

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Estudo por ressonância magnética nuclear da estrutura e
interação de novos protótipos de biofármacos
antimicrobianos**

Eliane Santana Fernandes Alves

Orientador: Prof. Dr. Luciano Moraes Lião
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Lima de Oliveira

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Eliane Santana Fernandes Alves

Título do trabalho: Estudo por ressonância magnética nuclear da estrutura e interação de novos biofármacos antimicrobianos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Eliane Santana Fernandes Alves
Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 31 / 01 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

SANTANA FERNANDES ALVES, ELIANE

Estudo por ressonância magnética nuclear da estrutura e interação
de novos protótipos de biofármacos antimicrobianos [manuscrito] /

ELIANE SANTANA FERNANDES ALVES. - 2016.

xix, 155 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Moraes Lião; co-orientador Dr. Aline
Lima de Oliveira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras,
lista de tabelas.

1. Ressonância Magnética Nuclear. 2. Peptídeos bioativos. 3.
Estrutura tridimensional. I. Moraes Lião, Luciano, orient. II. Título.

CDU 543.392



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Tese de Doutorado de Eliane Santana Fernandes Alves, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutora em Química.

em Confere e/ original 13/06/16
Lidia S. F. de Freitas
Assistente em Administração (UFG)
Matricula SIAPE: 20244

Aos dias 18 (dezoito) de março do ano de 2016 (dois mil e dezesseis), com início às 14:00 hs (catorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dr. Luciano Morais Lião-orientador (UFG), Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira-coorientadora (UFG), Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida (UFRJ), Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende (UFMG), Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes (UFG) e Prof. Dra. Lucília Kato (UFG) sob a presidência do primeiro, para julgar a tese de Eliane Santana Fernandes Alves intitulada: "Estudo por ressonância magnética nuclear da estrutura e interação de novos protótipos de biofármacos antimicrobianos". O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado foi o seguinte:

Prof. Dr. Luciano Morais Lião: *[assinatura]*

Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira: *[assinatura]*

Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida: *[assinatura]*

Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende: *[assinatura]*

Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes: *[assinatura]*

Prof. Dra. Lucília Kato: *[assinatura]*

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Eliane Santana Fernandes Alves, candidata ao título de doutora em Química foi: Aprovada (X); Reprovada ().

Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 18 de março de 2016.

[assinatura]
Prof. Dr. Luciano Morais Lião-orientador (UFG)

Aline Lima de Oliveira
Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira-coorientadora (UFG)

[assinatura]
Prof. Dr. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida (UFRJ)

[assinatura]
Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende (UFMG)

Kátia Flávia Fernandes
Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes (UFG)

Lucília Kato
Prof. Dra. Lucília Kato (UFG)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido esposo Rosário Alves de Jesus, que sempre me estimulou a crescer pessoalmente e profissionalmente, pela paciência e compreensão ao longo destes anos. Também dirijo um agradecimento especial a minha mãe pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui o mais profundo agradecimento a todos aqueles que tornaram a realização deste trabalho possível.

Ao professor Luciano Morais Lião, meu orientador, pela competência científica e disponibilidade, bem como pelas suas críticas, sugestões e correções feitas durante a orientação.

À Professora Aline Lima de Oliveira, minha coorientadora, por aceitar o desafio de me auxiliar a distância.

Ao professor Luiz Henrique Keng Queiroz Júnior, pelos seus valiosos esclarecimentos e contribuição ao meu trabalho

Aos professores Rodrigo Moreira Verly e Fábio Ceneviva Lacerda Almeida pelos ensinamentos científicos e apoio manifestados.

No laboratório tive a oportunidade de conhecer e conviver com pessoas muito especiais. Assim agradeço a todos os colegas que conheci durante estes seis anos no laboratório de RMN: 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. Obrigada pela amizade e ensinamentos.

Estendo os meus agradecimentos aos funcionários do Instituto de Química pela sua contribuição indireta, porém bastante relevante.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), agradeço pela contribuição financeira.

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS	i
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO:	xviii
ABSTRACT:	xix
1. Introdução	1
1.1 Peptídeos Antimicrobianos	1
1.2 Resistência microbiana	6
1.3 Aplicações terapêuticas	9
1.4 Relação estrutura-atividade dos PAMs	11
1.5 Mecanismo de ação	12
1.6. Mecanismos de ação	15
1.7 Peptídeos estudados	17
1.8 Ressonância Magnética Nuclear no contexto estrutural	21
1.9 Validação das estruturas	24
2.1 Objetivos gerais	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. Metodologia	28
3.1. Dicroísmo Circular (DC)	29
3.2 Aquisição dos experimentos de RMN	32
3.3. Processamento dos dados	36
3.4. Determinação estrutural dos peptídeos	36
3.4.1. Assinalamento dos sinais de NOE	36
3.4.2 Cálculos de modelagem	37
3.5 Localização do peptídeo <i>Cm-p1</i> na micela, troca H/D.	39
3.6 Síntese do peptídeo <i>Cm-p1</i> modificado ([Phe ³] <i>Cm-p1</i>)	40
3.7 Ensaio biológico	41
4. Resultados e discussões	43
4.1 Peptídeo clavanina A	43
4.2 Peptídeo <i>Cm-p1</i>	84
4.3 Peptídeo <i>Cm-p1</i> modificado ([Phe ³] <i>Cm-p1</i>)	114
5. Conclusões	130
6. Referências	132
Anexos	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Quantidade de peptídeos antimicrobianos descobertos a cada ano, de 1980 a 2014. Os dados foram obtidos a partir do banco de dados de peptídeos antimicrobianos (http://aps.unmc.edu/AP).....	2
Figura 1.2. Porcentagem de peptídeos antimicrobianos depositados no banco de dados PDB versus atividade apresentada, de um total de 2661 peptídeos.	2
Figura 1.3. Membrana alvo de peptídeos antimicrobianos com base na especificidade. Modificado de (Zasloff, 2002).	13
Figura 1.4. Imagem do Tunicado <i>Styela clava</i> , dele foram extraídos os peptídeos antimicrobianos clavanins. (http://www.european-marine-life.org/32/photo.php?scr=cla &url=32/photos-600x400/styela-clava-wb02-600x400.jpg , acessado em 06/02/2015).	18
Figura 1.5. Imagem do caracol marinho <i>Cenchritis muricatus</i> . Dele pode ser extraído o peptídeo antifúngico Cm-p1. (https://www.flickr.com/search/?q=Cenchritis%20muricatu	20
Figura 1.6 Relação entre precisão e exatidão em um conjunto de modelos. Modificado de Vranken (Vranken, 2014).....	25
Figura 4.1. Espectro de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A (41 μM), sem meio mimético a pH 5 e 25 °C.....	43
Figura 4.2. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A (≈41 μM) à diferentes concentrações de SDS (em mM), pH 5, 25 °C.....	44
Figura 4.3. Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A a duas diferentes concentrações, 41 μM (em preto) e 82 μM (em vermelho), em 2 mM de micelas de SDS, pH 5 e 25 °C.	46
Figura 4.4. Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A à duas diferentes concentrações, 23 μM em preto e 50 μM em vermelho, em 32 mM de micelas de SDS, pH 4,3 e 25 °C.	46
Figura 4.5. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A 41 μM em 8 mM de micelas de SDS e pH 3, 4, 5, 7 e 9, a 25 °C.	47
Figura 4.6 Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ em 222 nm em função da temperatura. Peptídeo clavanina A (41 μM) em 8 mM de micelas de SDS e pH 5. Curva de desnaturação do peptídeo clavanina A em uma rampa de temperatura de 25 °C a 95 °C.....	48
Figura 4.7. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm ² dmol ⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A (≈38 μM) a diferentes concentrações de TFE (%) em H ₂ O, pH 5 e 25 °C.	49

Figura 4.8 Expansão do mapa de contornos TOCSY, região de impressão digital, de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), 10% D $_2$ O, pH 4,3 a 25 °C.	51
Figura 4.9 Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H $_N$ e H $_{\alpha}$, de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), 10% D $_2$ O e pH 4,3.	52
Figura 4.10 Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H $_N$ -H $_N$, de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), 10% D $_2$ O e pH 4,3.	52
Figura 4.11 Expansão do mapa de contornos HSQC ^1H - ^{13}C de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), 10% D $_2$ O, pH 4,3 e 25 °C.	53
Figura 4.14 Gráfico de CSI obtido pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α -hélice, as caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou igual a zero.	56
Figura 4.15 Diagrama de conectividade de NOEs, característicos de estrutura secundária, para o peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v). As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama. As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, media e forte.	57
Figura 4.16 Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição, para a clavanina A em solução de TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3. A classificação no gráfico indica restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).	59
Figura 4.17 Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_{med}) versus informação única (I_{uni}) para a clavanina A em solução de TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3.	60
Figura 4.18 Estrutura de menor energia para o peptídeo clavanina A em solução de TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3 e 25 °C. Cálculos estruturais realizados sem restrições de ângulos diedros.	61
Figura 4.19 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo clavanina A com a estimativa da exatidão da predição, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes b) Índice de desvio do parâmetro de ordem RCI- S^2 em função do número de resíduo c) Previsão da estrutura secundária.	62
Figura 4.20 Estruturas de menor energia para o peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3 a 25 °C A) Sobreposição das dez estruturas de menor energia B) Sobreposição apenas dos átomos da cadeia principal (código pdb: 2MVE http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).	63
Figura 4.21 Estrutura de menor energia para o peptídeo clavanina A em solução de TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3. A). Estrutura de menor energia	

com os resíduos catiônicos estacados em rosa B) Visualização em superfícies.....	67
Figura 4.22 Projeção helicoidal para o peptídeo clavanina A. Estão apresentados os resíduos catiônicos como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores, assim os resíduos mais hidrofóbicos apresentam-se em verde, com hidrofobicidade zero em amarelo, e aqueles mais hidrofílicos em vermelho.....	69
Figura 4.23 Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3, a 25 °C. A) Vista frontal N-terminal e C-terminal, em azul resíduos hidrofóbicos e em rosa resíduos hidrofílicos b) Sobreposição das dez estruturas de menor energia, em rosa resíduos polares e azul apolares C) Vista em Superfícies com resíduos catiônicos destacados em verde, código pdb: 2MVE.	70
Figura 4.24 Estrutura de menor energia do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa e catiônicos em verde.	72
Figura 4.25 Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do <i>Ramachandran Plot</i> (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php).	73
Figura 4.26 Mapa de contornos de DOSY ^1H , do peptídeo clavanina A à 2 mM em solução aquosa, pH 4,3 e 25 °C.	78
Figura 4.27 Gráfico com valores de coeficiente de difusão ordenada para o peptídeo clavanina A em diferentes meios e concentrações, em vermelho peptídeo em água, em preto peptídeo em solução 100 mM de SDS- d_{25} e em verde peptídeo em solução TFE- d_3 a 35%, pH 4,3 e 25 °C. As barras na figura correspondem ao erro da medida.	80
Figura 4.28 Espectro de ^1H para o peptídeo clavanina A a) 1 mM do peptídeo em solução de 35% de TFE- d_3 b) 1 mM do peptídeo na presença de 100 mM de SDS- d_{25} H $_2$ O/D $_2$ O 9:1 (v/v), pH 4,3, a 25 °C.	81
Figura 4.29 Espectro de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm 2 dmol $^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 51 μM , em água, pH 4 (tampão tris HCl) e 25 °C.	84
Figura 4.30 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm 2 dmol $^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 51 μM , soluções de TFE:H $_2$ O em diferentes proporções, pH 4 (tampão tris HCl) e 25 °C.	85
Figura 4.31 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm 2 dmol $^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 30 μM , na presença de micelas de DPC (100 mM), diferentes pH (tampão 4, 7 e 10) e 25 °C.	85

Figura 4.33 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo <i>Cm-p1</i> à 51 μM em 8 mM de micelas de SDS e tampões pH 3, 4, 5 e 7 e 25 °C.....	87
Figura 4.34 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo <i>Cm-p1</i> à 121 μM em 4, 8 e 16 mM de micelas de SDS, sem tampão, pH 4,3 e 25 °C.	88
Figura 4.35 Espectros unidimensionais de ^1H . Ampliação da região de ^1H amídicos e hidrogênios aromáticos a diferentes temperaturas, para 1 mM do peptídeo <i>Cm-p1</i> na presença de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} a) 5 °C b) 10 °C c) 15 °C d) 20 °C e) 25 °C f) 30 °C g) 35 °C.....	89
Figura 4.36 Espectros unidimensionais de ^1H . Ampliação da região de hidrogênios amídicos. 1 mM do peptídeo <i>Cm-p1</i> em diferentes meios a) na presença de SDS- d_{25} b) TFE- d_3 :H $_2$ O c) água.	91
Figura 4.37. Expansão do mapa de contornos TOCSY, região de impressão digital e cadeias laterais, 1 mM do peptídeo <i>Cm-p1</i> em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.....	92
Figura 4.38 Expansão do mapa de contornos parcial NOESY, região de interação H_N e H_α , 1 mM do peptídeo <i>Cm-p1</i> em solução de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.	93
Figura 4.39. Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H_N - H_N , 1 mM do peptídeo <i>Cm-p1</i> em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.....	94
Figura 4.40. Expansão do mapa de contornos HSQC ^1H - ^{13}C do peptídeo <i>Cm-p1</i> a 1 mM em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.	95
Figura 4.41. Expansão do mapa de contornos HMQC ^1H - ^{15}N do peptídeo <i>Cm-p1</i> a 1 mM em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.	95
Figura 4.42. Gráfico de CSI: diferença entre os deslocamentos químicos dos H_α observados e os valores padrões não estruturados obtidos da literatura.	96
Figura 4.43 Gráfico de CSI, diferença entre os deslocamentos químicos experimentais e os valores padrões não estruturados pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α -hélice. As caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou iguais a zero	97
Figura 4.44. Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo <i>Cm-p1</i> a 1 mM em solução micelar de micelas de SDS- d_{25} . As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha\text{N}}$ e $d_{\beta\text{N}}$ estão representadas no diagrama As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, media e forte.	98

Figura 4.45. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição para o peptídeo <i>Cm-p1</i> a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C. A classificação no gráfico indicam restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).....	99
Figura 4.46. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_{med}) versus informação única (I_{uni}) para o peptídeo <i>Cm-p1</i> a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.	100
Figura 4.47 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo <i>Cm-p1</i> com predição da exatidão, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes e em amarelo previsão ambígua b) Índice de desvio do parâmetro de ordem $RCI-S^2$ em função da posição dos resíduos na sequência primária c) Previsão da estrutura secundária.	101
Figura 4.48 Estrutura de menor energia para o peptídeo <i>Cm-p1</i> a) sem refinamento em água b) com refinamento em água.....	102
Figura 4.50. Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo <i>Cm-p1</i> em solução micelar de SDS- d_{25} A) Sobreposição das estruturas mais estáveis B) Com a cadeia principal em destaque.....	104
Figura 4.51 Projeção helicoidal para o peptídeo <i>Cm-p1</i> . Estão apresentados os resíduos catiônicos como pentágonos. O único resíduo aniônico está em triângulo. A Hidrofobicidade é codificada por cores, assim os resíduos mais hidrofóbicos apresentam-se em verde, com hidrofobicidade zero em amarelo, e aqueles mais hidrofílicos em vermelho.....	106
Figura 4.52. Conjunto das dez estruturas de menor energia para o peptídeo <i>Cm-p1</i> em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} . A) Vista frontal <i>N</i> -terminal (esquerda) e <i>C</i> -terminal (direita), em azul resíduos hidrofóbicos e polares em rosa B) Sobreposição das dez estruturas mais estáveis, com resíduos polares em rosa e hidrofóbicos em azul C) Estrutura de menor energia com vista em Superfícies, sendo os resíduos catiônicos destacados em verde e aniônico em amarelo.....	107
Figura 4.53 Estrutura de menor energia do peptídeo <i>Cm-p1</i> em SDS- d_{25} , pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa, catiônicos em verde e aniônico em amarelo.	108
Figura 4.54. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do <i>Ramachandran Plot</i> (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php).	109

Figura 4.55 Mapas de contornos de TOCSY ^1H da região de impressão digital (H_N - H_α) peptídeo Cm-p1 em SDS- d_{25} , a 25 °C. A) peptídeo com 90% H_2O 10% D_2O , B) peptídeo com 10% H_2O 90% D_2O , após 1 hora de troca e C) após 1 hora e 50 minutos de troca.	113
Figura 4.56 Avaliação da atividade antifúngica do peptídeo [Phe3]Cm-p1 para a) <i>Cryptococcus neoformans</i> e B) <i>Candida Albicans</i>	115
Figura 4.57 Espectro de DC, sendo $[\theta]_\text{molar}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Solução com 56,7 μM do peptídeo [Phe3]Cm-p1, 32 mM de micelas de SDS, pH 4,3 e 25 °C.	116
Figura 4.58 Gráfico de CSI para o peptídeo [Phe ³]Cm-p1. Diferença entre os deslocamentos químicos experimentais e os valores padrões não estruturados pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α -hélice. As caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou iguais a zero.....	117
Figura 4.59 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo [Phe3]Cm-p1 com predição da exatidão, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes e em amarelo previsão ambígua b) Índice de desvio do parâmetro de ordem RCI- S^2 em função da posição dos resíduos na sequência primária c) Previsão da estrutura secundária.....	118
Figura 4.60. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_uni) pelo índice de restrição para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C. A classificação no gráfico indicam restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).....	119
Figura 4.61. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_med) versus informação única (I_uni) para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.	120
Figura 4.62. Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 a 1 mM em solução micelar de SDS- d_{25} . As intensidades das interações d_NN , $d_\alpha\text{N}$ e $d_\beta\text{N}$ estão representadas no diagrama As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, media e forte.	121
Figura 4.63. Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo [Phe3]Cm-p1 em solução micelar de SDS- d_{25} A) Sobreposição das estruturas mais estáveis B) Com a cadeia principal em destaque.	122
Figura 4.64. Estrutura de menor energia para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} e pH 4,3. A) Estrutura de menor energia com os resíduos catiônicos destacados em rosa e o aniônico em amarelo. B) Visualização em superfícies.	123

Figura 4.65. Conjunto das dez estruturas de menor energia para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- <i>d</i> ₂₅ . A) Vista frontal N-terminal (esquerda) e C-terminal (direita), em azul resíduos hidrofóbicos e polares em rosa. B) Sobreposição das dez estruturas mais estáveis, com resíduos polares em rosa e hidrofóbicos em azul. C) Estrutura de menor energia com visualização em superfícies, sendo os resíduos catiônicos destacados em verde e aniônico em amarelo.	125
Figura 4.66 Estrutura de menor energia do peptídeo [Phe3]Cm-p1 em SDS- <i>d</i> ₂₅ , pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa, catiônicos em verde e aniônico em amarelo.....	126
Figura 4.67. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis para o peptídeo [Phe ³]Cm-p1. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do <i>Ramachandran Plot</i> (http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php).	127
Figura 4.68 Gráfico com valores de coeficiente de difusão ordenada para o peptídeo Cm-p1 e [Phe3]Cm-p1 em SDS- <i>d</i> ₂₅ , pH 4,3 e 25 °C. As barras na figura correspondem ao erro da medida.	128

