ile^{17}.

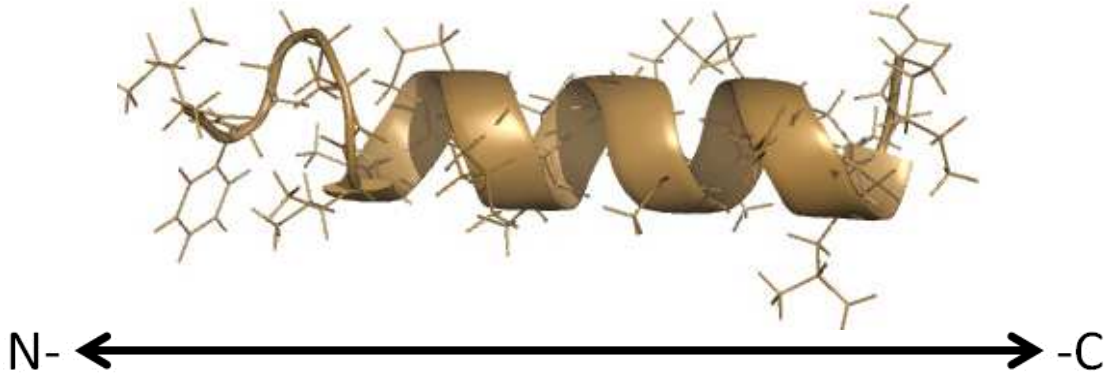


Figura 4. 26. Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo hilina a1 em presença de micelas de SDS-d_{25}

As estruturas obtidas nos cálculos estruturais concordam com as estruturas esperadas a partir das análises de chemical shift index e diagrama de conectividade realizadas no tópico 4.2.2. A Figura 4.26 mostra a tendência na formação de hélice iniciando a partir do resíduo Gly-3 como indicado no painel de NOE e a estruturação em hélice a partir do resíduo Ile-5 como esperado pelo CSI.

4.2.5. Mínimos de desvio médio quadrático (RMSD)

As 20 estruturas com menor energia foram analisadas por meio do programa PyMOL (DeLano, 2002). A sobreposição da cadeia principal forneceu valores individuais de desvio médio quadrático em relação à estrutura de menor energia. A média RMSD das 20 estruturas para o peptídeo hilina a1 (Tabela 4.6) mostrou que as estruturas obtidas para o peptídeo apresentam boa geometria, porém quando se alinhou apenas a região estruturada em α-helice este valor diminuiu bastante evidencando que as cadeias laterais estão com pouca mobilidade principalmente no centro da estrutura, como pode ser observado pela sobreposição as três estruturas de menor energia (Figura 4.22).

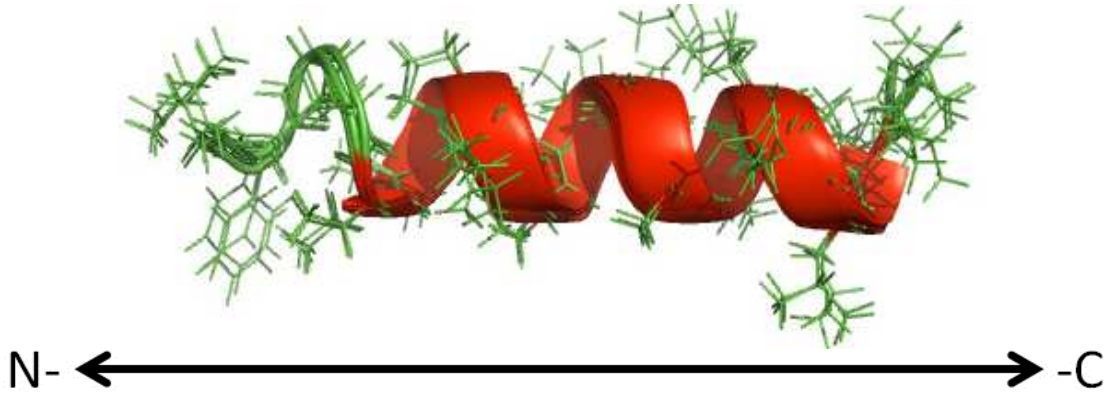


Figura 4. 27. Sobreposição das três estruturas de menor energia.

A Tabela 4.6 apresenta os valores de desvio médio quadrático para a cadeia principal do resíduo 1 ao 18 e para a região da cadeia principal em α-hélice, entre os resíduos 3 e 24, respectivamente.

Tabela 4. 6. Estatística dos desvios médios quadráticos

RMSD	Á
Cadeia principal (resíduos 1-18)	0,78 ± 0,23
Cadeia principal (resíduos 5-17)	0,35 ± 0,13

4.2.6. Ramachandran

Os ângulos ϕ e ψ do peptídeo hilina a1 foram avaliados para se determinar a qualidade das estruturas. Para isso, foram analisados os 20 diagramas de Ramachandran de cada estrutura que compõem a família de

estruturas do peptídeo hilina a1. A média dos 20 diagramas mostra que 85,4% dos ângulos ϕ e ψ encontram-se em regiões mais favorecidas de α-hélice, 14,6% em regiões permitidas e 0,0% em regiões menos permitidas e proibidas. A Figura 4.28 apresenta a sobreposição dos diagramas de Ramachandran das 20 estruturas de menor energia do peptídeo hilina a1.