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Drogas peptídicas mais vendidas.....	4
Tabela 1.2 Atividade antifúngica do peptídeo <i>Cm-p1</i> contra diferentes leveduras e fungos (López-Abarrategui et al., 2012).....	20
Tabela 3.1 Peptídeos Clavanina A (pH 5) e <i>Cm-p1</i> (pH 4) em diferentes concentrações de micelas de SDS, com suas respectivas diluições nas amostras.	30
Tabela 3.2 Peptídeos Clavanina A e <i>Cm-p1</i> em diferentes concentrações de TFE, com suas respectivas diluições.	31
Tabela 3.3 Parâmetros utilizados nos experimentos de TOSCY, NOESY, COSY, HSQC e sf-HMQC. Clavanina A em TFE- <i>d</i> ₃ e <i>Cm-p1</i> em SDS- <i>d</i> ₂₅	33
Tabela 3.4 Parâmetros utilizados nos experimentos de DOSY.....	34
Tabela 4.1. Grau de estruturação em hélice, para o peptídeo clavanina A (41μM), em diferentes concentrações de SDS.....	45
Tabela 4.2 Grau de estruturação do peptídeo em hélice em diferentes soluções de TFE: H ₂ O.....	50
Tabela 4.3. Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo clavanina A.....	57
Tabela 4.4 Estatística das dez estruturas de menor energia, quanto à geometria das estruturas obtidas.	68
Tabela 4.5 Indicadores de qualidade estrutural para o peptídeo clavanina A.	75
Tabela 4.6 Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo <i>Cm-p1</i>	98
Tabela 4.7. Estatística das vinte estruturas de menor energia, quanto à geometria das estruturas obtidas.	104
Tabela 4.8 Indicadores da qualidade estrutural para o peptídeo <i>Cm-p1</i>	110
Tabela 4.9 Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo [Phe ³] <i>Cm-p1</i>	121
Tabela 4.10. Estatística das vinte estruturas de menor energia para o peptídeo [Phe ³] <i>Cm-p1</i> , quanto à geometria das estruturas obtidas.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AMP	Peptídeos antimicrobianos
AQ	Tempo de aquisição
APD	Banco de Dados de Peptídeos Antimicrobianos
C-terminal	Região carboxi terminal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
CSI	Índice de Deslocamento Químico (<i>Chemical Shift Index</i>)
DC	Dicroísmo Circular
DPC	Dodecilsfosfocolina, do inglês, <u>dodecylphosphocholine</u>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DOSY	Espectroscopia de difusão ordenada (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Decaimento Livre de Indução
GB	Gaussiana
HSQC	Coerência Heteronuclear de Simples Quantum (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HMQC	Coerência Heteronuclear de Múltiplo Quanta (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
I_{uni}	Unicidade de informação
I_{med}	Informação média
J	Constante de acoplamento escalar
LB	Lorentziana
N-terminal	Região amino-terminal
NOE	Efeito Nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
NS	Número de transientes
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
QUEEN	Validação quantitativa de restrições experimentais de RMN (<i>Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints</i>)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio padrão quadrático médio (do inglês <i>root mean square deviation</i>)
SA	Arrefecimento simulado (do inglês <i>simulated annealing</i>)

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SMH	Shai Matsuzaki Huang
TBI	Sonda inversa de tripla ressonância
TFA	Trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TGI	Trato gastrointestinal
TMSP- d_4	trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 propionato de sódio
TOCSY	Espectroscopia de correlação total (do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>)
$\Delta\delta$	Variação de deslocamento químico
δ	Deslocamento químico
f_H	Estimativa máxima teórica de estruturação
$[\theta]$	Elipticidade molar média

RESUMO:

Os peptídeos antimicrobianos estão ganhando cada vez mais importância na área farmacêutica, pela sua elevada afinidade e seletividade para interagir com alvos em conjunto com seu perfil de baixa toxicidade. O aumento do número de peptídeos que entraram em ensaios clínicos é um triunfo significativo para biologia estrutural, com a busca cada vez maior por peptídeos que cumpram os critérios exigidos em termos de custo, estabilidade, longa meia-vida e biodisponibilidade.

Essa busca pode ser facilitada pelo melhor entendimento dos mecanismos de ação, dinâmica e cinética de biomoléculas. Nesse contexto se encontra a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que possui um papel de destaque no estudo das interações em solução ligante-alvo de moléculas biologicamente ativas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo observar as interações moleculares dos peptídeos clavanin A, Cm-p1 e [Phe3]Cm-p1. O peptídeo clavanin A é encontrado nas células do sangue do tunicado *Styela clava*, ele apresenta um amplo espectro de atividades contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de vários fungos. O peptídeo Cm-p1 pode ser extraído do extrato bruto do caracol marinho *Cenchritis muricatus*, ele apresenta atividade contra leveduras e fungos filamentosos. O peptídeo [Phe3]Cm-p1 corresponde ao peptídeo Cm-p1 modificado, com uma modificação na posição do resíduo 3. Nos estudos foram empregadas as espectroscopias de dicroísmo circular, na observação da estrutura secundária do peptídeo e RMN, nos estudos de modelagem molecular.

O peptídeo clavanin A, na presença de TFE (2,2,2-trifluoroetanol), apresentou uma estrutura em α -hélice anfipática do resíduo de Phe-2 à Val-22. O peptídeo Cm-p1 se estruturou em α -hélice pouco anfipática na presença de micelas de SDS- d_{25} entre os resíduos Arg-2 e Ile-6. Já o peptídeo [Phe3]Cm-p1 na presença de micelas de SDS- d_{25} (Dodecil sulfato de sódio) se estruturou entre os resíduos Arg-2 e Gln-9, mostrando que a adição de um resíduo hidrofóbico na posição 3 proporcionou uma maior interação peptídeo-micela, como observado pela menor difusão, do peptídeo [Phe3]Cm-p1 em relação ao peptídeo Cm-p1. Todas as estruturas obtidas apresentaram boa qualidade e geometria, conforme mostraram as validações empregadas.

A espectroscopia de RMN forneceu informações a respeito das interações intramoleculares dos peptídeos clavanin A, Cm-p1 e [Phe3]Cm-p1, possibilitando descrever os resíduos importantes nas interações moleculares com meio. As informações levantadas neste estudo são essenciais a futuras pesquisas para o desenvolvimento de fármacos a partir desses peptídeos.

ABSTRACT:

Antimicrobial peptides are gaining high importance in the pharmaceutical sector given its high affinity and selectivity to interact with targets, and its low toxicity profile. The increase in the number of peptides screened in clinical trials is a significant triumph for structural biology, considering the search for peptides that meet the required criteria in terms of cost, stability, long half-life and bioavailability.

This research is best performed with a good understanding of the mechanisms of action, dynamics and biomolecules kinetics. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) plays an important role in this context, since it provides informations about the interactions in target binding solution of biologically active molecules. Thus, this study aims to observe the intramolecular interactions of peptides clavanin A, Cm-p1 and [Phe3] Cm-p1. The clavanin peptide is found in tunicate blood cells *Styela clava*, and presents a broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and against several kinds of fungi. The Cm-p1 peptide can be extracted from the crude extract of the marine snail *Cenchritis muricatus*, and shows activity against yeasts and filamentous fungi. The peptide [Phe3] Cm-p1 corresponds to Cm-p1 peptide modified with a change in residue position 3. Circular dichroism spectroscopy was used in the observation of secondary structure of peptide, and the informations provided by NMR were used in the studies of molecular modeling.

The clavanin peptide in the presence of TFE (2,2,2-trifluoroethanol), presented a amphipathic α -helices from Phe-2 to Val-22 residues. The Cm-p1 peptide was structured in α -helix, short amphipathic, in the presence of micelles of SDS-d25 between Arg-2 and Ile-6 residues. The peptide [Phe3]Cm-p1 in the presence of micelles SDS-d25 (sodium dodecyl sulfate) is structured between Arg-2 and Gln-9, showing that the addition of a hydrophobic residue in position 3 provided a greater interaction peptide-micelle, as noted by the smaller diffusion of the peptide [Phe3]Cm-p1 relative to Cm-p1 peptide. All the obtained structures showed good quality and geometry, as revealed by the validation study.

NMR spectroscopy provided information about the intramolecular interactions of peptides clavanin A, Cm-p1 and [Phe3]Cm-p1. It was possible to assign the residues which were important in the interactions between the peptides and the environment. This knowledge is essential in the development of new drugs.

1. Introdução

Peptídeos são biomoléculas formadas pela ligação de dois ou mais resíduos de aminoácidos, sendo que um peptídeo pode variar de 2 a 100 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos são ligados covalentemente através da formação de ligações amídicas, conhecidas como ligações peptídicas. Quando muitos resíduos de aminoácidos, de 10 a 100, estão unidos via ligação peptídica, a molécula é chamada polipeptídeo. Quando poucos (4 a 10 resíduos), são chamados de oligopeptídeo (Nelson, David L.; Cox, 2011).

1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos que possuem atividade biológica contra microrganismos são chamados de peptídeos antimicrobianos (PAMs). Esses possuem geralmente a característica de serem extremamente diversificados em termos funcionais. Os PAMs foram considerados como potenciais fármacos após 1960, sendo isolados e identificados somente a partir da década de 80. O primeiro PAM descoberto, um peptídeo antibacteriano catiônico de 37 resíduos de aminoácidos, foi chamado de cecropina por ser extraído do inseto *Hyalophora cecropia* (Steiner, Hultmark, Engström, & Bennich, 1981). Cecropina representa um dos PAMs mais estudados entre os muitos sintetizados por insetos (Fox, Thwaite, Ulaeto, Atkins, & Atkins, 2012; Hong, Shchepetov, Weiser, & Axelsen, 2003; Y. Li, Xiang, Zhang, Huang, & Su, 2012; Silvestro, Weiser, & Axelsen, 2000; Suttman et al., 2008). A partir da descoberta da cecropina foram realizados vários estudos buscando encontrar novos PAMs, como mostra a Figura 1.1 que ilustra o número de PAMs descobertos entre 1980 e 2014.

O Banco de Dados de PAMs (APD) contém 2.661 depósitos, conforme Figura 1.2. Além dos peptídeos naturais, podem ainda ser sintetizados reproduzindo ou não a sequência natural (Guaní-Guerra, Santos-Mendoza, Lugo-Reyes, & Terán, 2010; Y. Li et al., 2012), inclusive com artifícios de modelagem computacional (Olmez & Akbulut, 2012). Dentre esses peptídeos, 2203 são antibacterianos, 175 antivirais, 971 antifúngicos, 192 anticâncer, 4 anti-protistas, 28 inseticidas, 12 espermicidas, 56 quimiotáticos, 21 antibiofilme, 108 anti-HIV, 83 antiparasitários, 19 antioxidantes, 10

cicatrizantes e 17 inibidores de protease. (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, acessado em 22/02/2016).

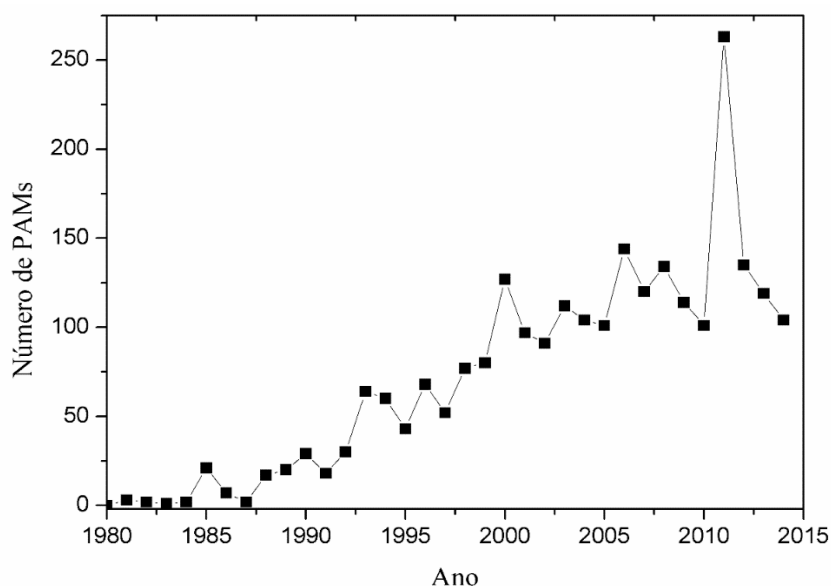


Figura 1.1. Quantidade de peptídeos antimicrobianos descobertos a cada ano, de 1980 a 2014. Os dados foram obtidos a partir do banco de dados de peptídeos antimicrobianos (<http://aps.unmc.edu/AP>).

Como os insetos não possuem sistema imuno adaptativo semelhante aos vertebrados, eles desenvolveram imunidade inata eficiente, para se protegerem de infecções microbianas. Nesse contexto, os PAMs se mostram essenciais ao sistema imune inato de muitos insetos e mamíferos, agindo funcionalmente para a eliminação de microrganismos invasores (Boman & Hultmark, 1987; Steiner et al., 1981).

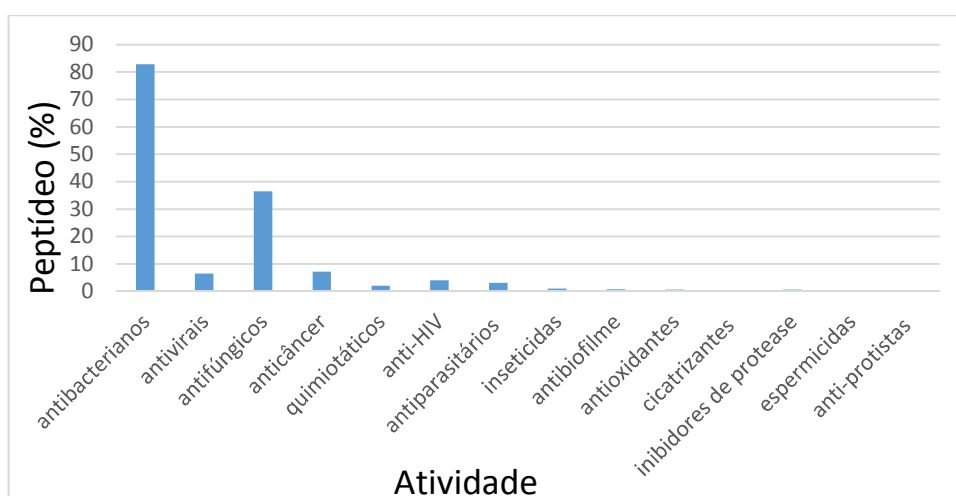


Figura 1.2. Porcentagem de peptídeos antimicrobianos depositados no banco de dados PDB versus atividade apresentada, de um total de 2661 peptídeos.

Dentro do corpo multicelular os peptídeos exercem diversas funções biológicas mais proeminentes, como moléculas de sinalização/regulação em uma ampla variedade de processos fisiológicos, tal como de defesa, imunidade, estresse, crescimento, homeostase e reprodução (Uhlir et al., 2014).

Existe uma grande diversidade de PAMs, que pode ser assumida principalmente devido às mutações. A necessidade de tal diversidade pode ser atribuída ao aumento da adaptabilidade à biosfera. Embora uma espécie de organismos possa ser rodeada por milhões de microrganismos vivos em simbiose, uma espécie pode ser facilmente destruída por um único microrganismo externo, que efetivamente invade o sistema do hospedeiro (Pathan, Venkata, & Panguluri, 2010).

Os PAMs representam um excelente ponto de partida para a concepção de novas terapias. Eles geralmente possuem perfil farmacológico atraente e propriedades intrínsecas interessantes, com uma especificidade excelente em nível de segurança, tolerabilidade e perfis de eficácia em seres humanos. Estes aspectos podem ser o principal fator de diferenciação entre peptídeos e pequenas moléculas tradicionais.

A redução dos custos e do tempo de produção foi proposto inicialmente por Robert Bruce Merrifield, que foi laureado com o Prêmio Nobel de Química em 1984, pela síntese de peptídeos em fase sólida.

Durante as últimas décadas, os PAMs têm sido amplamente aplicados em medicina e biotecnologia. Atualmente, pesquisas de peptídeos terapêuticos têm enfrentado um renascimento por razões comerciais (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Mais de 60 medicamentos à base de peptídeos já chegaram ao mercado em benefício dos pacientes (Vlieghe, Lisowski, Martinez, & Khrestchatisky, 2010). Além destes, existem cerca de 140 medicamentos em ensaios clínicos e mais de 500 peptídeos terapêuticos em ensaios pré-clínicos. O medicamento LupronTM, um peptídeo, utilizado no tratamento de câncer de próstata, atingiu vendas globais de US \$ 2,27 bilhões em 2011 (Kaspar & Reichert, 2013). Também um pequeno de peptídeo biofarmacêutico, LantusTM, alcançou vendas de US \$ 7,9 bilhões em 2013 (Fosgerau & Hoffmann, 2015).

Os peptídicos, octreotide (Sandostatin[®]; pharmaceuticals Novartis), goserelina (Zoladex[®]; AstraZeneca) e liraglutida (Victoza[®]; Novo Nordisk) tiveram vendas globais nos EUA na faixa de \$ 0,5-1,5 bilhões. O peptídeo octreotida, aprovado pela primeira vez em 1988, possui como receptor alvo a somatostatina, usado no tratamento de acromegalia e em pacientes com câncer. A goserelina, aprovada pela primeira vez em

1987, tem como alvo o receptor hormonal que libera a gonadotropina e é comercializada para uma variedade de indicações, como tratamento de endometriose e no tratamento paliativo de câncer de próstata em estágio avançado e câncer de mama. Já em 2009 foi aprovada pela primeira vez, nos Estados Unidos, a liraglutida, indicada no tratamento de adultos com diabetes tipo 2 (Kaspar & Reichert, 2013).

A Tabela 1.1 mostra alguns dos fármacos peptídicos mais vendidos (Amylin, 2013).

Tabela 1.1 Drogas peptídicas mais vendidas

Peptídeo	Nome comercial	Indicação	Referência
glatirâmer	Copaxone	Esclerose múltipla	(Hasson et al., 2016; K. P. Johnson et al., 1995)
leuprolida	Lupron	Câncer de próstata, câncer de mama, puberdade precoce	(Garnick, 1986; Hu et al., 2015)
goserelina	Zoladex	Câncer de próstata, câncer de mama e endometriose	(Donnez et al., 1997; Usadi & Merriam, 2015)
octreotida	Sandostatin	acromegalia	(Maurer, Gaehwiler, Buescher, Hill, & Roemer, 1982; Wood, Lamberts, van der Lely, de Herder, & Hofland, 1996)
exenatida	Byetta	Diabetes	(DeFronzo et al., 2005; Furman, 2012)
teriparatida	Forteo	Osteoporose	(Neer et al., 2001; Quattrocchi & Kourlas, 2004)
liraglutida	Victoza	Diabetes	(Buysschaert, D'Hooge, & Preumont, 2015; Knudsen, 2010)
cubicin	Daptomycin	Antibiótico	(Carpenter & Chambers, 2004)
degarelix	Firmagon	Câncer de próstata	(Agerso, Koechling, Knutsson, Hjortkjaer, & Karlsson, 2003; Ammannagari, Javvaji, Danchaivijitr, & George, 2016)

Peptídeo	Nome comercial	Indicação	Referência
bivalirudin	Angiomax/Angio	Inibidores diretos da trombina,	(Rocha & Panizo, 2001)
cetrorelix	x Cetrotide	Fertilidade	(Riethmüller-Winzen, Prothmann, Reissmann, Peukert, & Engel, 2000)
eptifibatide	Integrilin	Droga antiplaquetária	(Phillips & Scarborough, 1997)

Cada vez mais, os PAMs vêm alcançando a indústria farmacêutica e de biotecnologia (Uhlig et al., 2014). O número de pedidos de patentes envolvendo tecnologias relacionadas a peptídeos tem crescido significativamente nas últimas décadas, como mostra a descrição dos pedidos de patentes por Pathan e colaboradores (2010).

Frente às dificuldades encontradas na liberação de novos fármacos, Uhlig e colaboradores (2014) abordam os desafios e as oportunidades dos PAMs, no caminho para se tornarem fármacos aprovados. Os atributos dos peptídeos, originalmente considerados problemáticos com relação ao desenvolvimento de medicamentos, agora vêm a ser mais convenientes do que desfavoráveis. Eles possuem alta afinidade ao alvo e apresentam frequentemente maior estabilidade do que a esperada.

Existe uma grande variedade de organismos que produzem PAMs como parte de seu mecanismo de defesa. Durante uma infecção, um animal hospedeiro pode liberar múltiplas isoformas ou PAMs estruturalmente semelhantes, que atuam através de mecanismos distintos, para conseguir um efeito sinérgico. Por exemplo, a magainina isolada da secreção da pele do sapo africano *Xenopus laevis* (Pipidae), e a indolicidina, isolada dos neutrófilos de bovinos, podem funcionar como agentes antimicrobianos com uma estratégia de múltiplos modos de ação, para aumentar a sua eficiência e evitar potenciais mecanismos de resistência (Nguyen, Haney, & Vogel, 2011).

Peptídeos e proteínas antimicrobianos possuem um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro. Eles geralmente possuem ampla capacidade para matar microrganismos. Além de seu papel como antibióticos, possuem funções na inflamação, cicatrização de feridas, e regulação do sistema imuno adaptativo (Pathan et al., 2010). Obviamente a pressão natural seletiva tem otimizado essas biomoléculas para além do que pode ser previsto unicamente em função da sua natureza química.

O bioma marinho dispõe de uma enorme biodiversidade, porém o ambiente marinho é relativamente pouco explorado em termos de potenciais farmacológicos. Ele contém uma enorme diversidade de espécies que evoluíram em estreita proximidade com os microrganismos.

Como os invertebrados dependem apenas da imunidade inata, incluindo PAMs, para combaterem os agentes infecciosos, acredita-se que os efeitos imunes desses animais são inibidores eficazes e rápidos de crescimento microbiano (Sperstad et al., 2011). Neste contexto os organismos marinhos se destacam, pois são fontes ricas de diversos compostos bioativos. Recentemente, um grande interesse tem sido expresso em relação aos derivados de peptídeos bioativos marinhos por causa de seus numerosos efeitos benéficos à saúde (Kim & Wijesekara, 2010).

Peptídeos bioativos, extraídos de animais marinhos, podem ser usados como matéria-prima para a produção de versáteis produtos farmacêuticos para humanos, com atividades anti-hipertensiva, antioxidante, anticoagulante, antimicrobiana entre outras. Kim e Wijesekara (2010) oferecem uma visão geral sobre peptídeos bioativos marinhos e suas atividades biológicas com potenciais aplicações como ingredientes em alimentos funcionais, nutracêuticos e produtos farmacêuticos (Kim & Wijesekara, 2010).

Numerosos compostos são isolados a partir de animais marinhos, que exibem citotoxicidade específica e não específica. Os avanços na biologia molecular e ferramentas computacionais permitiram uma melhor triagem e compreensão do funcionamento dessas substâncias. Compostos isolados de tunicados, entre outras espécies marinhas, como esponjas, podem fornecer tratamentos terapêuticos esperados, como já mostram muitos compostos de tunicados de grande relevância clínica, visando tumores específicos (Cooper & Yao, 2012).

1.2 Resistência microbiana

Microrganismos multirresistentes são um problema mundial, pois não obedecem fronteiras internacionais e podem afetar de forma indiscriminada os membros de todas as classes socioeconômicas. O tratamento de infecções em todo o mundo é comprometido pela emergência de bactérias que são resistentes a vários antibióticos. Neste cenário as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causadoras de doenças

infecções graves em mamíferos têm se tornado um problema crescente para a medicina em todo mundo (Aleksun & Levy, 2007).

Ao longo das últimas décadas, observa-se um número crescente de microrganismos patogênicos, que têm se tornado cada vez mais resistentes aos antibióticos convencionais (Snell, 2003). Esse problema afeta especialmente indivíduos imunocomprometidos, embora o número de indivíduos sem problemas imunológicos tenha aumentado. (Harrison, Abdel-rahman, Miller, & Strong, 2014).

Existem vários estudos demonstrando que padrões de uso de antibióticos afetam significativamente os índices de desenvolvimento de resistência. A extensa aplicação de fármacos antimicrobianos tem criado um estresse ambiental para os microrganismos, que iniciam então mutações induzidas. Algumas bactérias apresentam mutação positiva, que lhes permitem sobreviver, se reproduzir e, em seguida, passar novas características para seus descendentes (Pathan et al., 2010).

Fatores que contribuem para a resistência incluem o uso inadequado de antibióticos pelos pacientes, diagnósticos incorretos, prescrições desnecessárias, impregnação de utensílios domésticos e brinquedos para crianças com baixos níveis de antibióticos, administração de antibióticos em animais para prevenir, controlar, tratar doenças e para promover o crescimento de animais produtores de alimentos (Levy, 2001; Pathan et al., 2010).

É relatado que o antibiótico penicilina perde facilmente sua atividade antimicrobiana, devido à aquisição de resistência pela cepa microbiana (Zasloff, 2002). Outro exemplo é o uso excessivo de cefalosporinas de 2ª e 3ª gerações, que aceleram significativamente o desenvolvimento de resistência à metilina (Pathan et al., 2010).

As bactérias Gram-negativas são normalmente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as Gram-positivas. Uma explicação para isso é a presença da barreira de permeabilidade da membrana externa para o primeiro e ausente no segundo, o que limita o acesso dos agentes antimicrobianos para os seus alvos nas células bacterianas (Vaara, 1992). Em muitos casos, a resistência é intrínseca e ocorre independentemente de mutações ou a aquisição de exógenos determinantes de resistência (Poole, 2001).

É também importante destacar as infecções fúngicas, que se tornaram uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imune comprometidos. A resistência antifúngica tem sido tradicionalmente classificada como primária

(intrínseco), presente antes da exposição aos antifúngicos, ou secundária (adquirida), que se desenvolve após a exposição ao antifúngicos, devido às alterações genotípicas estáveis ou transitórias. Um terceiro tipo de resistência antifúngica é descrita como "resistência clínica", que engloba a progressão ou recaída de uma infecção por um isolado de fungos (Kontoyiannis & Lewis, 2002).

Apesar do aumento da consciência e de melhores estratégias de tratamento, persiste o desenvolvimento frequente de resistência às drogas antifúngicas utilizadas em ambientes clínicos. Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos, ainda existe grande incidência de micoses e de complexidade no tratamento, que podem ser atribuídos à maior emergência de resistência à terapia antifúngica (Srinivasan, Lopez-ribot, & Ramasubramanian, 2014). É importante destacar que esta condição é agravada especialmente em pacientes com imunidade comprometida.

Nos EUA, entre 2013 e 2014, nos 19.262 transplantes de órgãos realizados, houve um aumento concomitante na susceptibilidade de pacientes imune comprometidos para infecções fúngicas invasivas. Apesar de existirem boas estratégias de tratamento, observa-se frequentemente o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antifúngicos utilizados. Assim, a busca por novos e melhores antifúngicos deve ser mais estudada, a fim de se identificarem novas classes de fármacos direcionados aos alvos, de forma que não promovam resistência ao medicamento (Srinivasan et al., 2014).

Várias estratégias têm sido utilizadas como meios para superar a resistência antifúngica, como: o aumento da dose antifúngica; novos sistemas de entrega, que buscam melhorar o índice terapêutico; terapia com combinações de antifúngicos; cirurgia para lesões isoladas; imunomodulação; entre outras (Kontoyiannis & Lewis, 2002).

Neste contexto de emergência de microrganismos resistentes, os PAMs se destacam como uma nova abordagem para o desenvolvimento de medicamentos (Harrison et al., 2014), pois geralmente exibem seletividade, amplo espectro de ação antimicrobiana, ação rápida e diferentes mecanismos de ação contra células patogênicas. Sendo assim os PAMs atraem um crescente interesse em aplicações biomédicas, mostrando-se potenciais em aplicações clínicas (He & Lazaridis, 2013)

Uma alternativa à resistência microbiana são os peptídeos catiônicos. Eles geralmente apresentam um papel de destaque no sistema de defesa antimicrobiano de

hospedeiros, em toda a natureza. Destacam-se potencialmente como uma nova classe de agentes antimicrobianos altamente ativos e oferecem um caminho para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos, mais eficientes contra microrganismos patogênicos. Os PAMs são conhecidos por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas, bem como atividade contra protozoários (Boland & Separovic, 2006; Giacometti et al., 2000; R. E. Hancock & Scott, 2000; Lorin et al., 2005; Oyston, Fox, Richards, & Clark, 2009; Seo, Won, Kim, Mishig-Ochir, & Lee, 2012).

Estudos de laboratório e clínicos confirmam que o surgimento de resistência contra PAMs é menos provável do que a observada para os antibióticos convencionais. Esta informação forneceu grande impulso para o estudo e desenvolvimento de novos PAMs naturais, sintéticos ou modificados para produção de novos agentes terapêuticos (Zasloff, 2002).

1.3 Aplicações terapêuticas

Atualmente existe um crescente número de peptídeos em ensaios clínicos, mostrando um futuro longo e seguro para medicamentos formulados a partir de biofármacos (Olmez & Akbulut, 2012).

Estudos sobre os mecanismos de resistência podem ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos. Ao enfrentar esse problema crítico, precisa-se estar ciente da fluidez do genoma microbiano e da relativa facilidade com que a resistência pode surgir por mutação ou aquisição de genes. Frente ao potencial surgimento de resistência, devem-se buscar novas relações para a descoberta de novos agentes, tão urgentemente necessários, para curar doenças infecciosas (Aleksun & Levy, 2007).

Peptídeos antimicrobianos têm aplicações terapêuticas notáveis para a humanidade. Eles chamam a atenção dos pesquisadores nos últimos anos por causa de sua boa eficiência no combate contra patógenos. Os PAMs apresentam a capacidade de matar rapidamente um amplo espectro de micro-organismos, até mesmo multirresistentes.

Deve-se esclarecer que a maioria destes peptídeos são encontrados na natureza e são isolados a partir de uma diversidade de organismos, por isso, são ótimos candidatos a novos substitutos de antibióticos convencionais. Muitos pesquisadores

tem tentando desenvolver plantas com genes, que codificam PAMs em plantas transgênicas para diversas aplicações: na alimentação, agricultura e indústrias médicas. Porém, antes do peptídeo ser aceito como aplicável pelos órgãos reguladores, existe um longo caminho a percorrer (Pathan et al., 2010).

Vários PAMs atualmente estão passando por testes de laboratório, sendo que muitos já atingiram ensaios clínicos (Reddy, Yedery, & Aranha, 2004; Seo et al., 2012). Faccone e colaboradores (2014) analisaram um grupo de peptídeos catiônicos antimicrobianos, quanto às suas propriedades físico-químicas, incluindo suas estruturas por dicroísmo circular e estudaram as suas propriedades antimicrobianas contra uma gama de isolados clínicos, que expressam diferentes mecanismos de resistência. Três peptídeos catiônicos α -helicoidais exibiram atividades antimicrobianas comparáveis e até melhores que o omiganan (MBI-226), peptídeo catiônico análogo ao indolicidina, um dos PAMs mais estudados, que terminou recentemente ensaios clínicos de Fase II (identificador ClinicalTrials.gov: NCT00608959). No momento, vários PAMs catiônicos de uso tópico e/ou parenteral vêm sendo estudados, muitos em fase III de ensaios clínicos concluídos (Andre & Dimarcq, 2004).

Apesar das dificuldades enfrentadas, existem vários casos de sucesso do uso de PAMs, podendo ser empregados na agricultura como inseticidas e na indústria de alimentos como conservantes, indicando um futuro promissor para a aplicação extensiva destes peptídeos. Embora muitos PAMs estejam em ensaios clínicos (Andre & Dimarcq, 2004), até o momento poucos foram aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). A nisina, um polipeptídeo antimicrobiano de origem bacteriana, produzido pelo *Lactococcus lactis subsp. Lactis.*, apresenta atividade contra os microrganismos, que podem causar deterioração dos alimentos e contra patógenos associados aos alimentos. Ele é amplamente aplicado em aditivos alimentares, cosméticos, pomadas, injeções, etc. Aprovado pela Organização Mundial da Saúde / Organização Mundial da Alimentação e Agricultura (FAO / OMS), ele também faz parte da lista da agência americana de medicamentos (FDA) de GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), o que significa que seu uso em alimentos é seguro e inofensivo para os seres humanos (Ibarguren et al., 2014).

Verifica-se que a administração oral de proteínas e peptídeos é um campo de investigação em desenvolvimento, pois existem inúmeros desafios que limitam sua biodisponibilidade eficaz. A administração por via oral bem sucedida requer o

cumprimento de três tarefas principais: a proteção das macromoléculas de degradação no trato gastrointestinal (TGI), a permeação através da barreira intestinal e a absorção das moléculas para uma circulação sistêmica. Formulações orais clinicamente úteis são desenvolvidas, mas várias tentativas têm sido realizadas para ultrapassar os desafios de baixa biodisponibilidade oral, resultante da baixa permeação, absorção e degradação enzimática no TGI (Choonara et al., 2014).

Estratégias atuais tentam fornecer uma proteção estrutural para macromoléculas e a absorção melhorada através do uso de inibidores de enzimas, intensificadores de absorção, sistemas de entrega polimérico, nanoencapsulamento e modificações químicas (Choonara et al., 2014). Nanoestruturas têm sido utilizadas como veículos de fármacos no uso de nanocompostos supramoleculares discretas, como carreadores de drogas (Lin & Cui, 2015).

1.4 Relação estrutura-atividade dos PAMs

PAMs são relativamente curtos contendo de 12 a 50 resíduos de aminoácidos. Eles são normalmente formados por aminoácidos hidrofóbicos, hidrofílicos e catiônicos (carga líquida +2 a +9). Seu arranjo espacial geralmente é anfipático e helicoidal (Hale & Hancock, 2007).

Duas características são comuns para os PAMs: uma carga catiônica e uma proporção significativa de resíduos hidrofóbicos. O primeiro promove seletividade para interações eletrostáticas com as membranas citoplasmáticas e membranas de mamíferos zwitteriônicas, enquanto que o segundo facilita a interação com as cadeias de ácidos graxos (Nguyen et al., 2011).

Os peptídeos podem possuir três diferentes níveis de estruturação. A estrutura primária, nível estrutural mais simples, é constituída pelos resíduos de aminoácidos, ligados covalentemente, em uma cadeia polipeptídica. A estrutura secundária constitui os arranjos estáveis, conformação que assumem no espaço. E finalmente a estrutura terciária, que mostra os aspectos do enovelamento tridimensional, tal estrutura é estabilizada por ligações covalentes, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações fracas de van der Waals e interações hidrofóbicas.

Constata-se que a diversidade estrutural de PAMs descobertos até hoje é tão elevada que é difícil classificá-los, exceto por a sua estrutura secundária, que relaciona

a forma que segmentos da cadeia polipeptídica assumem no espaço. PAMs podem ser classificados em quatro grupos principais com base em suas estruturas secundárias: peptídeos em α -hélice, conformações β , estendidos e dobrados, sendo as duas primeiras mais comumente observadas (R. E. Hancock & Lehrer, 1998; Zasloff, 2002).

Os PAMs α -helicoidais magainina, cecropina e pexiganan constituem uma classe representativa de PAMs, que apresentam uma das classes mais bem estabelecidas em relação a estrutura-atividade. Esses peptídeos geralmente apresentam estruturas randômicas em solução aquosa e se estruturam em hélices anfipáticas ou conformações β na presença de membranas ou meios miméticos (Seo et al., 2012).

Os PAMs formados por conformações β , tais como α -, β -defensinas e protegrina, são estabilizados por pontes dissulfeto, formando estruturas relativamente rígidas. Eles se inserem inclinados ou perpendicularmente na bicamada lipídica para formar poros toroidais, ocorrendo interações entre as regiões hidrofílicas dos peptídeos com os grupos de cabeça polares das membranas (Seo et al., 2012).

Os PAMs podem romper as membranas bacterianas através de diversos mecanismos de ação. Eles podem apresentar mudanças conformacionais durante sua interação com a membrana (Galdiero et al., 2013). Assim estudos teóricos e experimentais de interação se fazem necessários para a compreensão da relação estrutura e mecanismo de interação. Por conseguinte, a relação entre a sequência de aminoácidos, a estrutura tridimensional e a função biológica das proteínas constitui uma das áreas mais estudadas da biologia molecular e bioquímica.

1.5 Mecanismo de ação

Estudos mostram que os PAMs alcançam a sua atividade antimicrobiana por perturbarem vários processos celulares importantes, além de poderem apresentar vários mecanismos de ação (Hale & Hancock, 2007; Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006a; Oren & Shai, 1998; Sato & Feix, 2006; Yeaman & Yount, 2003; Zasloff, 2002).

O alvo de PAMs apresenta uma diferença clara e fundamental na estrutura das membranas de microrganismos e animais multicelulares. Como se observa na Figura 1.3, as membranas bacterianas são organizadas de tal modo que a face externa da bicamada, contém predominantes fosfolípidos com cabeça polar carregada negativamente. Em contraste, a face externa das membranas de plantas e animais é

composta principalmente de lipídeos sem carga, a maior parte dos lipídeos com grupos cabeças com carga negativa são segregados no face interna, virado para o citoplasma (Zasloff, 2002).

Devido a essas diferenças, as forças que regem às interações, bem como os mecanismos de ação dependem tanto da estrutura do peptídeo como da estrutura do alvo, que irão determinar a afinidade destes, levando a uma maior ou menor especificidade e atividade. As interações peptídeo-alvo envolvem alterações conformacionais e oligomerização mediante a interação de PAMs com lipídeos. As propriedades dessas ligações dependem das propriedades físico químicas contidas na sua sequência de aminoácidos, isto é, carga positiva líquida, anfipaticidade e hidrofobicidade, bem como dependência com a concentração e agregação em um ambiente de membrana (Mahalka & Kinnunen, 2009).

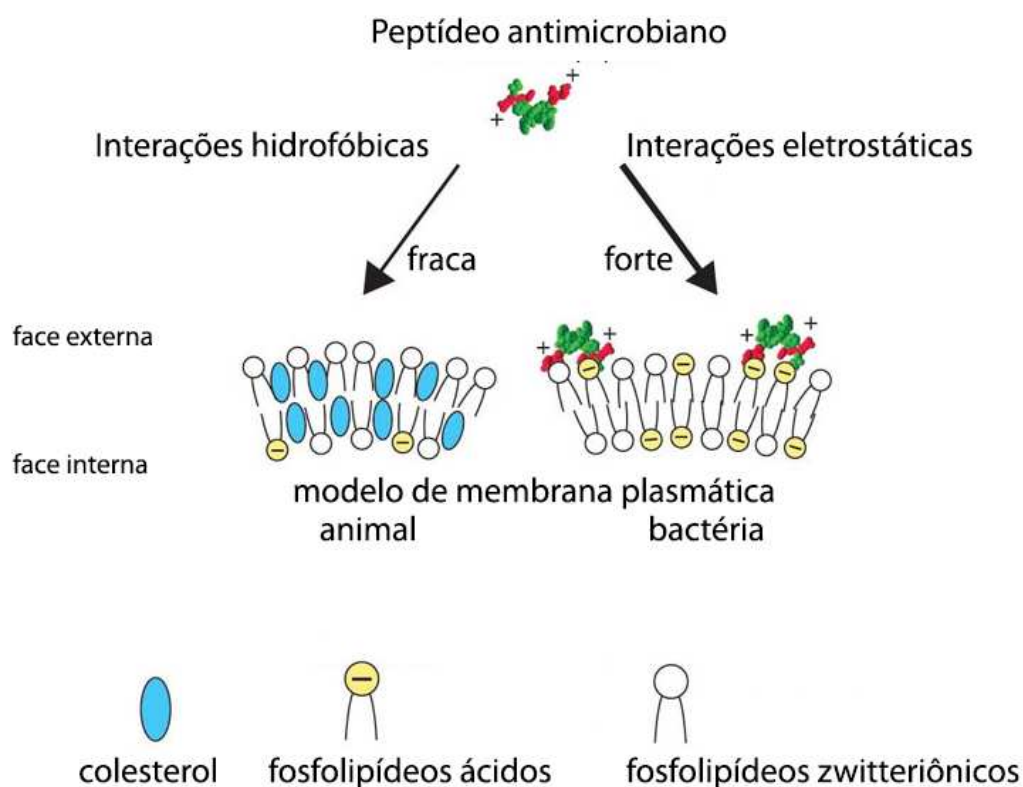


Figura 1.3. Membrana alvo de peptídeos antimicrobianos com base na especificidade. Modificado de (Zasloff, 2002).