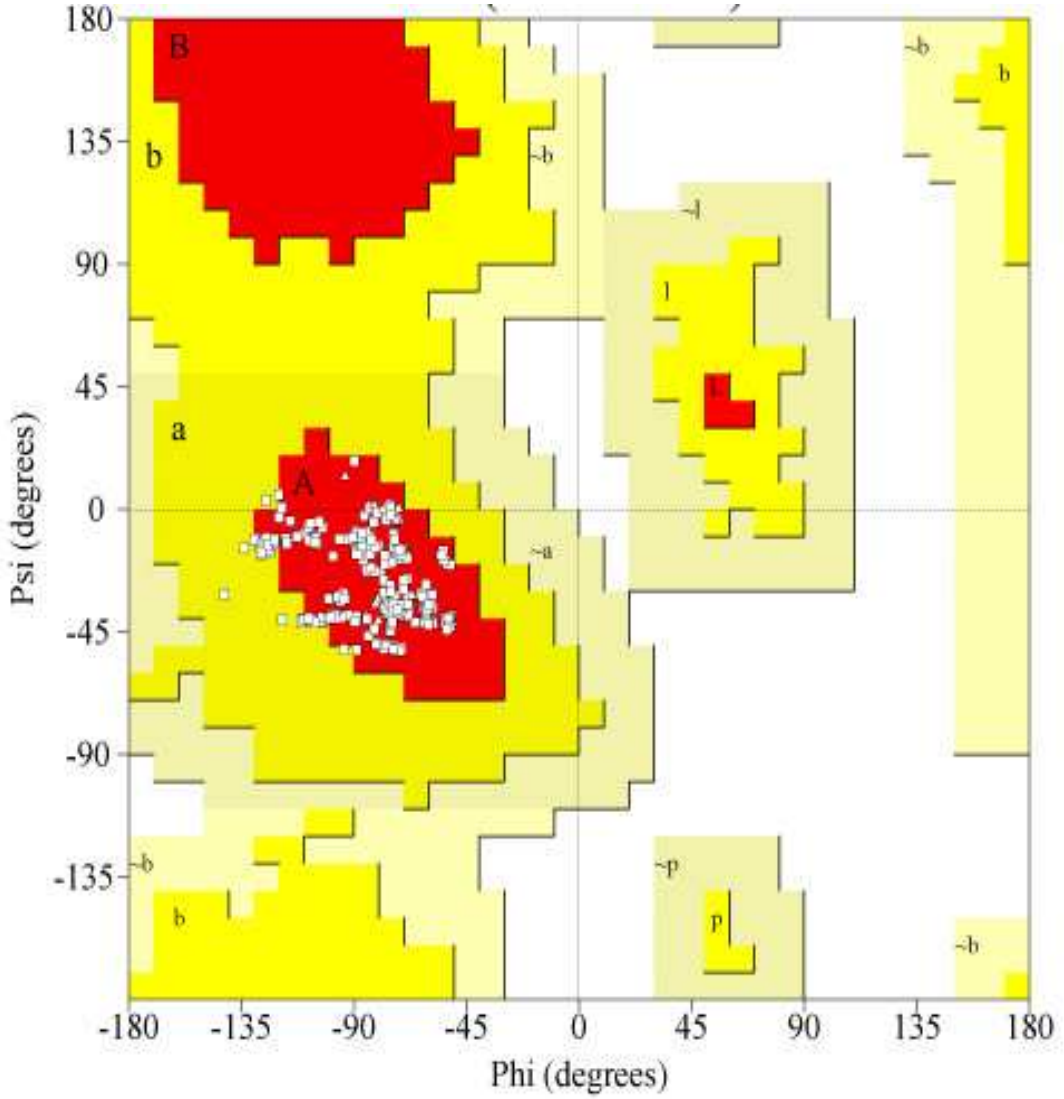


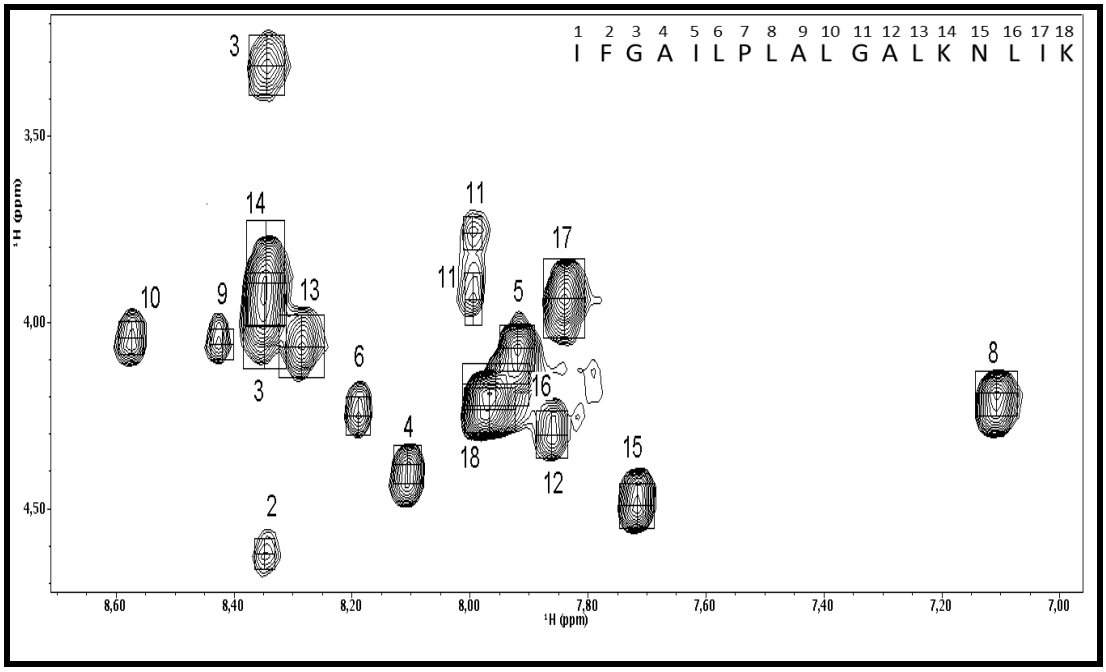
Figura 4. 28. Hilina a1 - Sobreposição dos 20 diagramas de Ramachandran.

A análise dos diagramas de Ramachandran mostra que as estruturas obtidas apresentam um bom modelo, pois, não apresentam resíduos na região desfavorecida. A maior parte dos resíduos está localizada em regiões mais favorecidas. A estrutura de α-hélice fica evidenciada no gráfico de Ramachandran, devido à maioria dos resíduos se localizarem na região característica de α-hélice, ϕ de -60^0 e ψ de -40^0 (Hovmöller, 2002).

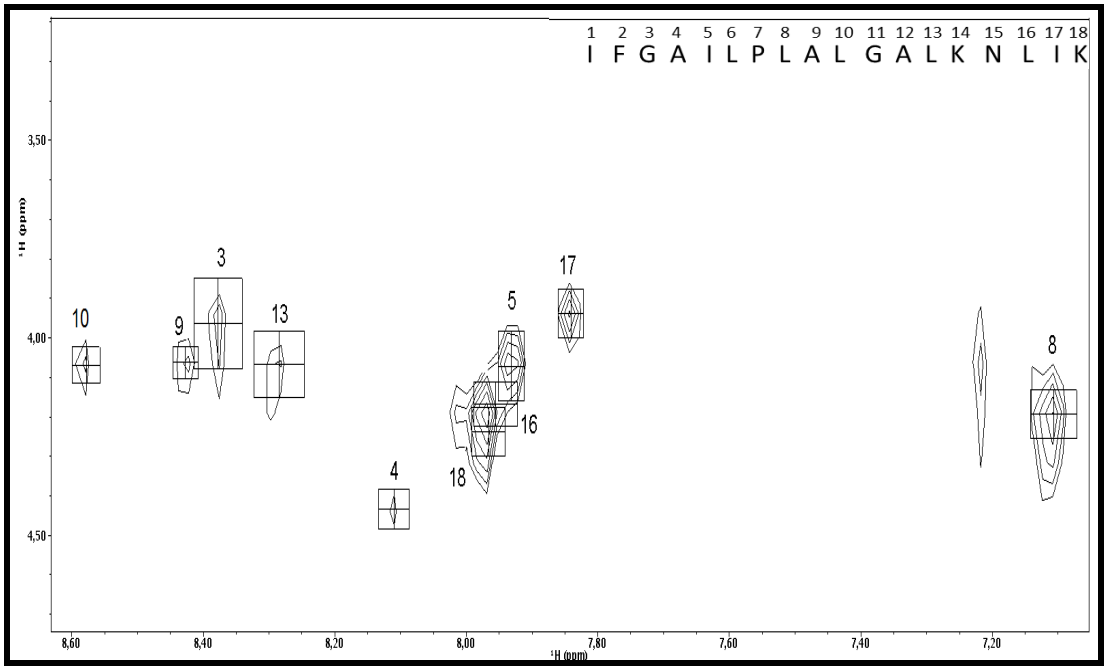
4.2.7. Troca Próton-Deutério para a hilina a1

Observando a região H_N-H_α (Figura 4.29 a, b, c e d) dos Mapas de contornos de TOCSY para peptídeo hilina a1 observa-se a troca de hidrogênio por deutério dos vários resíduos de aminoácidos ao longo das 3 horas de experimento. Esta troca relativamente rápida foi favorecida pela maior acessibilidade do solvente aos resíduos de aminoácidos.