Acredita-se que grande parte da atividade antimicrobiana e citotoxicidade derivam das interações diretas com a membrana lipídica que rodeia as células alvo, provocando a sua permeabilização. A forma de permeabilização tem sido explicada em

termos de diferentes modelos, tais como: formação de barril, carpete, Shai Matsuzaki Huang (SMH), poro toroidal e detergente (Oren & Shai, 1998; Yeaman & Yount, 2003; Zasloff, 2002).

Um modelo que explica a atividade da maior parte dos PAMs é o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH). Esse modelo propõe a interação de pequenos peptídeos com a membrana, seguida do deslocamento de lipídeos e alteração da estrutura da membrana. O poro formado favorece a passagem do peptídeo, permitindo a sua entrada para o interior da célula alvo. Desta forma, esse mecanismo propõe que os peptídeos podem ter como alvo o rompimento da bicamada lipídica e a interação com alvos intracelulares (Zasloff, 2002).

Mahalka e Kinnunen mostram que a função tóxica dos PAMs está intimamente ligada a dobragem/agregação, juntamente com uma sequência altamente interconectada de eventos. Inicialmente ocorre a associação eletrostática entre o peptídeo não estruturado e a superfície da membrana. A segunda etapa envolve processos simultâneos: intercalação na bicamada com o peptídeo paralelamente ao longo do plano da camada da membrana, alteração conformacional, emparelhamento de íons de fosfolipídios com os resíduos positivos do peptídeo. Finalmente, ocorre a reorientação e a inserção do peptídeo na membrana, tornando o seu eixo, longo, perpendicular à superfície da monocamada, orientadas mais ou menos paralelamente ao plano da bicamada, podendo formar agregados, oligômeros, e, por fim, a permeabilização da membrana (Mahalka & Kinnunen, 2009).

Embora o modo de ação envolva perturbar a integridade da membrana citoplasmática de bactérias de várias maneiras, existem também mecanismos antimicrobianos, que afetam a viabilidade dos microrganismos a partir da interação com alvos intracelulares importantes, incluindo DNA e síntese de proteína, dobramento de proteínas, atividade enzimática e síntese da parede celular (Nicolas, 2009).

Tendo em vista a importância dos PAMs e a notória necessidade do conhecimento da estrutura terciária desses, o presente trabalho apresenta a determinação da estrutura terciária dos PAMs clavanina A e *Cm-p1*, provenientes de animais marinhos, bem como de um análogo do peptídeo *Cm-p1* modificado.

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 (B Bechinger, 1999; Brogden, 2005; Papo & Shai, 2003; Rinaldi, 2002; Valcarcel *et al.*, 2001). Os mecanismos propostos para peptídeos em α -hélice são: formação de barril, *carpete*, *Shai Matsuzaki Huang* (SMH), *poro toroidal* e *detergente*.

O modelo *carpete* (*Carpet-like*), 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).

O modelo *poro toroidal* 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. 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).

O mecanismo *barrel-stave*, 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 acúmulo dos monômeros, (Sanderson, 2005).

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

O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH), 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, Fontes, Sebben, & Castro, 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 (Reddy et al., 2004; Zasloff, 2002).

O modelo de detergente (*detergent-like*), 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 (Peptide, Wildman, Lee, & Ramamoorthy, 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 fosfolípídios, se reorientado para o interior da membrana hidrofóbica. Assim, ocorre a desintegração da membrana pelo rompimento da bicamada (Burkhard Bechinger & 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, Gorfe, Kim, & McCammon, 2008).

1.7 Peptídeos estudados

1.7.1 *Styela clava*

O invertebrado marinho *Styela clava* (Figura 1.4) apresenta aproximadamente 10 cm de comprimento podendo chegar até 20 cm. São sésseis, pois não se deslocam voluntariamente do seu local de fixação, aderindo-se geralmente a superfícies duras. Ocorrem geralmente em regiões entre marés com profundidade acima de 25 m (Saúde, 2012), e em regiões com variações de temperaturas entre -2 e 23 °C, sendo a variação de temperatura um fator que influencia seu crescimento (Kang et al., 2015).

O organismo *S. clava* possui peptídeos bioativos, encontrados em suas células sanguíneas. Estudos mostram que os granulócitos eosinófilos e macrófagos do *S. clava* contêm quantidades substanciais de Clavaninas styelinas. Tal estudo sugere que estes peptídeos desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra micro-organismos (Menzel, Hee, Sjostrand, & Lehrer, 2002).

Provenientes deste microorganismo, tem-se o conhecimento de quatro peptídeos catiônicos chamados clavaninas A, B, C e D. Todos eles são compostos, cada um, por 23 resíduos de aminoácidos, sendo 18 comuns aos quatro. Esses peptídeos foram isolados originalmente em 1997 por Lee e colaboradores e foram classificados como peptídeos anfipáticos helicoidais, pertencentes à família de PAMs de largo espectro.

Esses peptídeos apresentam considerável homologia estrutural e funcional com a magainina 1, um peptídeo antimicrobiano bem caracterizado, retirado da pele da rã *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987). A clavanina A (entre Leu-5 e Phe-19), comparada à magainina 1 (entre His-2 e Phe-16), apresenta 12 similaridades, seis resíduos idênticos e 6 substituições conservativas, contudo magainina 1 é rica em lisinas e o peptídeo clavanina A rico em histidinas.



Figura 1.4. Imagem doTunicado *Styela clava*, dele foram extraídos os peptídeos antimicrobianos clavanins. (<http://www.european-marine-life.org/32/photo.php?scr=clã&url=32/photos-600x400/styela-clava-wb02-600x400.jpg>, acessado em 06/02/2015).

O peptídeo clavanina A é naturalmente amidado na porção C-terminal e contém 23 resíduos de aminoácidos, possui massa molar de 2,67 kDa, e se destaca dos outros três peptídeos por apresentar uma maior atividade antimicrobiana e imunomodulatória. Distingue-se de outros PAMs por ser rico em histidinas, glicinas e resíduos hidrofóbicos, como fenilalaninas e valinas. Esse peptídeo, especificamente, se mostra interessante, pois apresenta um amplo espectro de atividades contra bactérias Gram-positivas (*Micrococcus flavus*, *Lactobacillus sake* e *S. aureus*, inclusive cepas resistentes a meticilina) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*), além do fungo (*C. albicans*) (I.Hee Lee et al., 1997; Lehrer, Lee, Menzel, Waring, & Zhao, 2001). Quanto

à sua toxicidade, ensaio de atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos, revelaram uma baixa taxa de hemólise contra células de vertebrados (Löfgren, 2007).

Estudos demonstram que clavanina A permeabiliza membranas alvo via dois mecanismos distintos e dependentes do pH. A um pH baixo, a clavanina A é um agente antimicrobiano mais potente que em meio neutro. Existem indícios de que os hemócitos de tunicados como *S. clava* contêm compartimentos celulares específicos com um pH 5,0. Quando o tunicado armazena seus peptídeos clavaninas em compartimentos especializados de pH baixo, que não possuem a membrana alvo específica, o hospedeiro está protegido contra seus próprios peptídeos (Aring, 2003; Ellen J. M. van Kan, Demel, Breukink, van der Bent, & de Kruijff, 2002).

Quando testado em condições de baixa força iônica, a clavanina A mostrou pouca atividade contra *C. albicans* em pH 7,4, porém apresentou atividade bastante significativa em pH 5,5 (In Hee Lee, Cho, & Lehrer, 1997). A relativa falta de atividade de peptídeos ricos em histidina em meio neutro, porém mais ativo em meio ácido revela-se especialmente vantajoso, pois, um peptídeo como a clavanina A pode ser considerado uma alternativa farmacêutica contra microrganismos patogênicos, que agem em regiões de meio ácido ou que produzem tal acidez.

Microrganismos patogênicos muitas vezes causam mudanças dramáticas no meio em que se encontram, como resultado do crescimento excessivo e atividades metabólicas. Sendo assim novos PAMs, que detectam a alteração ambiental causada por agentes patogênicos, podem levar à produção de um antibiótico seletivo sem efeitos adversos. Um exemplo é a bactéria *S. mutans*, que provoca grande diminuição no pH e desmineralização do dente. Também a *C. albicans*, um fungo patogênico resistente a múltiplas drogas, responsável por causar candidíase, acidifica os seus micro nichos (Aoki, Kuroda, & Ueda, 2012).

1.7.2 *Cenchritis muricatus*

O caracol marinho *Cenchritis muricatus*, animal marinho invertebrado, habita paredes rochosas verticais supra litoral ao longo das costas do Caribe, podendo ser encontrado acima da zona de mergulho. Esses caramujos podem resistir à perda de água de até 23% de sua massa corporal, sobrevivendo a condições extraordinárias de carga térmica e dessecação (Judge, Duell, Burriesci, & Moarsi, 2009).

O peptídeo *Cm-p1* pode ser extraído do *Cenchritis muricatus* (Figura 1.5). Esse peptídeo mostrou-se importante no desenvolvimento biotecnológico, podendo ser útil à saúde humana na solução de problemas agroindustriais.



Figura 1.5. Imagem do caracol marinho *Cenchritis muricatus*. Dele pode ser extraído o peptídeo antifúngico *Cm-p1*. (<https://www.flickr.com/search/?q=Cenchritis%20muricatus>. Por Sergio Gonzalez, acessado em 06/02/2015).

O peptídeo *Cm-p1* apresentou capacidade de impedir o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos, com concentração inibitória mínima (MIC) de 7 μM para *C. albicans* e 3 μM para *Trichophyton rubrum*, não exibindo efeitos nocivos às células de mamíferos (Tabela 1.2) (López-Abarrategui et al., 2012).

Tabela 1.2 Atividade antifúngica do peptídeo *Cm-p1* contra diferentes leveduras e fungos (López-Abarrategui et al., 2012).

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima (μM)
<i>Botrytis cinérea</i>	20
<i>Fusarium oxysporum</i>	20
<i>Aspergillus niger</i>	41
<i>Candida albicans</i> 01U	13
<i>Candida albicans</i> 38U	7

Microrganismo	Concentração Inibitória Mínima (μM)
<i>Candida parapsilosis</i>	105
<i>Cryptococcus neoformans</i> L26	209
<i>Cryptococcus neoformans</i> L30	209
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	3

Sua atividade contra *C. albicans* se mostra importante, pois esse é um dos principais fungos causadores de infecções hospitalares. Sendo, dessa forma, uma alternativa viável à prevenção e ao combate dessas infecções. Já o *Trichophyton rubrum* é um agente causador de dermatomicoses superficiais. Os dermatófitos crescem na pele, unha e cabelo, pelo uso das próprias proteínas do hospedeiro, principalmente queratina, como nutriente (Komoto et al., 2015).

O desenvolvimento de novos antifúngicos se mostra importante, já que os fungos patogênicos apresentam um complexo mecanismo de resistência a drogas antifúngicas (Kontoyiannis & Lewis, 2002). Estudos de incorporação do peptídeo antimicrobiano Cm-p1, em sistemas de liberação controlada de fármacos, foram realizados buscando o aumento da solubilidade dessas moléculas e a melhora na sua estabilidade. O sistema de liberação obtido, utilizando nanofibras de Cm-p1-PVA, permitiu a liberação do peptídeo por três dias, porém prejudicou a atividade do peptídeo, provavelmente devido à formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amino do fármaco e os grupamentos hidroxila do PVA (álcool poli-vinílico), levando à desativação da droga, devido à alta polaridade do átomo de oxigênio dos grupamentos hidroxila do PVA (Flávia, 2014).

1.8 Ressonância Magnética Nuclear no contexto estrutural

A atividade dos peptídeos não é determinada somente pela sequência de aminoácidos específicos, mas também pelos parâmetros estruturais globais, tais como helicidade, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, carga e tamanho do domínio hidrofóbico/hidrofílico (M Dathe & Wieprecht, 1999). Tais fatores influenciam as interações dos peptídeos com as membranas, resultando em um equilíbrio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Margitta Dathe et al., 1997). Nas interações

hidrofóbicas as cadeias laterais dos aminoácidos apolares são separados em faces distintas em relação as cadeias polares. Sendo isso decisivo para a interação e indução da permeabilidade em membranas com superfície de carga pouco negativa. A afinidade do peptídeo pela membrana é aumentada pelas interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos carregados positivamente e os grupos cabeça polares de fosfolípídeos carregados negativamente. Já as interações eletrostáticas mantêm os peptídeos na superfície da bicamada lipídica, perturbando-a, através da formação de pequenos poros, que podem atuar como canais iônicos, permitindo a entrada e saída indiscriminada de íons da célula (M Dathe et al., 1996). As mudanças conformacionais dos peptídeos são favorecidas, devido serem direcionados 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).

Existem três técnicas capazes de propor modelos estruturais de peptídeos e proteínas com detalhes em nível atômico. São elas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), microscopia eletrônica e cristalografia de raios-X (Protein data bank, 2013). Das 106.517 estruturas depositadas no Protein Data Bank (PDB) 10.839 estruturas foram resolvidas por RMN entre proteínas, ácidos nucleicos e outros (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, acessado em 11/12/2015), 94.688 por Raio-X e 732 por microscopia eletrônica. Das 334 estruturas depositadas no Banco de dados de peptídeos antimicrobianos (APD), 228 possuem coordenadas depositadas no Protein Data Bank (PDB), sendo que do total de 334 peptídeos com estrutura tridimensional depositadas, 295 foram elucidadas por RMN e apenas 39 por difração de raios-X (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, acessado em 12/02/2015).

A espectroscopia de RMN se destaca na determinação conformacional de macromoléculas, por ser a única capaz de fornecer informações estruturais em solução (Veglia & Ramamoorthy, 2010), possibilitando mimetizar o ambiente das membranas e permitindo estudar as interações ligante-alvo (Lucas & Larive, 2004). Esta técnica se destaca devido à grande quantidade de informações, que podem ser extraídas a partir dos dados experimentais, aumentando a confiabilidade das estruturas obtidas (Chris A.E.M. Spronk, Nabuurs, Krieger, Vriend, & Vuister, 2004).

Os aminoácidos presentes na cadeia peptídica são ricos em hidrogênio, que possuem spin $\frac{1}{2}$, por isso os peptídeos são excelentes alvos para estudos por RMN em solução. Cada resíduo de aminoácido constitui pelo menos um sistema de spins, conectado com composições químicas e estruturais diferentes, mas com padrões equivalentes, de tal modo que os deslocamentos químicos de hidrogênio e o número esperado de sinais aparecem agrupados por características químicas em regiões distintas num espectro de RMN (Wider & Wüthrich, 1999).

A espectroscopia de RMN permite chegar ao conhecimento da estrutura terciária de peptídeos e proteínas, bem como pode ser crucial para uma proposta de seu mecanismo de interação com a membrana, o que é essencial no desenvolvimento de novos fármacos peptídicos (Zelezetsky & Tossi, 2006). Os atuais desenvolvimentos da espectroscopia de RMN, a torna uma técnica muito eficiente no monitoramento e discriminação de processos moleculares, como mudanças conformacionais em solução (Thennarasu, Lee, Tan, Prasad Kari, & Ramamoorthy, 2005). A investigação dos movimentos dinâmicos pode fornecer informações úteis sobre a interação peptídeo-receptor, permitindo caracterizar detalhes termodinâmicos e cinéticos de interação (Chi et al., 2002).

Esses conhecimentos direcionam os pesquisadores ao planejamento racional de novos fármacos, de forma que tais informações possam ser exploradas com finalidades biomédicas e biotecnológicas (Barreiro 2002), possibilitando a máxima exploração do potencial terapêutico dessas moléculas.

Devido aos impressionantes avanços científicos e tecnológicos da biologia estrutural e da química computacional, é possível o planejamento de novos fármacos a partir do entendimento da relação entre a estrutura química e a atividade biológica da molécula de interesse (Olmez & Akbulut, 2012). A correta eleição do alvo-terapêutico mais adequado, bem como o desenho estrutural de um novo protótipo dependem do conhecimento prévio da estrutura conformacional, bem como o entendimento de sua interação com o alvo. Desta forma, o novo composto pode ter sua eficácia otimizada através de modificações planejadas, preservando ou aumentando suas propriedades farmacológicas (Vlieghe et al., 2010).

Portanto, os dados obtidos através da espectroscopia de RMN fornecem informações que podem ser relevantes à potencialidade e à seletividade de peptídeos e proteínas. Tais informações mostram as interações moleculares importantes na

interação com o alvo biológico, destacando a contribuição e a importância de cada aminoácido, bem como a distribuição das cargas e o efeito da anfipaticidade ao longo da estrutura (Veglia & Ramamoorthy, 2010).

1.9 Validação das estruturas

No processo de determinação da estrutura tridimensional de peptídeos, as informações fornecidas pelos experimentos de RMN bidimensionais, tais como TOCSY (Espectroscopia de Correlação Total), NOESY (Efeito Nuclear Overhauser), HSQC (Espectroscopia heteronuclear de Simples Quantum) e HMQC (Espectroscopia Heteronuclear de Múltiplo Quantum), são empregadas na atribuição dos sinais de cada núcleo, bem como no fornecimento de restrições de ângulos diedro e distâncias inter atômicas. Esses dados são utilizados na modelagem molecular, fornecendo estruturas, sendo as de menor energia selecionadas. Posteriormente, a validação dessas estruturas propostas é um passo muito importante, pois fornece uma indicação da confiabilidade do modelo (Nabuurs, Spronk, Vriend, & Vuister, 2004).

A incerteza nas coordenadas moleculares pode ser descrita usando o desvio das coordenadas RMSD (Desvio padrão quadrático médio). Tal parâmetro pode ser utilizado como uma medida da qualidade na determinação da estrutura. Presume-se que os valores mais baixos de RMSD indicam resultados mais precisos e melhores. Porém, a variação nas coordenadas refletem a dinâmica interna da molécula. Portanto, para se obterem estatísticas adequadas à precisão, os modelos devem refletir as incertezas nas distâncias dos dados experimentais, na conversão de dados e dos processos computacionais (Nabuurs et al., 2004).

Para as estruturas de RMN determinadas em solução, é de se esperar que, devido à dinâmica interna, as estruturas sempre exibirão uma variação em torno de uma conformação média. Esta conformação média pode ser determinada como a propagação verdadeira nas coordenadas x, y de um átomo.