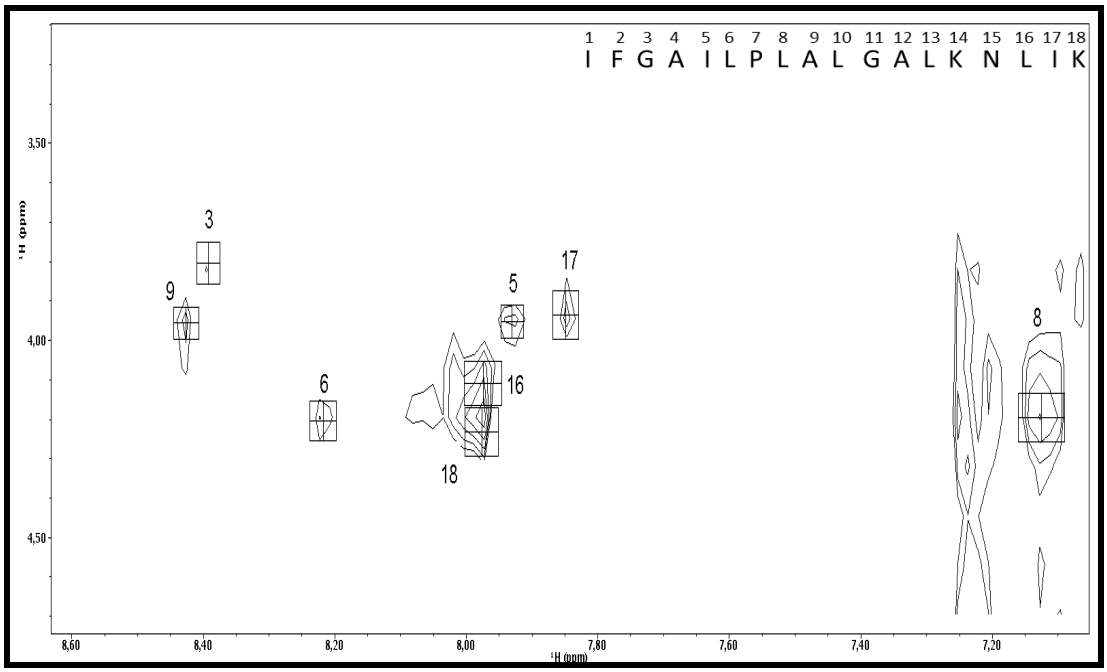
a)



b)



c)



d)

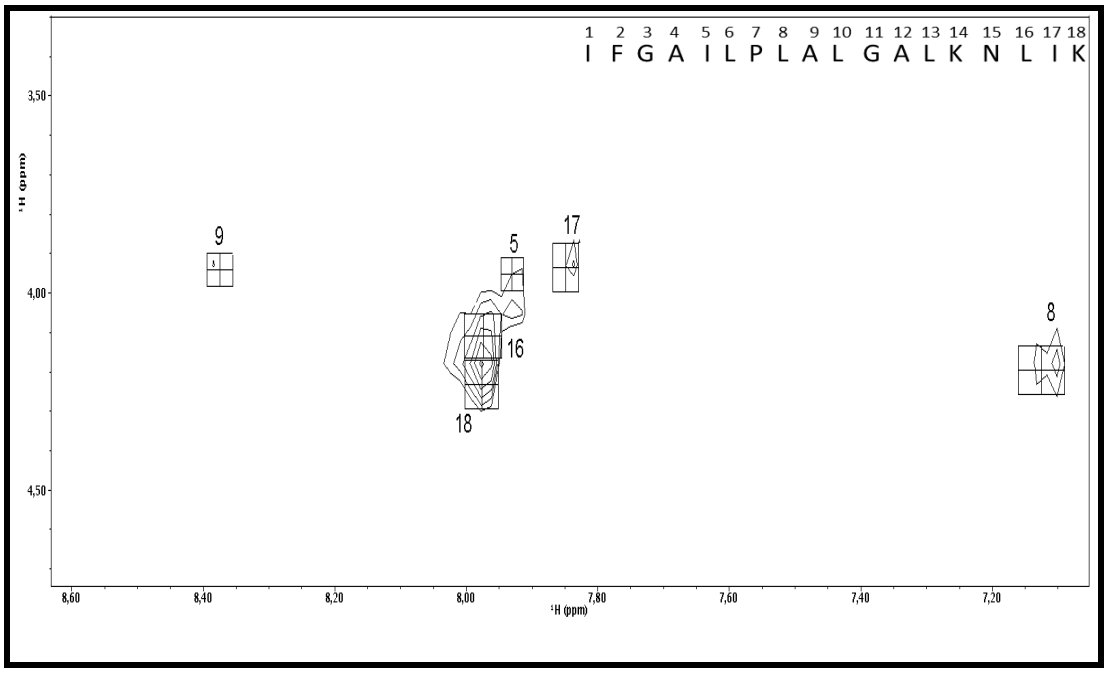


Figura 4. 29. Mapas de contornos de TOCSY da região de impressão digital (N_H-H_α) do peptídeo hilina a1 em SDS-d_{25}, a 25 ℃. a) antes da adição de D_2O, b) 2 horas, c) 3 horas e d) 4 horas após a adição de D_2O.

Após 3 horas de experimento houve a atenuação dos sinais dos aminoácidos Phe-2 Ala-4 Leu-10 Gly-11 Ala-12 Leu-13 Lys-14 e Asn-15 (Figura 4.30). A não atenuação dos sinais Ile-5, Ala-9 e Ile-17 se deve ao

fato de que esses aminoácidos encontravam-se na face hidrofóbica e os resíduos Leu-8 e Lys 18 estavam na interface de interação entre a face hidrofóbica e a hidrofílica da α-hélice anfipática. Após 4 horas de experimento haviam sido atenuados completamente os sinais dos resíduos de aminoácidos Phe^{2} Gly^{3} Ala^{4} Lys^{6} Leu^{10} Gly^{11} Ala^{12} Leu^{13} Lys^{14} Asn^{15}.

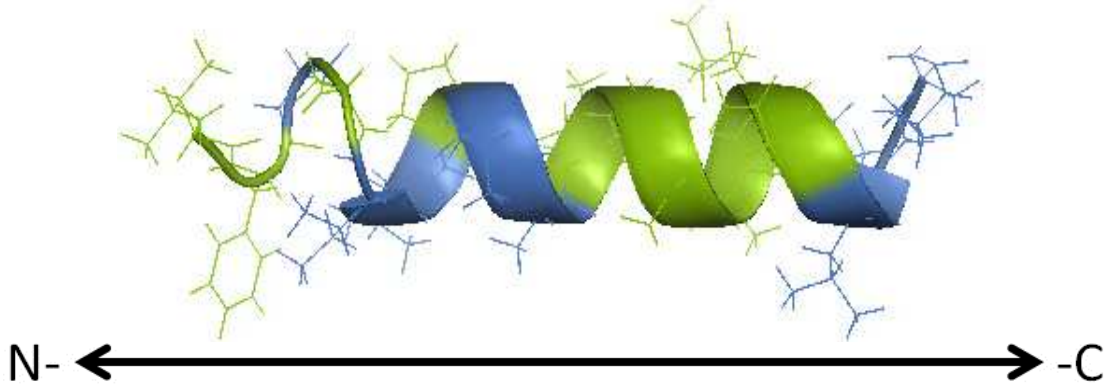


Figura 4. 30. Hilina a1 - Estrutura de menor energia com os resíduos que sofreram troca H/D em azul e os resíduos que não trocaram em verde, após 3 horas de experimento.

4.2.8. Efeitos eletrostáticos

A estrutura helicoidal da hilina a1 inclui dois resíduos de aminoácidos carregados positivamente, devido aos resíduos alcalinos Lys^{14} e Lys^{18}, e nenhum carregado negativamente.

Para se observar a contribuição do caráter catiônico do peptideo hilina a1 na interação com o meio mimetico (Bechinger, 2004), os resíduos catiônicos foram destacados na cor rosa (Figura 4.31).

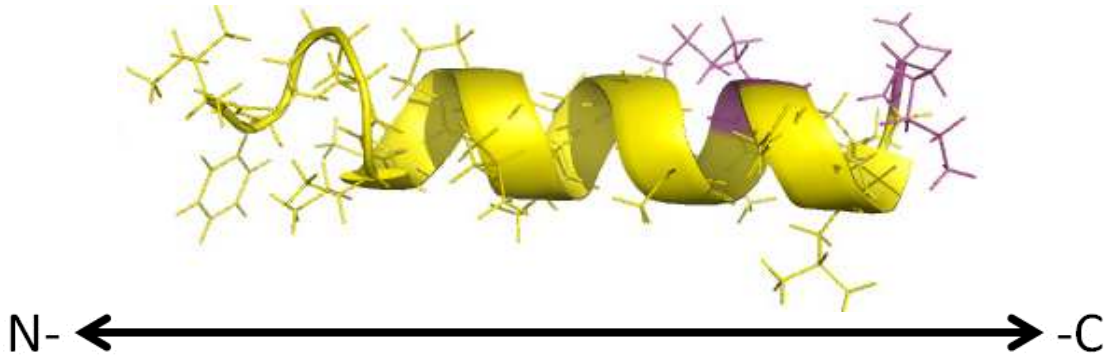


Figura 4. 31. Hilina a1 – Localização dos 4 resíduos catiônicos (rosa) na estrutura helicoidal.

Os resíduos catiônicos não se localizaram na face hidrofóbica da estrutura. Portanto sugere-se que atividade hemolítica deste peptídeo não está ligada a cationicidade. Os efeitos eletrostáticos destes resíduos não se

mostraram importantes na estabilização conformacional, para a interação do peptídio com a superfície da micela de SDS-d_{25}.

4.2.9. Anfipaticidade

O peptídeo hilina a1 quando na presença do meio mimético sofreu mudanças conformacionais adotando uma estrutura helicoidal anfipática. A Figura 4.32 mostra a projeção de Edmundson para o peptídeo hilina a1. Os cálculos de momento hidrofobico relativo indicou que a estrutura do peptídeo apresenta-se com aproximadamente 51% da estrutura em α-hélice anfipática.

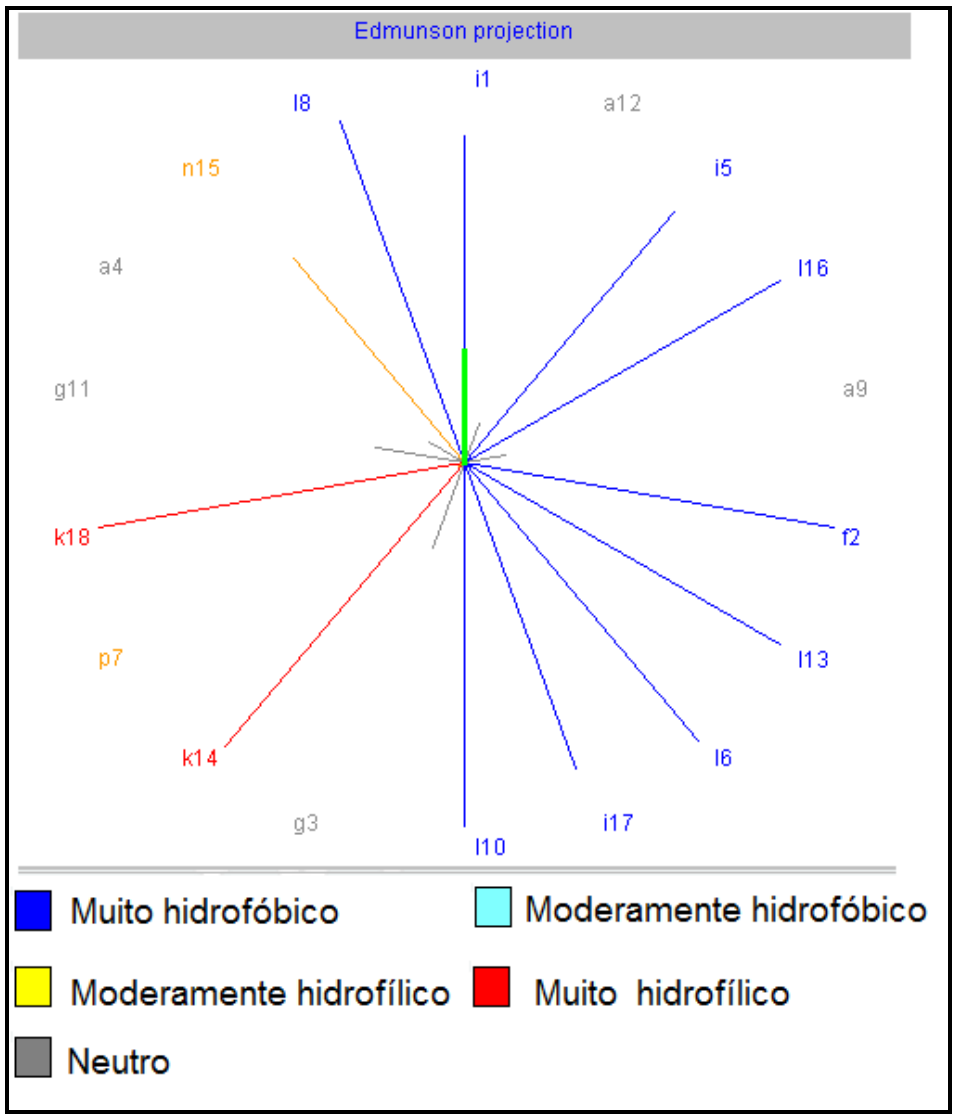


Figura 4. 32. Projeção de Edmundson para o peptídeo ocellatina-P1G16. O tamanho das barras é proporcional ao valor do índice de hidrofobicidade (Hi) do resíduo.

Os resultados obtidos concordam com os encontrados por Castro e colaboradores (2009), que atribui a atividade hemolítica desse peptídeo à sua conformação anfipática.

Todos os resíduos hidrofóbicos (Ile-1 Phe-2 Ile-5 Lys-6 Leu-8 Leu-10 Leu-13 Leu-16 e Ile-17) foram assinalados na estrutura calculada em verde (Figura 4.33), eles apresentaram-se localizados na face hidrofóbica de interação do peptídeo com a micela, estando também os resíduos neutros Ala-9 e Ala-12 na face de interação hidrofóbica.