Um bom modelo deve se aproximar de uma boa precisão e exatidão. Precisão é a medida da reprodutibilidade de repetir medidas, e pode ser expressa como variância do valor medido ($\bar{x}$) em torno de um valor médio. Exatidão, por outro lado, é a medida da proximidade da medição para o valor verdadeiro. A Figura 1.6 apresenta uma ilustração da relação entre exatidão e precisão para um conjunto de modelos.

		exatidão		
		alta	baixa	
		proximo da referência	distante da referência	conjunto de modelos
Precisão	alta	coordenadas atômicas (10^{-13}), alta precisão sempre 		Modelos muito similares
	baixa	Sem relevância 		Modelos muito diferentes

Figura 1.6 Relação entre precisão e exatidão em um conjunto de modelos. Modificado de Vranken (Vranken, 2014)

Para uma medida exata, com os valores obtidos espalhados em torno da média verdadeira das coordenadas x e y , três situações podem ser encontradas (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004):

a. a variação nas coordenadas ser menor do que a variação física. Neste caso, os valores obtidos são muito precisos e a precisão subestima a variação física (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004);

b. a variação nas coordenadas ser maior do que a variação física, ou seja, os valores que são obtidos não são suficientemente precisos e a precisão superestima a variação física (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004);

c. a variação nas coordenadas ser igual à variância física. Neste caso, a precisão é igual à variância física e essa seria a situação ideal (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004).

Todas as etapas, na determinação estrutural por RMN, envolvem erros experimentais, suposições e simplificações, portanto a situação ideal nunca pode ser alcançada na prática. O efeito cumulativo de erros nos diferentes passos deverá resultar na situação em que a precisão superestima a verdadeira variância (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004).

A Minimização do valor de RMSD leva a conjuntos precisos de estruturas, resultando na situação indesejável, onde a precisão subestima a exatidão e o conjunto, neste caso o modelo não contém qualquer informação sobre algumas das conformações verdadeiramente acessíveis (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004). Por isso, o entendimento destas relações é extremamente relevante na interpretação dos resultados obtidos.

O programa WHAT IF geralmente é utilizado para auxiliar na avaliação da qualidade do modelo obtido. Ele fornece um ambiente inteligente e flexível para a exibição, manipulação, e análise de moléculas pequenas, proteínas e ácidos nucleicos. Várias propriedades geométricas, que são usadas para validar modelos de estrutura, são avaliadas por esse software de validação (Vriend, 1990). WHAT IF analisa indicadores de qualidade de geometrias locais, tal como previsto pelas rotinas de verificação do programa e compara um número de parâmetros a partir da estrutura analisada com aqueles presentes no banco de dados a partir de estruturas de raios-X (Christian A E M Spronk, Linge, Hilbers, & Vuister, 2002).

2.1 Objetivos gerais

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar estudos estruturais de PAMs potenciais para a geração de fármacos, explorados pelo projeto “Rede Pro Centro-Oeste de Bioprospecção e Caracterização Farmacoestrutural de Antimicrobianos”, com o intuito de se estimular o desenvolvimento farmoquímico da região, que se destaca por possuir grandes pólos farmacêuticos.

2.1 Objetivos específicos

- Utilizando-se a espectroscopia de dicroísmo circular, determinar as estruturas secundárias, avaliar a estabilidade dos peptídeos em diferentes condições de pH e temperatura, observando a influência destes na estrutura e consequentemente, na estabilidade, dos peptídeos em estudo.
- Determinar a estrutura conformacional dos peptídeos na presença de micelas que mimetizem a membrana bacteriana, por meio da espectroscopia de RMN, utilizando, para isso, restrições de distância inter atômicas e de ângulos diedros, obtidas a partir dos experimentos.
- Avaliar as propriedades dinâmicas dos peptídeos em estudo.
- Realizar estudos de difusão do peptídeo, utilizando espectroscopia por difusão ordenada RMN-DOSY, para investigar as interações e afinidade dos peptídeos antimicrobianos em diferentes meios.
- Estudar a orientação da interação dos peptídeos com a micela, bem como seu modo de interação.
- Entender o mecanismo de ação dos peptídeos, dirigindo ao desenho de um novo peptídeo, com o intuito de otimizar as suas atividades biológicas.
- Sintetizar um novo peptídeo a partir da modificação na estrutura primária do peptídeo nativo *Cm-p1* e avaliar a influência de tal modificação tanto na estrutura quanto na atividade biológica do novo protótipo.
- Avaliar as propriedades geométricas utilizadas para validar modelos estruturais, junto com os procedimentos e medidas de qualidade implementadas nas análises de validação WHAT IF, Ramachandran e RMSD.

3. Metodologia

Os peptídeos clavanina A e *Cm-p1* fazem parte dos peptídeos de estudo da Rede Pro Centro-Oeste de Bioprospecção e Caracterização Farmacoestrutural de Antimicrobianos. Estes peptídeos sintéticos, no entanto de ocorrência natural, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Octávio Luiz Franco. Já o peptídeo [Phe3]*Cm-p1* foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Estruturas de Biomoléculas (LASEB), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Abaixo são apresentadas suas sequências primárias e suas propriedades físico-químicas.

Peptídeo clavanina A

Código de letras simples	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF-NH ₂
Código de letras triplo	Val-Phe-Gln-Phe-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-His-His-Val-Gly-Asn-Phe-Val-His-Gly-Phe-Ser-His-Val-Phe-NH ₂
Propriedades físico-químicas	
Número de resíduos	23
Massa molecular	2666,13 g/mol
Ponto isoelétrico	pH 10.04
Carga líquida a pH 7	2,4
Solubilidade	Baixa solubilidade em água

Peptídeo *Cm-p1*

Código de letras simples	SRSELIVHQR-NH ₂
Código de letras triplo	Ser-Arg-Ser-Glu-Leu-Ile-Val-His-Gln-Arg-NH ₂
Propriedades físico-químicas	
Número de resíduos	10
Massa molecular	1223,4 g/mol
Ponto isoelétrico	pH 10.87
Carga líquida a pH 7	2,1
Solubilidade	Boa solubilidade em água

Peptídeo [Phe3]Cm-p1

Código de letras simples	SRFELIVHQR-NH ₂
Código de letras triplo	Ser-Arg-Phe-Glu-Leu-Ile-Val-His-Gln-Arg-NH ₂
Propriedades físico-químicas	
Número de resíduos	10
Massa molecular	1283.48 g/mol
Ponto isoelétrico	pH 10.87
Carga líquida a pH 7	2,1
Solubilidade	Boa solubilidade em água

3.1. Dicroísmo Circular (DC)

Os experimentos de DC foram realizados, a fim de se determinarem as condições ideais para a realização dos experimentos de RMN (Sreerama, Venyaminov, & Woody, 2001). Por espectroscopia de DC foram avaliados parâmetros tais como preferências conformacionais e a relação de estabilidade em diferentes pH, temperaturas e concentrações dos meios como: SDS (dodecil sulfato de sódio) (Aniansson, Wall, Almgren, Hoffmann, & Ulbricht, 1976), DPC (Lauterwein, Bösch, Brown, & Wüthrich, 1979) e TFE (2,2,2, trifluoroetanol) (Clare, Martin, & Gronenborn, 1986). O primeiro meio (SDS) mimetiza o ambiente das membranas bacterianas, o segundo meio (DPC) é geralmente utilizado como modelo de membrana nos estudos de interação peptídeo-lipídeo, o terceiro meio (TFE) é chamado de co-solvente é responsável por promover a formação de ligações de hidrogênio em regiões do peptídeo onde há tendência de estruturação α -helicoidal.

Os experimentos de DC, gravados na região do ultravioleta 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. 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, resolução de 0,05 nm e acumulação de 4 varreduras, a 25 °C. A avaliação da estabilidade térmica, do peptídeo em SDS, foi realizada pela variação da temperatura de 25 °C a 95 °C, com incrementos de 10 °C, seguida pelo seu retorno de temperatura.

As análises conformacionais de DC foram realizadas a partir da solução estoque do peptídeo clavanina A e *Cm-p1*. Estas soluções foram diluídas em água deionizada. Tais concentrações foram determinadas através do experimento de espectroscopia UV-VIS, utilizando as relações de Murphy e Kies para peptídeos, que não possuem triptofano em suas sequências (Murphy & Kies, 1960). Foram medidas as absorbâncias em comprimentos de onda (λ) de 205, 215 e 225 nm e calculadas as concentrações de cada peptídeo segundo as equações 3.1, 3.2 e 3.3.

$$K = (A_{215} - A_{225}) \cdot 144 \quad \text{Equação 3. 1}$$

$$T = (A_{205}) \cdot 31 \quad \text{Equação 3. 2}$$

$$C = (K + T) / 2 \quad \text{Equação 3. 3}$$

Onde A é a absorbância da solução da amostra em 205, 215 e 225 nm e C a concentração da amostra (mg.L^{-1})

Os peptídeos foram analisados na presença de SDS (Tabela 3.1) e TFE (Tabela 3.2) em diferentes concentrações e em diferentes pH.

Tabela 3.1 Peptídeos Clavanina A (pH 5) e *Cm-p1* (pH 4) em diferentes concentrações de micelas de SDS, com suas respectivas diluições nas amostras.

Clavanina A		<i>Cm-p1</i>	
[SDS] (mM)	[Peptídeo] (μM)	[SDS] (mM)	[Peptídeo] (μM)
0	41,00	0,00	51,72
0,10	40,97	0,09	51,67
0,20	40,93	0,19	51,62
0,30	40,89	0,28	51,57
0,40	40,85	0,37	51,52
0,50	40,80	0,47	51,48
0,60	40,76	0,56	51,43
0,70	40,72	0,65	51,38
0,79	40,68	0,74	51,33
0,89	40,64	0,84	51,28
0,99	40,60	0,93	51,24
1,96	40,20	1,84	50,76
3,85	39,43	3,61	49,85
7,41	37,97	6,98	48,11
		13,04	44,97
		20,00	41,37

Os tampões utilizados foram: acetato de sódio em pH 3, 4 e 5 e tampão tris HCl em pH 7 e 9, à concentração de 5 mM. As diluições, variando a concentração do meio mimético SDS e TFE, estão apresentadas na Tabela 3.1 e 3.2, respectivamente. Essas tabelas consideram as diluições causadas pela adição do peptídeo, nos experimentos de DC

Tabela 3.2 Peptídeos Clavanina A e *Cm-p1* em diferentes concentrações de TFE, com suas respectivas diluições.

Clavanina A		<i>Cm-p1</i>	
TFE %	[Peptídeo] (μM)	TFE %	[Peptídeo] (μM)
0	37,97	0	0,00
4,4	36,27	4,4	49,67
5	36,06	5	51,72
10	34,14	10	49,08
15	32,22	15	48,76
20	30,30	20	48,36
25	28,39	25	47,91
30	26,47	30	47,36
35	24,55	35	46,70
40	22,63	40	45,92
45	20,71	45	44,92
50	18,79	50	43,71

Com o auxílio das Equação 3.4 e Equação 3.5 (S M Kelly & Price, 2000), os resultados obtidos foram tratados, a fim de se converter a elipticidade observada em elipticidade molar média $[\theta]$ (graus cm²/mol), pela seguinte relação abaixo:

$$\text{MMR} = \frac{MM}{n-1} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$[\theta]_{\text{molar}} = \frac{\text{MMR} \cdot \alpha}{10 \cdot l \cdot c} \quad \text{Equação 3.5}$$

Onde *MM* é a massa molar do peptídeo, *n* é o número de resíduos, α é a elipticidade observada, *l* é o caminho óptico em centímetros e *c* é a concentração do peptídeo em mol/L (Sharon M Kelly, Jess, & Price, 2005).

A estimativa da porcentagem de α -hélice (f_H) máxima teórica dos peptídeos foram encontradas através da Equação 3.6.

$$[\theta]_{222}^{obs} = (f_H - ik/n)[\theta]_{\infty} \quad \text{Equação 3.6}$$

Onde $[\theta]_{222}$ é a elipticidade molar observada, correspondente ao ponto de inflexão na curva, 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) para estruturas helicoidais, n número total de resíduos e $[\theta]_{\infty}$ elipticidade residual máxima para uma hélice de tamanho infinito (-39500 deg.cm².dmol⁻¹) (Chen, Yang, & Chau, 1974).

3.2 Aquisição dos experimentos de RMN

Os experimentos de RMN foram obtidos nas instalações do Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ/UFG), em um espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 (11,75 T), na frequência de 500,13 MHz, para o núcleo de hidrogênio ¹H, 125,76 MHz para ¹³C e 50,68 MHz para ¹⁵N, utilizando-se uma sonda de 5mm de tripla ressonância (TBI).

A solução para análise do peptídeo clavanina A foi preparada, solubilizando-se 2 mM do peptídeo em um volume final de 500µL, sendo 35% TFE-*d*₂₅, 55% de H₂O e 10% D₂O, pH 4,3 e 25 °C.

A amostra do peptídeo Cm-p1 foi preparada, solubilizando-o em 500 µL de solução contendo 90% de H₂O e 10% D₂O e SDS a 100 mM (pH 4,3 e 25 °C). Em todas as análises foram utilizados como o padrão de referência interna o composto TMSP-*d*₄ (trimetilsilil-2,2,3,3-*d*₄ propionato de sódio).

Foram adquiridos experimentos de RMN bidimensionais de ¹H homonucleares : TOCSY ¹H-¹H (*total correlation spectroscopy*) usando a sequência dipsi2esgpph e NOESY ¹H-¹H (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*) com sequência de pulsos noesygpphw5 (Liu et al., 1998), além de experimentos Heteronucleares: *sf-sf*-HMQC ¹H-¹⁵N (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) com sequência de pulsos sfhmqcf3gpph (Schanda & Brutscher, 2005) e HSQC ¹H-¹³C (*Heteronuclear Single*

Quantum Coherence) com sequência de pulsos hsqcetgp. Todos experimentos de RMN foram realizados a 25 °C, exceto os experimentos de variação de temperatura.

A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros utilizados nos experimentos de TOCSY e NOESY: frequência de transmissão (O_1); pulso de radiofrequência de 90° (p_1); janela espectral (SW); número de transientes acumulados (NS); o número de pontos no domínio do tempo (TD) e potência de pré-saturação (PIW_9).

Tabela 3.3 Parâmetros utilizados nos experimentos de TOCSY, NOESY, COSY, HSQC e sf-HMQC. Clavanina A em TFE- d_3 e Cm-p1 em SDS- d_{25} .

Parâmetros	TOSCY	NOESY	COSY	HSQC ^{13}C	sf-HMQC ^{15}N
Clavanina A					
SW (Hz)	6009,615	6009,615	6009,615	$F_2 = 6009,62$ $F_1 = 11319,05$	$F_2 = 11029,41$ $F_1 = 2000,00$
NS	176	64	164	168	8000
O_1 (Hz)	2776,52	2760,41	2750,98	$F_2 = 2786,97$ $F_1 = 4401,52$	$F_2 = 2770,91$ $F_1 = 5979,97$
p_1 (μsec)	10,43	10,31	10,23	8,44	10,51
TD	$F_2 = 4096$ $F_1 = 256$	$F_2 = 4096$ $F_1 = 512$	$F_2 = 4096;$ $F_1 = 256$	$F_2 = 1024$ $F_1 = 256$	$F_2 = 1024;$ $F_1 = 104$
PIW_9 (W)	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$1,10^{-5}$	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$
Tempo de mistura (ms)	80	250	-	-	-
Cm-p1					
SW (Hz)	8012,82	6009,615	6009,615	$F_2 = 8012,820$ $F_1 = 5030,936$	$F_2 = 8802,817$ $F_1 = 2000,00$
NS	160	76	128	172	2556
O_1 (Hz)	2350,94	2350,94	2350,94	$F_2 = 2341,80$ $F_1 = 15593,97$	$F_2 = 2350,90$ $F_1 = 5979,97$
p_1 (μsec)	11,14	11,14	11,14	11,00	11,50
TD	$F_2 =$ 4096; $F_1 = 256$	$F_2 = 4096;$ $F_1 = 512$	$F_2 =$ 4096; $F_1 = 256$	$F_2 = 4096;$ $F_1 = 256$	$F_2 = 4096;$ $F_1 = 256$
PIW_9 (W)	$1,06 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1,62 \cdot 10^{-4}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$	$4,34 \cdot 10^{-5}$
Tempo de mistura (ms)	80	250	-	-	-

Foram realizados vários experimentos de NOESY com diferentes tempos de misturas (60, 70, 80, 100, 200, 250 e 300 ms), com o intuito de se observar o tempo de mistura ideal para a amostra. Nos experimentos bidimensionais TOCSY, NOESY e

HMQC, utilizaram-se o modo de aquisição *States-TPPI* (Marion, Ikura, Tschudin, & Bax, 1989) e nos experimentos HSQC utilizaram-se o modo de aquisição *Echo-antiecho* (Davis, Keeler, Laue, & Moskau, 1992).

Os experimentos de DOSY para o peptídeo clavanina A, na presença de micelas de SDS (100 mM), foram realizados para diferentes concentrações de peptídeo 0,05, 0,1, 0,2 0,4, 0,8 e 1 mM. Isto porque desejava-se saber se haviam apenas interações peptídeo-micela, ou se haviam interações peptídeo-peptídeo-micela. Neste experimento foram utilizados 90% de H₂O e 10% D₂O e pH 4,3. Outros dois experimentos de DOSY foram realizados, modificando-se o meio 2 mM do peptídeo clavanina A em solução de 90% de H₂O e 10% D₂O, em pH 4,3 e o outro com 2 mM de peptídeo em 55% de H₂O, 10% D₂O e 35% de TFE-*d*₃, em pH 4,3. Esses experimentos foram realizados a 25 °C.

Os experimentos de DOSY foram registrados, utilizando-se uma sonda de detecção inversa (TBI) equipada com bobinas geradoras de gradientes de campo no eixo z (campo máximo de 55,0 Gauss.mm⁻¹). Empregou-se a sequência de pulsos *stebpgp*, largura espectral em F₂ de 6009,615 Hz, tempo de aquisição de 0,68 s. Em todos os experimentos de DOSY foram utilizados: número de pontos no domínio do tempo (TD) de 8192 em F₂ e 32 em F₁; tamanho dos dados (SI) 8192 em F₂ e 64 em F₁ e potência de pré-saturação de 9,91 10⁻⁶ W. Os valores da frequência de transmissão (O₁); pulso de radiofrequência de 90° (P₁); o número de experimentos acumulados (NS); para os experimentos em diferentes concentrações estão apresentados na Tabela 3.4. As concentrações foram determinadas com base nas diluições da solução estoque.

Tabela 3.4 Parâmetros utilizados nos experimentos de DOSY.

Parâmetros	
0,05 mM do peptídeo Clav A na presença de 100 mM de SDS-<i>d</i>₂₅	
NS	2308
O ₁ (Hz)	2350,71
p ₁ (µsec)	12,54
0,1 mM do peptídeo Clav A na presença de 100 mM de SDS-<i>d</i>₂₅	
NS	824
O ₁ (Hz)	2350,21
p ₁ (µsec)	11,14

Parâmetros	
0,2 mM do peptídeo Clav A na presença de 100 mM de SDS-d₂₅	
NS	720
O ₁ (Hz)	2352,04
p ₁ (μsec)	11,31
0,4 mM do peptídeo Clav A em 100 mM de SDS-d₂₅	
NS	656
O ₁ (Hz)	2353,32
p ₁ (μsec)	9,68
0,8 mM do peptídeo Clav A na presença de 100 mM de SDS-d₂₅	
NS	560
O ₁ (Hz)	2351,21
p ₁ (μsec)	11,87
1,0 mM do peptídeo Clav A na presença de 100 mM de SDS-d₂₅	
NS	208
O ₁ (Hz)	2349,75
p ₁ (μsec)	11,33
Parâmetros	
2,0 mM do peptídeo Clav A em água	
NS	512
O ₁ (Hz)	2349,47
p ₁ (μsec)	10,59
2,0 mM do peptídeo Clav A na presença de 35% de TFE-d₃	
NS	512
O ₁ (Hz)	2348,61
p ₁ (μsec)	7,54

A rampa de gradiente foi ajustada entre 2 (1,07 G.mm-1) a 95 % (50,8 G.mm-1) da potência total do amplificador do gradiente. Também foram ajustados o tempo de difusão Δ , que corresponde ao intervalo entre a aplicação dos pulsos de perda e recuperação da coerência, o tempo de aplicação do gradiente de campo δ e a percentagem da força do gradiente de campo g.