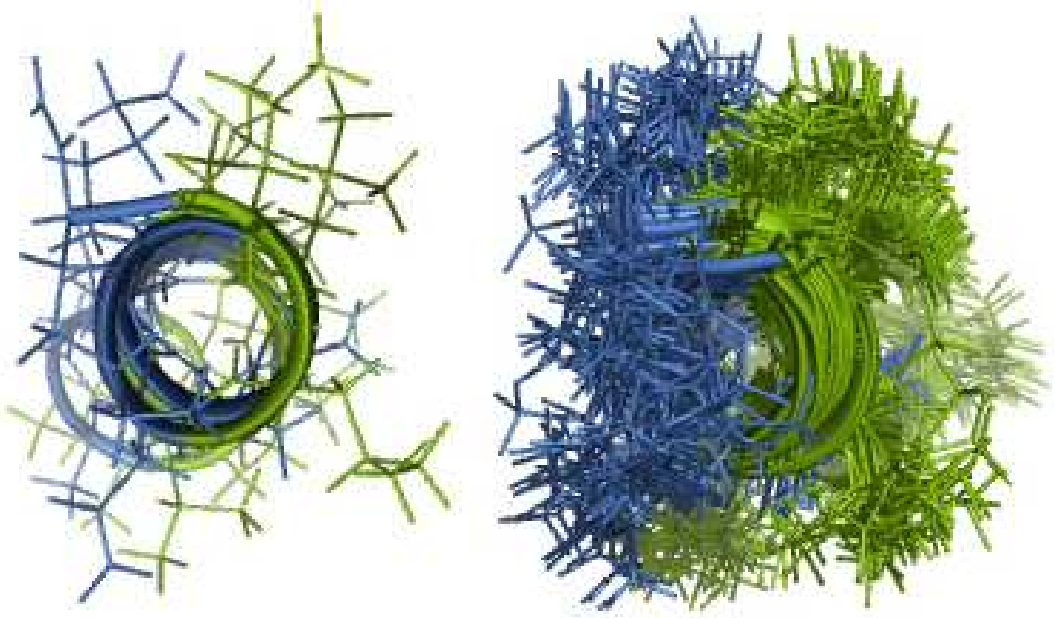


Figura 4. 33. Demonstração frontal a direita da estrutura de menor energia e a direita das 20 estruturas sobrepostas. Os resíduos hidrofóbicos foram destacados em azul e os hidrofílicos em verde, a região C-terminal sai do plano.

4.2.10. Modelo proposto para o peptídeo hilina a1

Os detalhes moleculares de como o peptídeo hilina a1 interage com as micelas de SDS-d_{25}, podem ser observados a partir da representação da Figura 4.34. Propõe-se que a região em azul (apolar) é a face da estrutura que interage com a superfície da micela, e a região em verde (polar) a face que está exposta ao solvente.

A análise do mapa de contornos de TOCSY (Figura 4.29) evidenciou que os resíduos Ile-5, Ala-9 e Ile-17 não estão expostos ao solvente,

corroborando com a análise de anfipaticidade. Portanto, estes resíduos estão localizados na face hidrofóbica, demostrando assim estarem orientados paralelamente à superfície da micela de SDS-d_{25}. A Figura 4.34 apresenta um modelo ilustrativo da forma de interação do peptídeo com a micela.

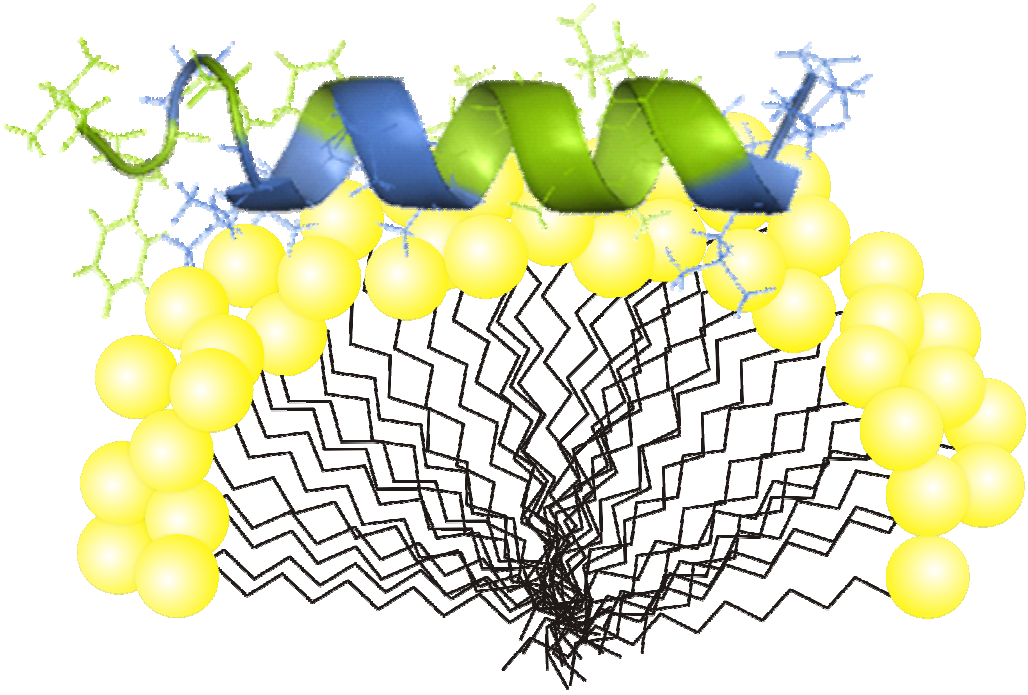


Figura 4. 34. Modelo proposto para a orientação do peptídeo hilina a1 na superfície das micelas de SDS-d_{25}, em azul estão destacados os resíduos que não sofreram troca H/D e em verde resíduos que trocaram.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos possibilitaram a compreensão do comportamento dos peptídeos em ambientes que mimetizaram as condições de membranas biológicas, bem como a localização de seus sítios ativos.

Os estudos estruturais realizados através da espectroscopia de RMN mostraram que os peptídeos ocellatina-P1G16 e hilina a1 apresentam-se em α-hélice entre os resíduos Leu-3 a Lys-24 e Ile-5 a Ile-17, respectivamente. O peptídeo ocellatina-P1G16 apresentou 36% de sua estrutura em α-hélice anfipática e o hilina a1 51%.

A espectroscopia de CD mostrou que mesmo com o aumento da temperatura os peptídeos não perderam totalmente sua estruturação e que ambos apresentaram conformação máxima a temperatura de 25 ºC. Esta técnica indicou que o peptídeo ocellatina-P1G16 e hilina a1 apresentavam-se com 48% e 53%, respectivamente, de suas estruturas secundárias em α-hélice.

Os experimentos de troca H/D mostraram a rápida troca de hidrogênio por deutério, favorecida pela maior acessibilidade do solvente a determinados resíduos de aminoácidos. Propõe-se que ambos os peptídeos interagem paralelamente a superfície da micela de SDS.

A espectroscopia de RMN pôde apresentar a conformação das estruturas dos peptídeos em 72% de α-hélice para o peptídeo hilina a1 e 88% para ocellatina-P1G16, bem como a exata localização dos resíduos de aminoácidos e sítios ativos, na estrutura.