Com relação à força do gradiente, o mesmo foi calibrado, utilizando-se a água, um composto com coeficiente de difusão conhecido. Com a sequência de pulsos stebppgp1s, realizou-se um experimento de difusão somente da água para se determinar o valor de gama (Hz/G), utilizando-se como referência o valor da difusão padrão da água de $2,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, à temperatura de 25 °C (Mills, 1973). Assim o eixo do coeficiente de difusão das amostras contendo peptídeo pôde ser calibrado com o valor de gama

encontrado. No cálculo de volta da força de gradiente, sem manipulação da função de janela, as áreas foram ajustadas a um único decaimento exponencial.

Os mapas de contornos de DOSY foram trabalhados utilizando o processamento *analyse*, software TopSpin 3.1 (Bruker), modo de análise T_1/T_2 com a finalidade de facilitar a interpretação e a visualização das informações (Zick, 2009). Foram integrados três sinais na região de metila entre 0,7 e 1,3 para o peptídeo clavanin ppm e 0,5 e 1 para o peptídeo Cm-p1. Calculou-se o valor do coeficiente difusão médio desses sinais, para cada experimento.

3.3. Processamento dos dados

Os mapas de contornos foram processados, utilizando-se o programa nmrPIPE (Delaglio et al., 1995). Foram ajustadas a fase e a linha de base e as funções matemáticas de apodização LB (*line-broadening*) e GB (*Lorentz-Gauss*) foram aplicadas para ganho de sensibilidade e resolução, respectivamente. Os mapas de contornos foram visualizados e interpretados com o auxílio do programa NMRView (B. A. Johnson & Blevins, 1994).

Todos os programas utilizados nos cálculos estruturais foram executados em plataforma Linux na distribuição Ubuntu, versão 13.03.

3.4. Determinação estrutural dos peptídeos.

Os procedimentos para a determinação de estruturas dos peptídeos, utilizando a espectroscopia de RMN, foram baseados no método descrito por Wüthrich *et al*, 1986.

Os sistemas de spins foram identificados individualmente através dos acoplamentos escalares, utilizando-se os experimentos bidimensionais (2D), TOCSY de ^1H - ^1H . Os experimentos de NOESY ^1H - ^1H foram utilizados para observar os acoplamentos dipolares entre os spins através do espaço.

3.4.1. Assinalamento dos sinais de NOE

Foram observados os acoplamentos espaciais, através dos experimentos de NOESY. Esse experimento foi utilizado para identificar a conectividade dos resíduos de aminoácidos em relação a sua estrutura primária, secundária e terciária.

Os limites de distâncias utilizados no programa NMRView para a obtenção dos volumes dos sinais de NOE foram obtidos diretamente por meio dos sinais de NOE. As medidas de NOE foram utilizadas no cálculo das distâncias, através do programa NMRView. As intensidades dos sinais foram convertidas em valores de distância por uma metodologia de calibração de restrições definidas como fortes, medias e fracas para as distâncias de 2,8, 3,5 e 5,0 Å, respectivamente (Clare, Nilges, et al., 1986). Foram assinaladas praticamente todas as correlações do espectro de NOESY, com o auxílio do assinalamento sequencial das ressonâncias dos hidrogênios do peptídeo.

Os valores de deslocamentos químicos, obtidos através dos experimentos homonucleares e heteronucleares, foram convertidos em uma tabela de restrições de ângulo diedro através do programa Talos+ (Delaglio et al., 1995). Esse programa utiliza um banco de dados de proteínas com estruturas cristalinas conhecidas. A partir dos deslocamentos químicos dos átomos da cadeia principal, o programa procura similaridades de deslocamentos químicos e sequência primária para cada três aminoácidos. Assim sendo, os valores dos ângulos diedros preditos foram inseridos em uma lista de restrições para o cálculo da estrutura dos peptídeos.

As restrições geométricas citadas acima foram utilizadas em algoritmos computacionais de modelagem molecular, para se calcular a estrutura tridimensional dos peptídeos.

3.4.2 Cálculos de modelagem

Nos cálculos estruturais foram utilizadas fontes de restrições de distâncias intra e inter residuais e de ângulos de torção. Os cálculos de modelagem foram realizados com o programa XPLOR-NIH (C. D. Schwieters, Kuszewski, Tjandra, & Marius Clare, 2003; C. Schwieters, Kuszewski, & Mariusclare, 2006). O algoritmo base desta aplicação é o método de minimização de arrefecimento simulado (*simulated annealing* (S.A.)) (Schwieters et al., 2003), um importante método de refinamento de dados de RMN utilizado na determinação de estruturas tridimensionais de macromoléculas. Ele parte de uma estrutura gerada randomicamente e amida na porção C-terminal dos

peptídeos, explorando o espaço conformacional de forma eficaz com base nos dados experimentais inseridos.

O S.A. promove de minimização de energia por dinâmica molecular (Brünger, Krukowski, & Erickson, 1990), baseado-se num aquecimento rápido do sistema, o qual é capaz de ocupar as regiões de alta energia do espaço conformacional, garantindo que os átomos superem locais de energia e, posteriormente, resfriamento lento e controlado, gerando estados de energia com valores menores (Brünger et al., 1990). A estrutura de partida, modelo estendido, foi submetida à dinâmica molecular com temperatura inicial de 1000 K, 14.000 etapas em altas temperaturas e 6.000 etapas durante o resfriamento. Todo o cálculo foi realizado considerando o sistema no vácuo.

Há de se considerar que foram realizadas diversas etapas de refinamento. Na etapa inicial, vinte estruturas foram geradas e analisadas. A etapa de assinalamento e análise dos erros foi realizada de forma interativa. Quando verificadas violações nas restrições de distâncias, essas eram reinterpretadas a partir dos dados experimentais e corrigidas quando necessárias, conduzindo a um modelo convergente e isento de violação. Para uma maior precisão das estruturas, foram obtidas o maior número possível de restrições. A cada etapa, adicionaram-se aproximadamente dez restrições. Ao final, um conjunto de dados otimizados foi obtido e os erros no processo de atribuição foram removidos.

Inicialmente, os cálculos das estruturas, foram realizados com o limite de violação de NOE de 0,5 Å, sendo que no final dos cálculos esse valor foi diminuído para 0,3 Å. Nas etapas finais do cálculo estrutural, um total de 200 estruturas foram geradas e os vinte confórmeros de menor energia, sem violação nos limites estipulados, foram analisados e visualizadas por meio do programa PyMOL (DeLano, 2002).

Como no cálculo usando arrefecimento simulado o sistema é considerado no vácuo, ou seja, sem influência do solvente, as estruturas resultantes geralmente não condizem com um sistema real, fazendo-se necessário o uso de refinamentos que consideram a presença de moléculas de solvente. Posto que as vinte estruturas obtidas foram submetidas aos processos de refinamento em água, as dez estruturas de menor energia foram consideradas como a família de estruturas representativa do conjunto das dez estruturas finais de menor energia foram depositadas no site PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, para cada peptídeo.

O programa QUEEN (Nabuurs et al., 2003) foi utilizado para verificar inconsistências no conjunto de restrições coletadas. As restrições que apresentaram valores elevados de I_{uni} (unicidade de informação, pouco suportada pelo conjunto de restrições) e I_{med} (informação média, alto impacto estrutural) foram verificadas quanto a suas consistências e retiradas quando incorriam em informação única de alto impacto estrutural.

Para tanto o diagrama de Ramachandran foi utilizado durante os cálculos para monitorar o progresso do refinamento na construção do modelo. No processo de refinamento, o gráfico de Ramachandran, um método simples e sensível (Kleywegt & Jones, 1996), foi útil no monitoramento de possíveis erros e indicação da qualidade dos modelos. Avaliou-se a geometria do conjunto de estruturas obtidas, fazendo uma análise detalhada das violações pela análise do gráfico de Ramachandran, verificando a existência de erros, quanto aos ângulos ϕ e ψ , cometidos durante o refinamento.

A incerteza nas coordenadas moleculares foi descrita usando o desvio quadrático das coordenadas RMSD (*Root of Mean Square Deviations*), como parte da validação das estruturas. Ele corresponde à medida de quanto cada átomo de uma determinada estrutura varia da estrutura de menor energia. O RMSD corresponde à raiz quadrada da soma do quadrado das distâncias entre os átomos das estruturas de menor energia em relação aos átomos de uma dada estrutura. Por meio do programa MOLMOL, as dez estruturas de menor energia foram sobrepostas para se determinar a geometria das estruturas pelos desvios médios quadrados. Foram gerados nove valores de RMSD (Koradi, Billeter, & Wüthrich, 1996), a média destes valores correspondeu ao valor de RMSD para o modelo.

3.5 Localização do peptídeo Cm-p1 na micela, troca H/D.

O experimento de troca de hidrogênio por deutério (troca H/D), foi empregado para se observar a orientação do peptídeo Cm-p1 na superfície da micela de SDS- d_{25} . Para tanto, a solução de 1 mM do peptídeo na presença de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} foi liofilizada e diluída em H₂O/D₂O (1:9, v/v) para um volume final de 500 μ L. Utilizou-se TMSP- d_4 como padrão de referência.

Entre o preparo da amostra e o início da coleta dos dados, demorou-se cerca de 10 minutos. Adquiriram-se experimentos de TOCSY a cada 50 minutos, na temperatura

de 25 °C, até que todos os átomos de ^2H se trocassem por átomos de ^1H . Os parâmetros utilizados foram: frequência de transmissão (O_1) de 2351,12; pulso de radiofrequência de 90° (P_1) de 8,13; janela espectral (SW) de 12,0161, número de experimentos acumulados (NS) de 40, o número de pontos no domínio do tempo (TD) 1024 em F_2 e 64 em F_1 , para cada um dos experimentos de TOCSY.

3.6 Síntese do peptídeo *Cm-p1* modificado ([Phe³]*Cm-p1*).

A síntese do peptídeo análogo ao peptídeo *Cm-p1* foi realizada modificando o resíduo de aminoácido Ser-3 por Phe-3, conforme a metodologia de síntese em fase sólida Fmoc (Chan e White, 2000). Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Síntese e Estruturas de Biomoléculas (LASEB), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). A síntese foi realizada usando uma resina Rink amida (suporte sólido de polímeros formado por pequenos grãos porosos e insolúveis) com grau de substituição 0,79 mmol/g e derivados de Fmoc-aminoácidos, a saber: Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(*Ot*-Bu)-OH, Fmoc-Gln(*trt*)-OH, Fmoc-His(*Trt*)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH e Fmoc-Val-OH.

Foram pesadas quantidades suficientes para a obtenção de 100 mg do peptídeo. Para tanto, pesou-se 98 mg de resina. Essa foi adicionada em uma seringa de síntese de peptídeo, tendo sido a resina exposta, três vezes a 2 mL de DCM (diclorometano), por aproximadamente 15 minutos sob agitação, tendo-se removido o solvente por filtração.

A resina foi desprotegida pela remoção do grupo Fmoc através do tratamento três vezes com 2,5 mL de PIPE (4-metil-piperidina) 20%(v/v) em DMF (*N,N*-dimetilformamida) e agitação por 15 minutos, tendo sido a solução removida por filtração. A resina foi lavada três vezes alternando-se DMF (*N,N*-dimetilformamida) e IPA (álcool isopropílico), respectivamente e por fim promove-se uma última lavagem com DCM (diclorometano). Ao final, verificou-se a desproteção com o teste Kaiser o qual emprega soluções de piridina a 2 % (v/v) em solução aquosa de KCN a 1 mmol L⁻¹, fenol a 80 % (m/v) em etanol e ninidrina a 5 % (m/v) em piridina, nas proporções 1:2:1 (v:v:v), respectivamente (Troll & Cannan, 1953). A coloração dos grânulos (escuro) indicam resultados positivos, ou seja, o sucesso da etapa de desproteção.

Desta forma, as etapas de acoplamentos foram realizadas, adicionando as quantidades de aminoácidos, HOBt (1-hidroxibenzotriazol) e DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida) equivalentes a 0,078 mmol multiplicado por um excesso de 4 vezes, sendo esses reagentes ativadores do grupo carbonila. Adicionaram-se também 2 mL dos solventes DMF e DCM e o frasco de reação foi agitado por 90 minutos. O sistema foi lavado em três vezes pela alternância de DMF (N,N-dimetilformamida) e IPA, respectivamente e por último DCM. Ao final, no teste Kaiser, verificou-se o sucesso da etapa de acoplamento, pela completa descoloração dos grânulos (transparente).

Após a adição do primeiro resíduo de aminoácido à resina, o sistema encontrou-se novamente protegido no grupamento N-terminal. Iniciou-se o acoplamento seguinte pela etapa de remoção do grupo Fmoc conforme descrito acima, seguindo-se a reação de acoplamento. O processo é repetido até que a sequência peptídica de interesse seja obtida.

Após o fim da síntese do peptídeo realizou-se a reação de clivagem do mesmo da resina, bem como se promoveu a remoção de forma simultânea de todos os grupos protetores das cadeias laterais pela adição de 2 mL do ácido trifluoroacético (TFA) e agitação por 90 minutos. O peptídeo em solução foi separado da resina por filtração e o TFA removido do filtrado pela aplicação de nitrogênio gasoso. O peptídeo sintetizado foi precipitado pela adição de 5 mL de éter diisopropílico gelado (previamente resfriado em nitrogênio líquido) e removido por centrifugação. Esse processo de remoção do TFA foi repetido por quatro vezes. Finalmente liofilizou-se o peptídeo sintetizado.

A purificação do peptídeo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE), em um cromatógrafo Varian Pro Star, detector UV modelo 335. Empregou-se gradientes de dois eluentes como fase móvel água deionizada (solvente A) contendo TFA grau cromatográfico a 0,1% (v:v) e acetonitrila grau cromatográfico (solvente B), contendo também TFA grau cromatográfico a 0,08%(v:v). A purificação foi realizada em escala semi-preparativa à temperatura ambiente. Finalmente a fração purificada do peptídeo foi liofilizada e analisada em um espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF-MS, a fim de se confirmar a sequência sintetizada.

3.7 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos, referentes à atividade antifúngica, para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 foram realizados no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas da Universidade Católica de Brasília. Para isso, utilizou-se um protocolo de bioensaio para *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

O meio sólido (*Sabouraud*) foi preparado e incubado com os microrganismos a 30 °C por 48 horas. Uma colônia foi isolada e homogeneizada em 5 mL de meio RPMI-1645, a 200 rpm, por 12 horas. Após observar que a absorbância (OD) estava na faixa entre 0,160 e 0,260, a cultura foi centrifugada em frações de 4 mL cada a 13.000 rpm, para sedimentar as células. As mesmas foram lavadas, várias vezes, com 1 mL de solução salina 0,09 %. Finalmente a colônia foi concentrada para um único *ependorf*. Foram diluídos 100 µL da suspensão de células em 900 µL de solução salina, juntamente com surfactante (Tween®) 20 a 2% (V/V).

Os microrganismos foram contados em Câmara de Neubauer para se determinar o volume necessário para um inóculo de $8,75 \cdot 10^3$ UFC (unidade formadora de colônias). Foram adicionados aos *ependorfs* 250 µL de peptídeo e meio e 100 µL de células com densidade de $8,75 \cdot 10^3$ UFC, sendo, ao final, 350 µL com $2,5 \cdot 10^3$ UFC (exceto para o controle positivo que continha apenas meio). Os ensaios foram realizados em triplicatas técnica e de preparo.

As placas Eliza foram analisadas no leitor EON a 30 °C, sob leve agitação com leitura, em $\lambda = 595$ nm, a cada 1 hora, por 48 horas. As leituras de absorbância armazenadas pelo computador foram coletadas e plotadas.

4.Resultados e discussões

4.1 Peptídeo clavanina A

Os padrões de estrutura secundária de peptídeos e proteínas podem ser determinados por espectroscopia de DC na região espectral entre 190 e 260 nm. Nesses comprimentos de onda, o cromóforo é a ligação peptídica, que dá origem a sinais característicos quando localizado num ambiente regular. Estruturas como α -hélice, conformação β e aleatórias dão origem a perfis característicos de amplitude e de espectros de DC.

O peptídeo clavanina A apresentou-se na forma randômica quando na presença de apenas água (Figura 4.1), como indicado pela elipticidade positiva referente a transição eletrônica $n \rightarrow \pi^*$, em comprimento de onda próximo de 219 nm e elipticidade negativa para a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ próximo de 200 nm (S M Kelly & Price, 2000). Em pH 5,0 as histidinas, lisinas e porção *N*-terminal estão protonadas, podendo as forças de repulsão serem responsáveis por evitar uma estrutura secundária bem definida em solução aquosa, ou não haver estabilidade suficiente para uma eventual estruturação.

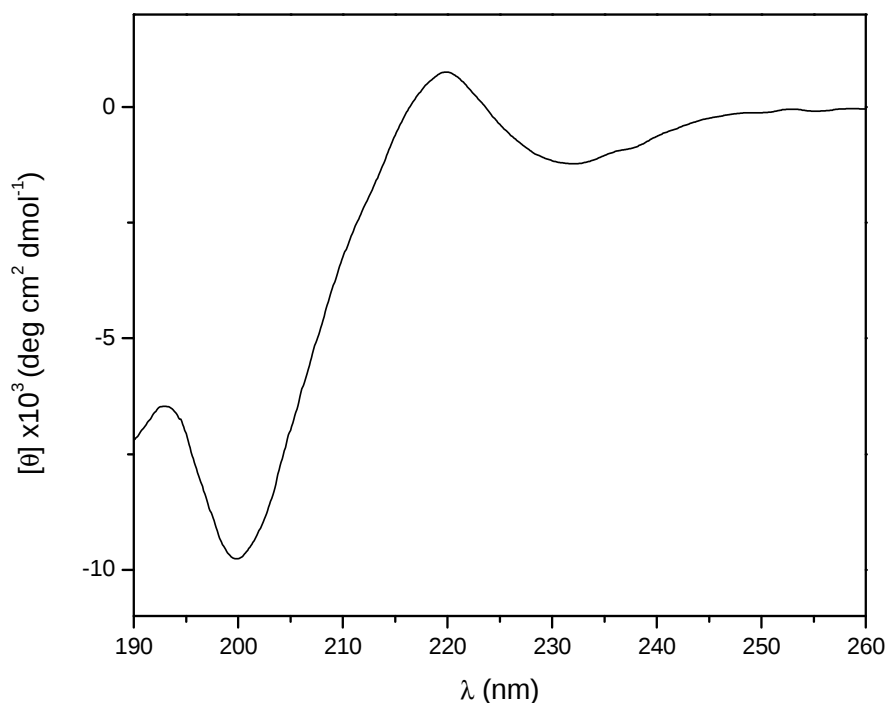


Figura 4.1. Espectro de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm² dmol⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A (41 μ M), sem meio mimético a pH 5 e 25 °C.

Na Figura 4.2 está apresentada a sobreposição dos espectros de DC do peptídeo frente a diferentes concentrações de micelas de SDS. O peptídeo se estrutura em α -hélice, como indicado pela presença de uma região positiva próxima a 193 nm, correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguida dos mínimos com valores negativos em 209 nm e em 222 nm, correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente. O peptídeo inicia sua estruturação em hélice a partir de 0,8 mM de micelas de SDS, passando de uma estrutura randômica para uma estrutura em hélice. Os mínimos, na região negativa de elipticidade, bem definidos a partir de 1 mM, sugerem uma estrutura em α -hélice bem definida.

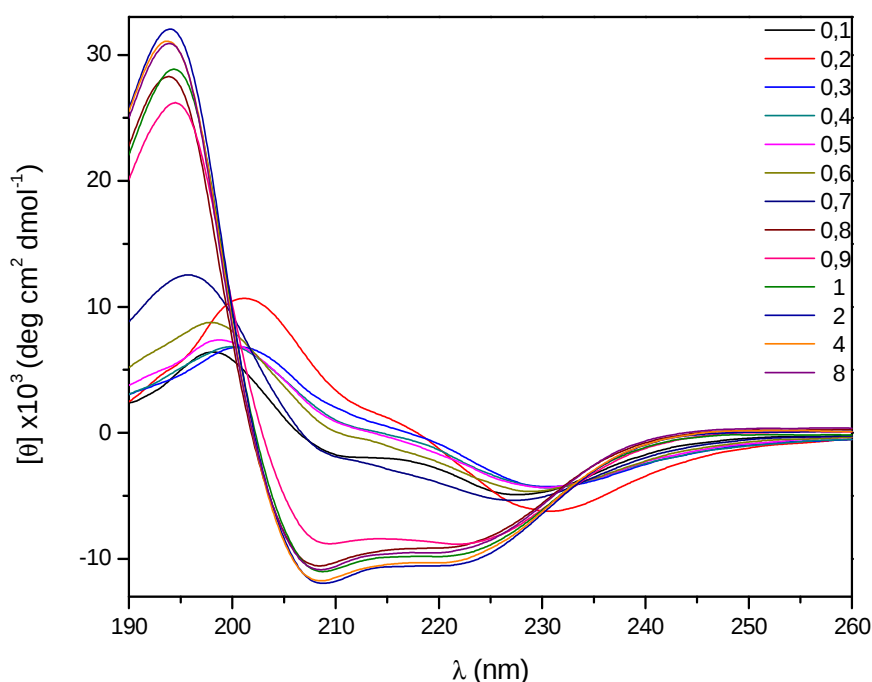


Figura 4.2. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A ($\approx 41 \mu\text{M}$) à diferentes concentrações de SDS (em mM), pH 5, 25 °C.

Ao analisar a Tabela 4.1, percebe-se a variação da proporção de estruturação em diferentes concentrações de SDS. O aumento da concentração de SDS favorece a estruturação em α -hélice, por possibilitar interações hidrofóbicas e catiônicas peptídeo-micela. A máxima estruturação, equivalente a 55,7 %, ocorre quando utilizada uma concentração de 2 mM de micelas de SDS, enquanto que na concentração micelar crítica (CMC) de SDS (8 mM) a estruturação foi de 51,0%. A menor estruturação na CMC de micelas de SDS pode ser explicada devido à variação de surfactante no meio

poder assumir diferentes conformações micelares e, conseqüentemente, interagir de diferentes formas com o peptídeo (Chan et al. 2006)

Tabela 4.1. Grau de estruturação em hélice, para o peptídeo clavanina A (41 μ M), em diferentes concentrações de SDS.

[SDS] mM	% hélice	[SDS] mM	% hélice
0,1	26,9	0,8	49,7
0,2	22,8	0,9	49,1
0,3	19,2	1	52,6
0,4	21,2	2	55,7
0,5	21,8	4	54,5
0,6	24,7	8	51,0
0,7	30,9	-	-

Em outro experimento, mantendo-se a concentração de SDS em 2 mM (Figura 4.3), abaixo da concentração micelar crítica (CMC), e aumentando a concentração do peptídeo, ocorreu uma diminuição na estruturação da hélice de 41% (41 μ M) para 26% (82 μ M), como observado pelos mínimos pouco definidos para a solução de concentração de 82 μ M de peptídeo. Talvez a 2 mM já houvesse existência de micelas no meio, por isso tal estruturação, porém quando aumentou-se a concentração do peptídeo, essas não foram suficientes para que ocorressem interações peptídeo-micelas, diminuindo a estruturação observada.

Também foi realizado outro experimento de DC acima da CMC (32 mM de micelas de SDS) e pH 4,3, sem a presença de tampão, em duas diferentes concentrações de peptídeo (Figura 4.4). Nesse experimento observou-se uma pequena variação de $[\theta]_{222}$, ao se dobrar a concentração do peptídeo. Isso demonstra que não ocorrem interações intermoleculares que favorecem uma maior estruturação (F. Li et al., 2005).

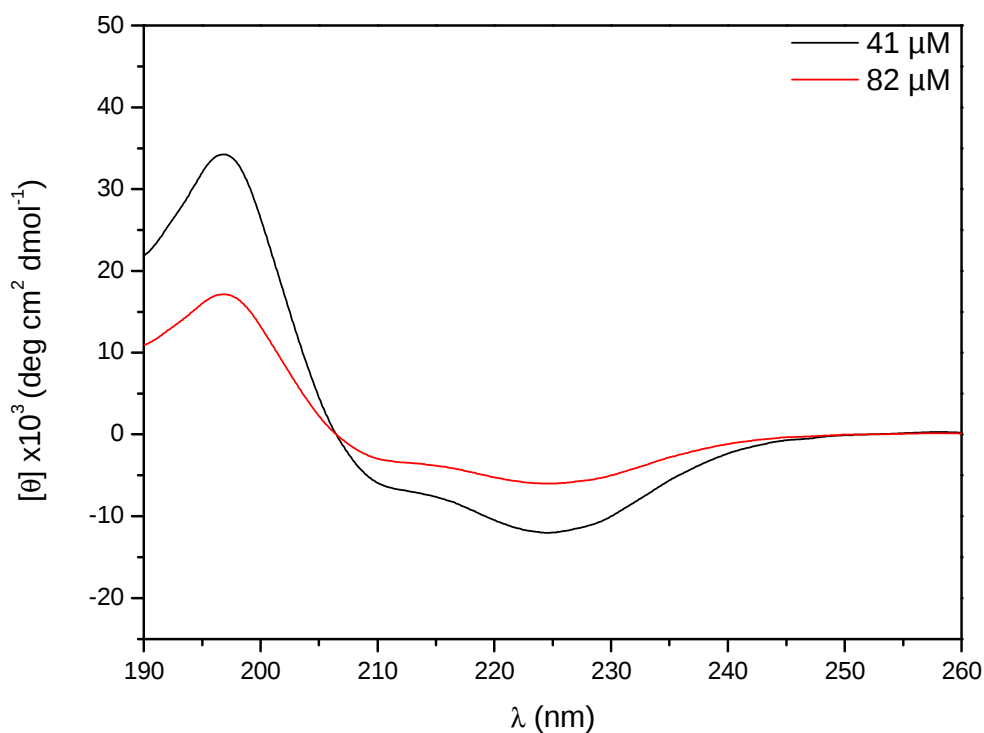


Figura 4.3. Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A a duas diferentes concentrações, 41 μM (em preto) e 82 μM (em vermelho), em 2 mM de micelas de SDS, pH 5 e 25 °C.

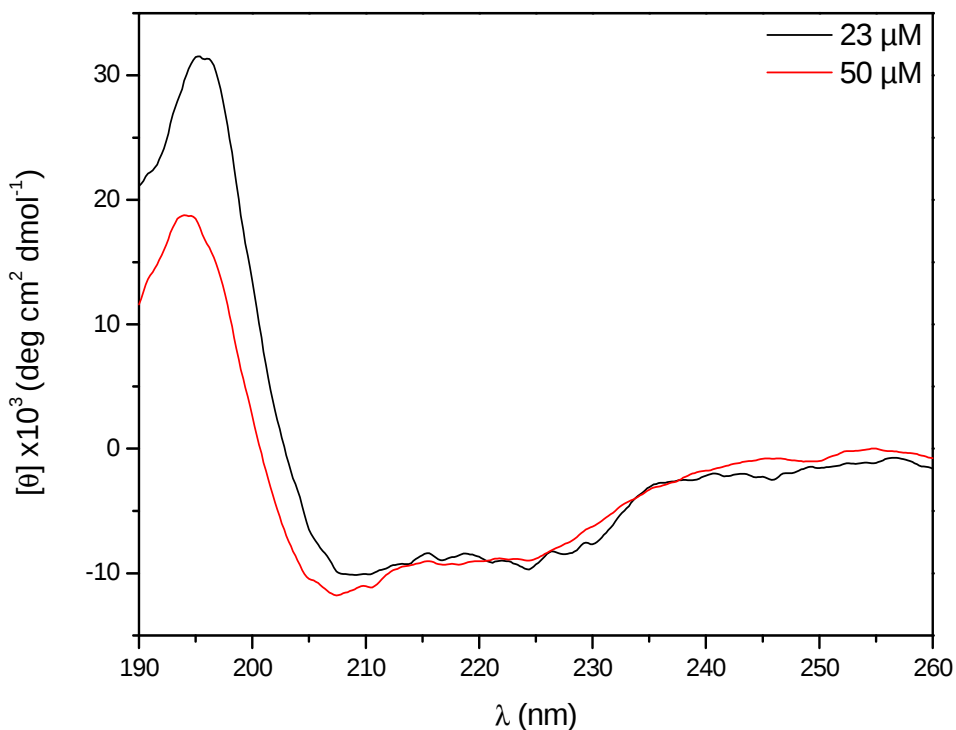


Figura 4.4. Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A à duas diferentes concentrações, 23 μM em preto e 50 μM em vermelho, em 32 mM de micelas de SDS, pH 4,3 e 25 °C.

Também foram realizados experimentos de DC para verificar a influência do pH na estrutura do peptídeos clavanina A. (Figura 4.6). Os resultados mostraram que não há uma mudança de conformação significativa induzida pelo pH, como pode ser observado pela Figura 4.5. As conformações observadas variando-se o pH não mostraram um equilíbrio entre dois estados, bem como nenhum ponto isodicroico foi observado. Conforme os cálculos de estruturação, o peptídeo apresentou o máximo de conformação entre os valores de pH 5 e 7 de 52% e 53%, respectivamente.

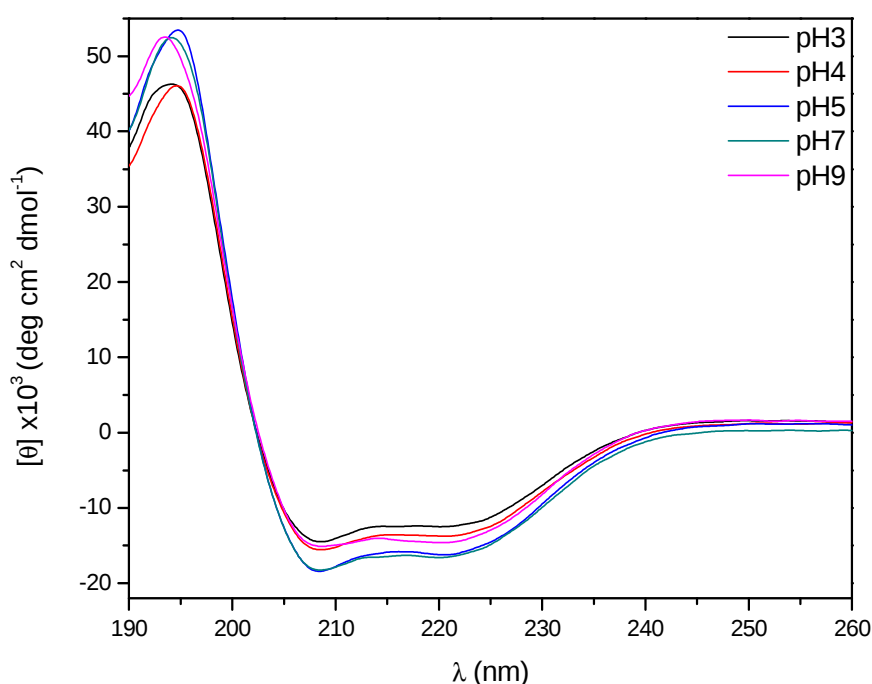


Figura 4.5. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A 41 μM em 8 mM de micelas de SDS e pH 3, 4, 5, 7 e 9, a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Os resultados de In Hee Lee et al. mostraram que, em meio ácido, clavanina A é um melhor agente antimicrobiano do que em meio neutro. As atividades da clavanina A contra *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. albicans* foram substancialmente maiores a pH 5,5 do que em meio neutro (In Hee Lee et al., 1997).

De acordo com o EMBL Gateway to Isoelectric Service Point (<http://isoelectric.ovh.org/calculate.php>), o ponto isoelétrico estimado do peptídeo clavanina A foi de 10.04. Em pH 7 a carga estimada foi equivalente a 1,9, já a pH 4,5 a carga estimada foi 5. A maior atividade do peptídeo clavanina A para alguns organismos em meio ácido, sugere a importante contribuição eletrostática. O peptídeo apresentou uma diferença desprezível de estruturação, em pH 7 igual a 53,1% e pH 5 52,4%. Como

para o primeiro pH o peptídeo não apresentava maior atividade, foi escolhido um pH de 4,3 para as análises de RMN, com o intuito de garantir a maior carga estimada.

Atividades antibacterianas e antifúngicas maiores para clavanina A em condições ligeiramente ácidas foram descritas por Lee e colaboradores (1997). O aumento de atividade foi sugerido como resultado de um aumento da afinidade do peptídeo com a membrana bacteriana aniônica após a protonação dos seus resíduos de histidina que possuem um $pK_a \sim 6$. Porém, tanto em meio ácido quanto neutro, o peptídeo interage com a membrana, conduzido principalmente por forças hidrofóbicas (In Hee Lee et al., 1997).

Ao se avaliar a estabilidade térmica do peptídeo através curva de desnaturação térmica (Figura 4.7), foi observado o decréscimo da banda negativa de DC a 222 nm, em função da temperatura, que variou de 25 a 95 °C. Na figura 4.6 pode se observar que o sinal começa a diminuir acima de 85 °C, indicando que o peptídeo se desenovela.

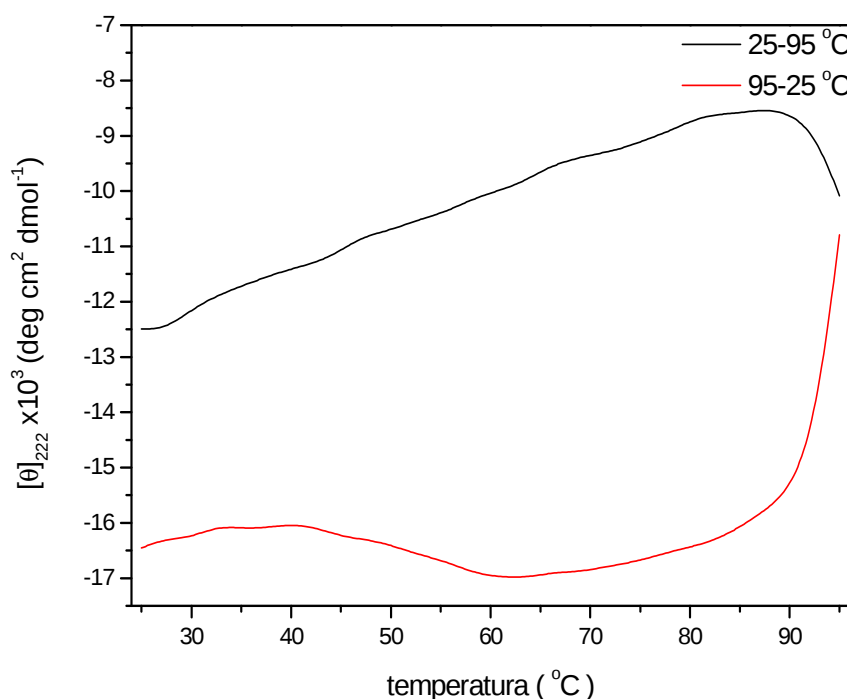


Figura 4.6 Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ em 222 nm em função da temperatura. Peptídeo clavanina A (41 μM) em 8 mM de micelas de SDS e pH 5. Curva de desnaturação do peptídeo clavanina A em uma rampa de temperatura de 25 °C a 95 °C.

Foi observado também que a solução tornou-se turva após a análise, indicativo de sua desnaturação. Isso pode ter ocorrido devido ao peptídeo agregar-se após a desnaturação térmica, dando origem a uma elipticidade observada mais negativa,

devido à presença de um menor número de moléculas enoveladas no meio. Geralmente, a desnaturação a elevadas temperaturas conduz a processos irreversíveis (Ahern & Klibanov, 1988). Sua estrutura primária é mantida, porém ocorre o desdobramento do peptídeo, como neste caso.

Assim como na presença de micelas de SDS (Figura 4.2), em solução de TFE:H₂O (Figura 4.7) também se observou a predominância da estrutura do peptídeo em α -hélice, evidenciada pelo espectro com máximo bem definido em 193 nm, correspondente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguida dos mínimos com valores negativos em 208 nm e em 222 nm, correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente (S M Kelly & Price, 2000), neste intervalo de comprimento de onda, o cromóforo em investigação é o dipolo elétrico associado a ligação peptídica.

Foi observado o aumento da estruturação do peptídeo com o aumento da concentração de TFE em solução ácida. O peptídeo apresentou estruturação em α -hélice em solução a partir de 20 % de TFE, ocorrendo a máxima estruturação em 40% de TFE, como mostra a Figura 4.7. A Tabela 4.2 detalha a variação de estruturação do peptídeo com o aumento da concentração de TFE de 0 a 50% em tampão pH 5.

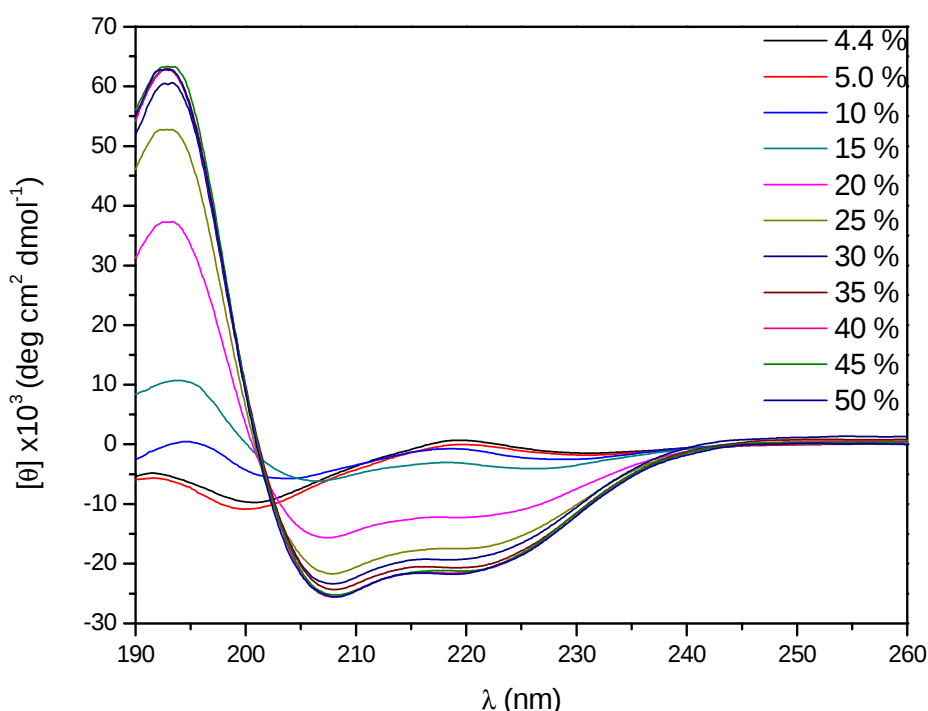


Figura 4.7. Espectros de DC, $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm² dmol⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo clavanina A ($\approx 38\mu\text{M}$) a diferentes concentrações de TFE (%) em H₂O, pH 5 e 25 °C.