As análises de polaridade, anfipaticidade, interação eletrostática e troca H_2O/D_2O, confirmam o modelo proposto, pois apontaram a mesma face de interação dos peptídeos com a membrana. Essas características estruturais tornam os esses peptídeos candidatos promissores para o desenvolvimento de um novo composto antimicrobiano. Estes resultados possibilitam o desenvolvimento de derivados sintéticos modificados, com o objetivo de aumentar sua eficácia, seletividade e especificidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, J. J. Apoptosis: Target for novel drugs. Trends in Biotechnology. v.21, p.479–483, 2003.

Apponyi, M. A.; Pukala, T. L.; Brinkworth, C. S.; Maselli V. M.; Bowie , J. H.; Tyler, M. J.; Booker, G. W.; Wallace, J. C.; Carver, J. A.; Separovic, F.; Doyle, J. e Llewellyn, L. E. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. Peptides, v.25, p.1035–1054, 2004.

Arseniev, A. S.; Kondakov, V. I.; Maiorov, V. N. e Bystrov, V. F. (1984). NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I5A. Federation of European Biochemical Societies, v.165, n.1, p.57-62.

Asimov, I. Introduccion a la ciência. ll. Ciencias Biológicas.ed. Argentina, ed. Xixoxux. p.1-302, 1973.

Barra, D. e Simmaco, M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. Trends Biothecnol. v.13, p.205–209, 1995.

Bechinger, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, v.1462, p.157-183, 1999.

Bechinger, B. Structure and function of membrane-lytic peptides.Plant Sciences, v.23, n.3, p.271-292, 2004.

Bechinger, B. e Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides.Biochimica et Biophysica, v.1758, n.9, p.1529-1539, 2006.

Bhutia, S. K. e Maiti, T. K. Targeting tumors with peptides from natural sources.Trends Biotechnol.v.26, p.210–217, 2008.

Babakhani, A.; Gorfe, A. A.; Kim, J. E. e Mccammon, J. A. Thermodynamics of peptide insertion and aggregation in a lipid bilayer. The Journal of Physical Chemistry B, v.112, n.34, p.10528-10534, 2008.

Bordag, N. e Keller, S. α-Helical transmembrane peptides: A Divide and Conquer approach to membrane proteins. Chemistry and Physics of Lipids, v.163, p.1-26, 2010.

Brand, G. D*.;* Leite, J. R. S. A.; Mandel, S. M. S.; Mesquita, D. A.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Barbosa, E. A.; Vinecky, F., Martins, G. R.; Galasso, J. H.; Kuckelhaus, S. A. S.; Sampaio, R. N. R.; Furtado Jr, J. R.; Andrade, A. C.; Bloch Jr, C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis (*Amphibia) *Biochemical and Biophysical Research Communications. v.*347, p.739-746, 2006.

Braun, W.; Bösch, C. e Brown, L. R. Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, v.667, n.2, p.377-396, 1981.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors inbacteria? Nature Reviews Microbiology, v.3, p.238-250, 2005.

Brouwer, C. P. J. M.; Rahman, M. e Welling, M. M. Discovery and development of a synthetic peptide derived from lactoferrin for clinical use. Peptides, v.32, p.1953–1963, 2011.

Brünger, A. T.; Adams, P. D. e Rice, L. M. New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR.Structure, v.5, n.3, p.325-336, 1997.

Brünger, A. T.; Krukowski, A. e Erickson, J. W. Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing".Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography, v.46, p.585-593, 1990.

Brünger, A. T., Kuriyan, J. e Karplus, M. Crystallographic R Factor Refinement by Molecular Dynamics, Science, 235, 458-460, 1987.

Castro M. S.; Ferreira, T. C. G.; Cilli, E. M.; Crusca, E. J.; Giannini, M. J. M.; Sebben, A.; Ricart, C. A. O.; Sousa, M. V. e Fontes, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (spotted treefrog), v.30, p.291-296, 2009.

Claridge, T. D. W.High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry Chemistry. University of Oxford Second Edition v.27, 2009, p. 304.

Clarke, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. Biol. Rev., v.72, p.365-379, 1997.

Chen, Y. H., Yang, J. T. e Chau, K. H. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular diccroism. J. Mol. Biol., 138, 149-178, 1974.

Chi, Y., Kumar, T. K. S., Kathir, K. M. e Lin, D. Investigation of the structural stability of the human acid fibroblast growth factor by hydrogen-deuterium exchange. Biochemistry, v.4, p.15350-15359, 2002.

Conlon, J. M.; Kolodziejek, J. e Nowotny, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential sourse of new therapeutic agents. Biochimica et Biophysica Acta. v.1696, p.1–14, 2004.

Conlon, J. M.; Al-Ghaferi N., Abraham, B. e Leprince, J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. Methods, v.42, p.349–357, 2007.

Conlon J. M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus* peptides v.29 p.1631–1632, 2008.

Crusca, E.; Rezende, A. A.; MARCHETTO, R. ; Mendes G.; Maria J. S.; FONTES, W. ; Castro, M. S. e Cilli, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. Biopolymers, v.96, p.41-48, 2011.

Csordas, A. e Michl, H. Primary structure of two oligopeptides of the toxin of Bombinavariegata L. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, v.7, n.2, p.103-108, 1969.

Dathe, M. e Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. BiochimBiophysActav.1462, p.71–8,1999.

M. Dathe, M.; Schu«mann, T.; Wieprecht, A.; Winkler, M.; Beyermann, E.; Kause, K.; Matsuzaki, O. e Murase, M. B. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranesBiochemistry v.35, p.12612-12622, 1996.

Deber, C. M. e LI, S. C. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. Biopolymers, v.37, p.295-318,1995.

DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphic on world wide web http:s system, 2002 on world wide web http://www.pymol.org

Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J. e Bax, A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J. Biomol. NMR.v.6, p.277-293, 1995.

Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5, 2011.http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/ American Museum of Natural History, New York, USA (acesso em 30/01/2011).

Gesell, J., M. Zasloff, and S. J. Opella. Two-dimensional 1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-

helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. J. Biomol. NMR v.9, p.127–135, 1997.

Giangaspero, A.; Sandri, L. e Tossi, A. Amphipathicα-helicalpeptides. Asystematic study of the effects of structural and physical properties onbiological activity. Eur. J. Biochem. V.268, p.5589-5600, 2001.

Gottler, L. M. e Ramamoorthy, A. Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan-a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. Biochim Biophys Acta, v.1788, p.1680-6, 2009.

Griesinger, C.; Sørensen, O. W. e Ernst, R. R. Two-dimensional correlation of connected NMR transitions. Journal of the American Chemical Society, v.107, n.22, p.6394-6396, 1985.

Güntert, P.; Mumenthaler, C. e Wüthrich, K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program Dyana. J. Mol. Biol., v.273, p.283-298, 1998.

Hancock, R. E. W. Peptide antibiotics. v.349, p.418-422, 1997

Hancock, R. E. W. e Chapple, D. S. Peptides Antibiotics.Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.43, p.1317–1323, 1999.

Hancock, R. E. W.; Scott e M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.97, n.16, p.8856-8861, 2000.

Harvey, L. e Arnold, B. Biologia celular e molecular. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Hedges, S. B. e Heinicke, M.P. Molecular phylogeny and biogeographyof West Indian frogs of the genus *Leptodactylus* (Anura,Leptodactylidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, v.44, p.308–314, 2007.

Hovmöller, S.; Zhou, T. e Ohlson, T. Conformations of amino acids in proteins. Acta Crystallographica, v.58, p.768-776 ,2002.

Jenssen, H.; Hamill, P. e Hancock, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews, v.19, n.3, p.491-511, 2006.

Johnson, B. A. e Blevins, R. A.NMR View: a computer program for thevisualization and analysis of NMR data. Journal of Biomolecular NMR, v.4, n.5,p.603-614, 1994.

Karplus, M. Contact electron-*spin* coupling of nuclear magnetic moments. Journal of Chemical Physics, v.30, p.11–16, 1959.

Kelly, S. M. e Price, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function Price Division of Biochemistry and Molecular Biology. Protein and Peptide Science, v.1, n. 4, p.349-384, 2000.

Kelly, S. M.; Jess, T. J. e Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism.BiochimicaetBiophysica (BBA)-ProteinsandProteomics, v.1751, n.2, p.119-139, 2005.

Khandelia, H. e Kaznessis, Y. N. Molecular dynamics investigation of the influence of anionic and zwitterionic interfaces on antimicrobial peptides' structure: Implications for peptide toxicity and activity peptides, v.27, p.1192 – 1200, 2006.

Khandelia, H.; Ipsen, J. H. e Mouritsen, O. G. The impact of peptides on lipid membranes. Biochimica et Biophysica Acta, v.1778 p.1528–1536, 2008.

Kim, S.; Kim, S. S.; Bang, Y. J.; Kim, S. J. e Lee, B. J. In vitro activities of native and designed peptide antibiotics against drug sensitive and resistant tumor cell lines. Peptides.v.24, p.945–953, 2003.

King, J. D.; Ghaferi, N. A.; Abraham, B.; Sonnevend, A.; Leprince, J.; Nielsen, P. F. e Conlon, J. M. Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus* pentadactylus. Comparative Biochemistry and Physiology, v.141, p.393–397, 2005.

Kleywegt, G. J. e Jones, T. A. Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. Structure, v.4, n.12, p.1395–1400, 1996.

Kline, A. D.; Braun, W. e Wüthrich, K. Studies by 1H nuclear magneticresonance and distance geometry of the solution conformation of the [alpha]-amylaseinhibitor Tendamistat. Journal of Molecular Biology, v.189, n.2, p.377-382, 1986.

Krittanai, C. e Johnson, W. C. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. Analytical Biochemistry, v.253, n.1, p.57-64, 1997.

Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S. e Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemicalqualitynof protein structures. J. Appl. Cryst. V.26, p.283–291, 1993.

Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A. C.; Macarthur, M. W.; Kaptein, R. e Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of proteinstructures solved by NMR. Journal of Biomolecular NMR, v.8, n.4, p.477-486, 1996.

Lehmann, J.; Retz, M; Sidhu, S. S.; Suttmann, H.; Paulsen M. S. F.; Harder, J.; Unteregger, G. e Stöckle, M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. European Urology. v.50, p.141–147, 2006.

Lehninger, A. L. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Savier, 1985.

Leite, J. R. S. A.; Silvac, L. P.; Rodriguesa, M. I. S.; Pratesa, M. V. Branda, G. D.; Lacavac, B. M.; Azevedoc, R. B.; Boccad, A. L.; Albuquerquee, S. e Bloch, C. J. Phylloseptins: a novel class of antibacterial and anti- protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. Peptides,v.26, p.565–573, 2005.

Leuschner, C. e Hansel, W.Targeting breast and prostate cancers through their hormone receptors. Biol. of Reproduction, v.73, p.860–865, 2005.

Libério, M. S.; Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Cilli, E. M.; Zanotta, L. C.; Nascimento, A. C.; Sousa, M. B.; Pires, O. R. P.; Fontes, W. e Castro, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. Amino Acids, v.40, p.51–59, 2009.

Libério M. S. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactyluslabyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases, Brasília, 2008. 111p.Universidade de Brasília.

Libério, M. S.; Joanitti, G. A.; Azevedo, R. B.; Cilli, E. M.; Zanotta, L. C.; Nascimento, A. C.; Sousa, M. V.; Pires, O. R. J; Fontes, W. e Castro, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. Amino Acids, v.40, p.51–59, 2011.

Lorin, C.; Saidi, H.; Belaid, A.; Zairi, A.; Baleux, F.; Hocini, H.; Bélec, L.; Hani, K. e Tangy, F. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro". Virology, v.334, n.2, p.264-275, 2005.

Mandard, N., P. Sodano, H. Labbe, J. M. Bonmatin, P. Bulet, C. Hetru, M. Ptak, and F. Vovelle. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensionalnuclear magnetic resonance data. Eur. J. Biochem. v.256, p.404–410, 1998.

Marshall G. R.;Beusen D. D. e Nikiforovich G. V. Peptide Conformation Stability and Dynamics Peptidsynthesis, Structures, and Applications p.193-234, 1995

Matsuzaki,K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochimestry Biophysic Acta, v.1462, p.1–10, 1999.

Metzler, D.E. Biohemistry the chemical reactions of living cells, 2º ed., v.1, p.41-51, 2003.

Murphy, J. B. e Kies, M. W. Note on the spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochimica et Biophysica Acta, v.45, p.382-384, 1960.

Muniz, K. P. R.;Giaretta, A. A.; Silva, W. R. e Facure, K. G. Auto-ecologia de *Hypsiboas albopunctatus*(Anura, Hylidae) em área de Cerrado no sudeste do Brasil FacureIheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, v.98, n2, p.254-259, 2008.

Nascimento, A. C. C.; Fontes, W.; Sebben, A. e Castro, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. Protein and Peptide Letters, v.10, p.227–238, 2003.

Nilges, M.; Clore, G. M. e Gronenborn, A. M. Determination of threedimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms Circumventing problems associated with folding". Federation of European Biochemical Societies Letters, v.239, n.1, p.129- 136, 1988.

Nyholm, T. K.; Ozdirekcan, S. e Killian, J. A. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. Biochemistry, v.46, n.6, p.1457-1465, 2007.

Papo, N. e Shai, Y.Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? Peptides, v.24, n.11, p.1-11, 2003.

Papo, N. e Shai, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment.Cell. Mol. Life Sci. 62:784–790, 2005.

Powers, J. P. e Hancock, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides.v.24, p.1681–1691, 2003.

Powers, J. P., A. Rozek, and R. E. Hancock. Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin. Biochim. Biophys. Acta v.1698, p.239–250, 2004.

Pukala, T. L. *et al.* Host-defense peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. Nat. Prod. Rep. v.23, p.368–393, 2006.

Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C. e Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain conFigurations. J. MolBiol, v.7, p.95–99, 1963.

Ramakrishnan, C. and Ramachandran, G. N. Biophysical stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations ii. allowed conformations for a pair of peptide units. Biophysical journal v.5, p.909-933, 1965.

Reddy, K. V. R.; Shahani, S. H. e Meherji, P. K. Spermicidal activity of magainins: in vitro and in vivo studies. Contraception, v.53, p.205–210, 1996.

Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D. e Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents. v.24, p.536–547, 2004.

Rinaldi, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding cenario. Current Opinion in Chemical Biology.v.6, p.799–804, 2002.

Rozek, A., C. L. Friedrich, and R. E. Hancock. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. Biochemistry v.39, p.15765–15774, 2000.

Sanderson, J. M. Peptide–lipid interactions: insights and perspectives. Organic e Biomolecular Chemistry, v.3, n.2, p.201-212, 2005.

Sawai, M. V., H. P. Jia, L. Liu, V. Aseyev, J. M. Wiencek, P. B. McCray, Jr., T. Ganz, W. R. Kearney, and B. F. Tack. The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. Biochemistry v.40, p.3810–3816, 2001.

Sreerama, N.; Venyaminov, S. Y. e Woody, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from CircularDichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. Analytical Biochemistry, v.287, p.243–251, 2000.

Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J. e Marius Clore, G. Using Xplor–NIH for NMR molecular structure determination.Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, v.48, n.1, p.47-62, 2006.

Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N. e Marius Clore, G. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package.Journal of Magnetic Resonance,v.160, n.1, p.65-73, 2003.

Shadidi, M. e Sioud, M. Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. Drug Res. Updates, v.6, p.363–371, 2003.

Shai, Y. e Oren, Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed distereomeric cell-selective antimicrobial pepetides. Peptides, v.22, p.1629-1641, 2001.

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

Sreerama, N.; Venyaminov, S. Y. e Woody, R. W. Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra Based on the Tertiary Structure Classification. Analytical Biochemistry, v.299, p.271–274, 2001.

Tam J.P.; Wu C. e Yang J.L.; Membranolytic selectivity of cystine-stabilized cyclic protegrins. Eur. J. Biochem, v.267, p.3289–3300, 2000.

Theuretzbacher, U. Future antibiotics scenarios: is the tide starting to turn?International Journal of Antimicrobial Agents, v.34 p.5–20, 2009.

Tozer, G. M.; Kanthou, C. e Baguley, B. C. Disrupting tumour blood vessels.Nature Reviews Cancer, v.5, p.423–435, 2005.

Unger, T.; Oren. Z., e Shai, Y. Membranolytic selectivity of cystine-stabilized cyclic protegrins: implication to their mode of action. Biochemistry, v.40, p.6388–6397, 2001.

Valcarcel, C. A.; Serra, M. D.; Potrich, C.; Bernhart, I; Tejuca, M.; Martinez, D.; Pazos, F.; Lanio, M. E. e Menestrina, G. Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolysins of the Sea Anemone Stichodactyla helianthus. Biophysical Journal, v.80, p.2761–2774, 2001.

VanCompernolle, S. E.; Taylor, R. J.; Oswald-Richter, K.; Jiang, J.; Youree, B. E.; Bowie, J. H.; Tyler, M. J.; Conlon, J. M.; Wade, D.; Aiken, C.; Dermody T. S.; KewalRamani V. N.; Rollins-Smith L. A. e Unutmaz D. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency vírus infection and transfer of vírus from dendritic cells to T cells. J. Virol. v.79, p.11598–11606, 2005.

Veglia, G.; Ramamoorthy, A. Special issue on “Membrane Protein Dynamics: Correlating Structure to Function”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v.1798, p.65-67, 2010.

Verlet, L. Computer Experiments on classical fluids. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. Phys. Rev, v.159, p.98-105, 1967.

Vlieghe, P; Lisowski, V; Martinez, J. e Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science. Drug Discovery Today, v.15, n.1/2, p.41-56, 2010.

Zairi, A.; BelaÏd, A.; Gahbiche, A. e Hani, K. Spermicidal activity of dermaseptins. Contraception, v.72, p.447–453, 2005.

Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Microbiology v.84, p.5449-5453, 1987.

Zasloff, M; Martint, B. e Chen, H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues (vertebrate peptide antibiotics). Microbiology, v. 85, p.910-913, 1988.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, v.415, p.389-395, 2002.

Zhang L, Rozek A, e Hancock RE.Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. J BiolChem, v.276, p.35714–35722, 2001.

Wang, T.; Zhang, J.; Shen, J. H.; Jin, Y.; Lee, W. H. e Zhang, Y. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad Bombina maxima". Biochemical and Biophysical Research Communications, v.327, n.3, p.945-951, 2005.

Wieprecht, T.; Dathe, M.; Schu«mann, M.; Krause, E.; Beyermann, M. e Bienert, M. Biochemistry, v.35, p. 10844-10853, 1996.

Wildman, K. A. H., Lee, D. K. e Ramamoorthy, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. Biochemistry v.42, p.6545–6558, 2003.

Wüthrich, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Wiley e Sons, Inc., Zürich, Switzerland, 1986.

Wüthrich, K NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture) Angew. Chem. Int. Ed., v.42, p.3340 –3363, 2003.

Wüthrich, K.; Billeter, M. e Braun, W. Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances,J. Mol. Biol. v.180, p.715-740, 1984.

Yeaman, M. R. e Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacological Reviews, v.55, n.1, p.27-55, 2003.

Antimicrobial Peptide Database. Disponível em: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> Acesso em 21/11/211.

Biological Magnetic Resonance Data Bank. Disponível em: http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm. Acesso em 16/08/2012

Eol enciclopedia of life Disponível em: http://eol.org/pages/1048192/overview. Acesso em 28/01/2012.

Eol enciclopedia of life Disponível em: http://eol.org/pages/4351466/overview> Acesso em 06/10/2011.

Protein data bank. Disponível em: http://www.pdb.org/pdb/101/static101.do?p=education_discussion/Looking-at-Structures/methods.html. Acesso em 23/11/ 2011.

ANEXOS

Anexo A. Deslocamento químico de hidrogênio para os 20 resíduos de aminoácidos essenciais (adaptado de Wuthrich, 1986).

Resíduo	NH	Hα	H*β*	Outros
Gly	8,39	3,97	-	-
Ala	8,25	4,35	1,39	-
Val	8,44	4,18	2,13	*γ*CH_3 0,97; 0,94
Ile	8,19	4,23	1,90	*γ*CH_2 1,48; 1,19 *γ*CH_3 0,95 *δ* CH_3 0,89
Leu	8,42	4,38	1,65 1,65	γ1,64 *δ* CH_3 0,94 0,90
Pro	-	4,44	2,28 2,02	*γ*CH_2 2,03; 2,03 *δ*CH_2 3,68; 3,65
Ser	8,38	4,50	3,88 3,88	-
Thr	8,24	4,35	4,22	*γ*CH_3 1,23
Asp	8,41	4,76	2,84 2,75	-
Glu	8,37	4,29	2,09 1,97	*γ*CH_2 2,31; 2,28
Lys	8,41	4,36	1,85 1,76	*γ*CH_2 1,45; 1,45 *δ*CH_2 1,70; 1,70 *ε*CH_2 3,02 ;3,02 *ε*NH_3^+ 7,52
Arg	8,27	4,38	1,89 1,79	*γ*CH_2 1,70; 1,70 *δ*CH_2 3,32; 3,32 NH 7,17; 6,62
Asn	8,75	4,75	2, 83 2,75	*γ*NH_2 7,59; 6,91
Gln	8,41	4,37	2,13 2,01	*γ*CH_2 2,38 2,38 *δ*NH_2 6,87 7,59
Met	8,42	4,52	2,15 2,01	*γ*CH_2 2,64 2,64 *ε*CH_3 2,13
Cys	8,31	4,69	3,28 2,96	-
Trp	8,09	4,70	3,32 3,19	2H 7,24 4H 7,65 5H 7,17 6H 7,24 7H 7,50 NH 10,22
Phe	8,23	4,66	3,22 2,99	2,6H 7,30 3,5H 7,39 4H 7,34
Tyr	8,18	4,60	3,13 2,92	2,6H 7,15 3,5H 6,86
His	8,41	4,63	3,26 3,20	2H 8,12 4H7,14