Tabela 4.2 Grau de estruturação do peptídeo em hélice em diferentes soluções de TFE: H₂O.

[TFE] %	% hélice	[TFE] %	% hélice
0	10,7	25	55,3
4,4	11,4	30	59,0
5	12,8	35	63,0
10	15,3	40	64,7
15	21,2	45	64,5
20	42,2	50	64,5

Assim, a concentração utilizada no preparo das soluções para análises de RMN foi de 35% de TFE, já que nessa concentração o peptídeo apresentou uma boa estruturação, 63,0%.

Existem registros na literatura de que o 2,2,2-trifluoroetanol é um solvente que promove a formação de ligações de hidrogênio em regiões do peptídeo, onde há tendência α -helicoidal, induzindo estrutura apenas onde já existe a tendência de formação da mesma (Bach et al., 1987; Clore, Martin, et al., 1986). Portanto, devido à pouca resolução obtida nos experimentos de RMN com o uso de SDS-*d*₂₅, como meio mimético, foi utilizado TFE-*d*₃ como co-solvente.

O procedimento de assinalamento das ressonâncias dos hidrogênios foi iniciado utilizando o espectro de TOCSY do peptídeo a 2 mM em 35% de TFE-*d*₃, pH 4,3, 25 °C. Os sistemas de spins dos resíduos de aminoácidos bem como suas conectividades inter residuais, foram determinados através da análise simultânea dos mapas de contorno de TOCSY e NOESY, segundo a metodologia desenvolvida por Wüthrich (Wüthrich, 1986). Uma tabela contendo os deslocamentos químicos atribuídos de ¹H, ¹³C e ¹⁵N para o peptídeo pode ser observada no Anexo 1. A Figura 4.8 apresenta o mapa de contornos de TOCSY da região de impressão digital do peptídeo clavanina A. O sinal H_N-H _{α} para o resíduo Phe-2 somente pôde ser confirmado pelo experimento de NOESY, pois o mesmo estava na mesma posição da linha de ressonância do hidrogênio da água, que foi suprimida durante o experimento.

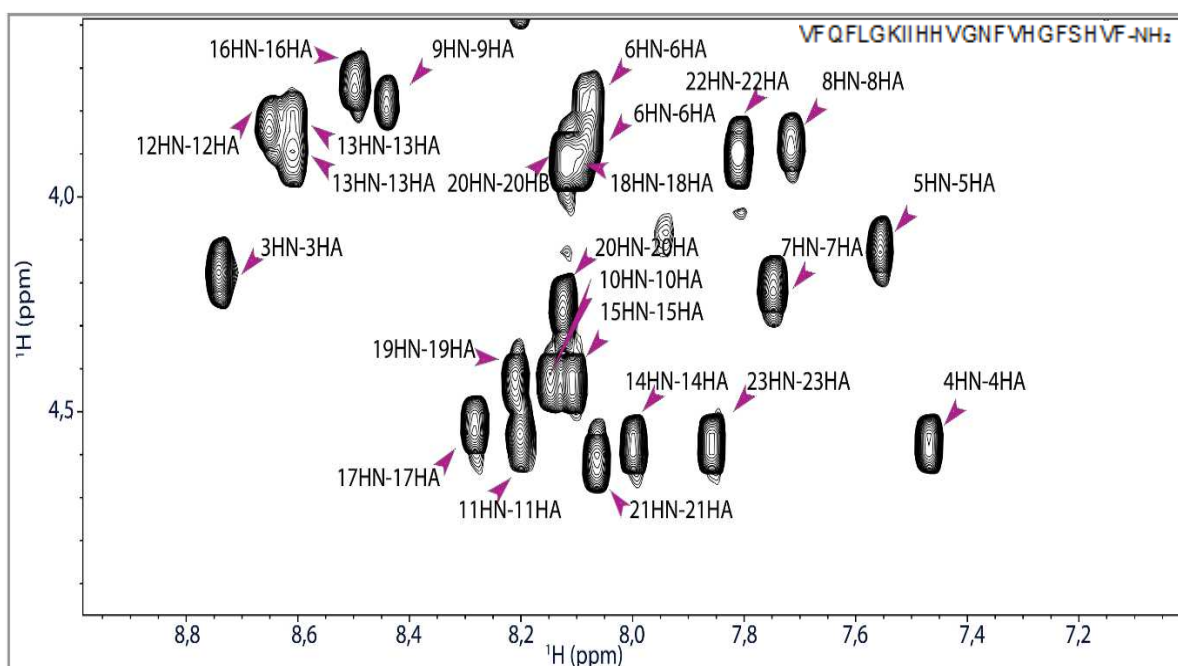


Figura 4.8 Expansão do mapa de contornos TOCSY, região de impressão digital, de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), 10% D₂O, pH 4,3 a 25 °C.

O experimento homonuclear NOESY forneceu informações de acoplamento dipolar entre hidrogênios próximos espacialmente. Para a determinação da estrutura da clavanina A em solução de 35% de TFE- d_3 foi utilizado no experimento de NOESY um tempo de mistura de 250 ms. Esse foi o melhor tempo de mistura encontrado entre os experimentos realizados com a variação deste parâmetro. Os sinais devidos ao efeito nuclear *Overhauser* (NOE), obtidos pelo experimento de NOESY, indicam restrições conformacionais entre os resíduos de aminoácidos presentes na sequência primária do peptídeo.

O conteúdo das informações dos experimentos de NOESY é dado pelas frequências dos picos. A atribuição dos picos de NOE com os pares correspondentes de átomos fornecem as intensidades dos picos, obtidos por integração sobre a área do sinal e convertidos em restrições de distância, utilizando o programa NMRView. Esses sinais são aproximadamente proporcionais ao inverso da sexta potência da distância entre os átomos espacialmente próximos no espaço ($<6 \text{ \AA}$). Desta forma, os volumes dos picos são convertidos em um conjunto de limites inferior e superior para as distâncias entre os pares de átomos, chamadas de restrições de distâncias. As Figuras 4.9 e 4.10 correspondem as expansões dos mapas de contornos NOESY. A primeira

apresenta as correlações H_N-H_α entre os resíduos de aminoácidos (pelas conexões $d_{\alpha N}$) e a segunda mostra as conectividades H_N-H_N entre os resíduos de aminoácidos (pelas conexões d_{NN}).

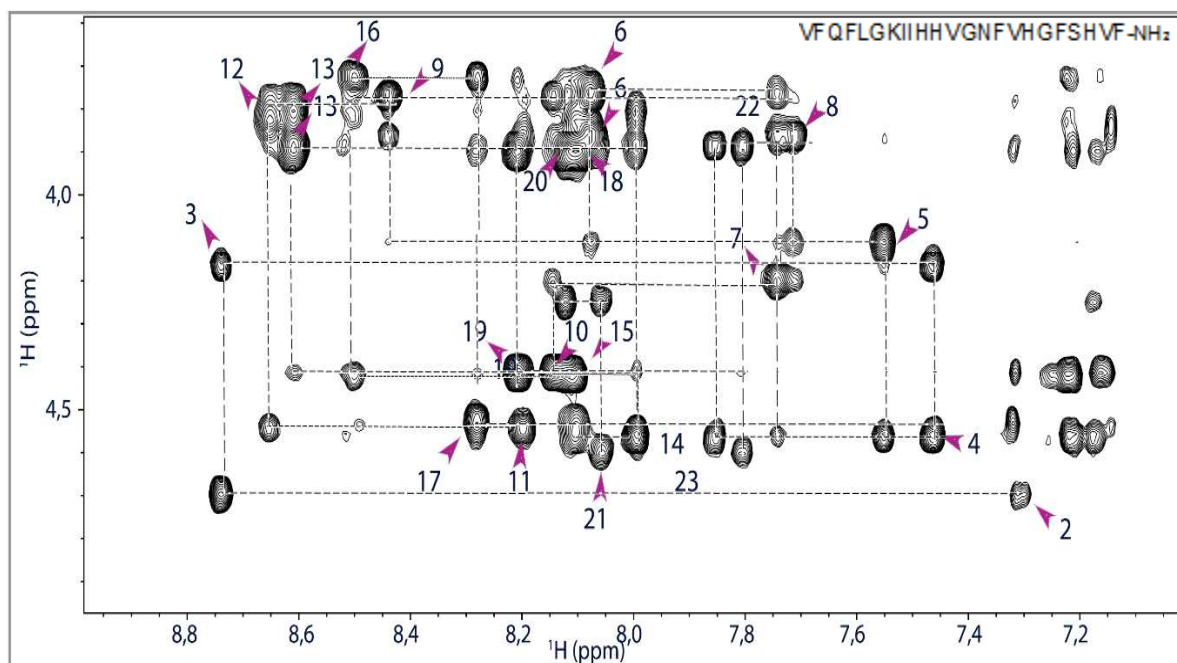


Figura 4.9 Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H_N e H_α , de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 : H_2O 35:65 (v/v), 10% D_2O e pH 4,3.

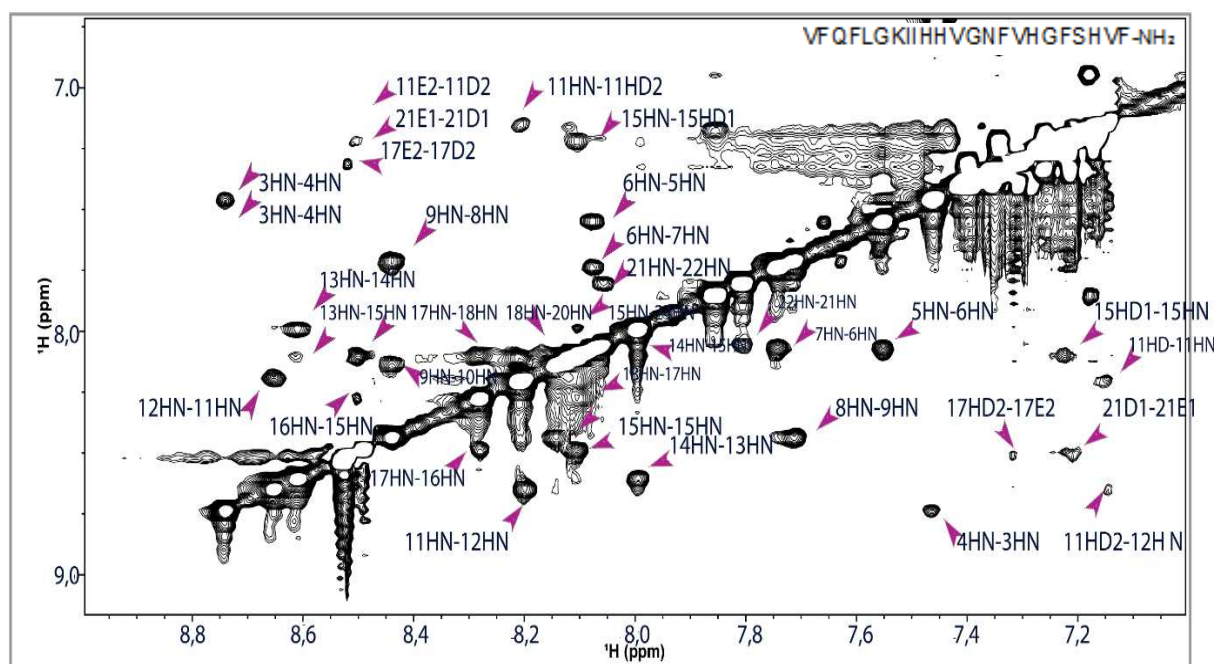


Figura 4.10 Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H_N-H_N , de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 : H_2O 35:65 (v/v), 10% D_2O e pH 4,3.

A Figura 4.11 apresenta o mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC, referente a região de correlações C_α e H_α e a Figura 4.12 apresenta o mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC, referente a região de H_N e N .

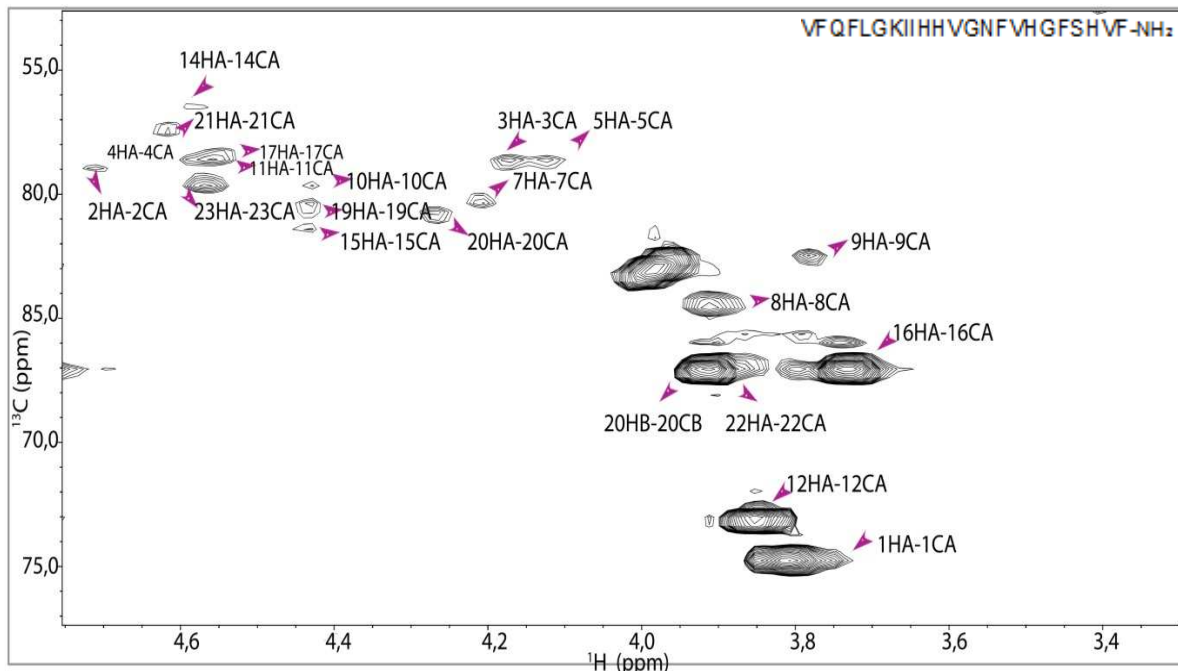


Figura 4.11 Expansão do mapa de contornos HSQC ^1H - ^{13}C de solução 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE-d_3 : H_2O 35:65 (v/v), 10% D_2O , pH 4,3 e 25 °C.

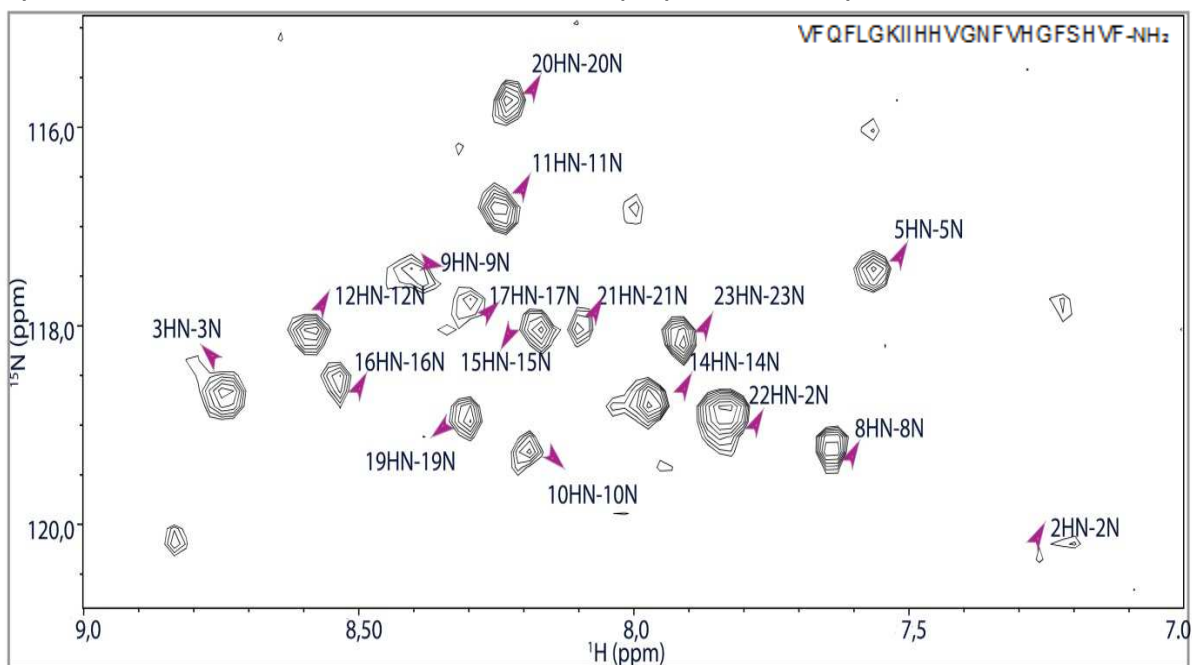


Figura 4.12 Mapa de contornos sf-HMQC ^1H - ^{15}N , solução de 2 mM do peptídeo clavanina A em TFE-d_3 : H_2O 35:65 (v/v), 10% D_2O e pH 4,3.

Tais experimentos auxiliaram nos cálculos estruturais pelo fornecimento das restrições de ângulos diedros, que foram obtidas a partir dos valores de deslocamentos químicos.

Após o assinalamento sequencial de todos os resíduos de aminoácidos do peptídeo, foram extraídas informações estruturais através da predição da estrutura secundária do peptídeo. Um método de predição de estrutura secundária bastante utilizado é proposto por Wishart (D. S. Wishart, Sykes, & Richards, 1992). Por esse método é possível ter acesso imediato à informação estrutural do peptídeo, apenas com o assinalamento da cadeia principal dos aminoácidos. Estruturas secundárias regulares tais como α -hélices e fitas- β apresentam valores de deslocamentos químicos característicos, quando comparados com os valores de deslocamentos químicos de estruturas randômicas. Sendo assim, os valores dos deslocamentos químicos dos núcleos de H_α e C_α podem ser utilizados como um indicativo de segmentos de estrutura secundária. Esse método consiste em calcular a diferença entre os deslocamentos químicos da amostra, obtidos experimentalmente, e o valor de deslocamento químico médio para cada aminoácido em conformação randômica, presentes na literatura (David S. Wishart & Nip, 1998; David S. Wishart & Sykes, 1994).

Na metodologia proposta por Wishart, em estruturas helicoidais, os núcleos H_α apresentam deslocamentos químicos menores do que os valores esperados para um determinado aminoácido em conformação randômica. Já os núcleos C_α apresentam valores maiores. Em segmentos de conformações β , o oposto é observado. A variação dos deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) dos resíduos de aminoácidos é chamada de Índice de Deslocamento Químico (Chemical Shift Index, CSI).

Os CSI para 1H e ^{13}C do peptídeo clavanina A foram calculados e estão apresentados na Figura 4.13. Pode-se observar em rosa o CSI referente aos deslocamentos químicos dos H_α e em lilás referente aos C_α . A presença de no mínimo quatro índices negativos consecutivos, sem interrupção de um índice positivo de $\Delta\delta$ para H_α , indicaram a presença de um segmento com estrutura secundária em α -hélice entre os resíduos Gln-3 a Phe-23. Usando essa metodologia de CSI para C_α , identificou-se um segmento com estrutura secundária em hélice do resíduo Val-1 ao Phe-23, pelo agrupamento "denso" de quatro ou mais índices positivos não interrompida por índices negativos. Regiões com padrões diferentes desses apresentados, seriam designadas como randômicas. Sendo assim, os padrões de CSI,

tanto para H_α quanto para C_α do peptídeo clavanina A, indicaram estruturação em hélice em toda a extensão do peptídeo.

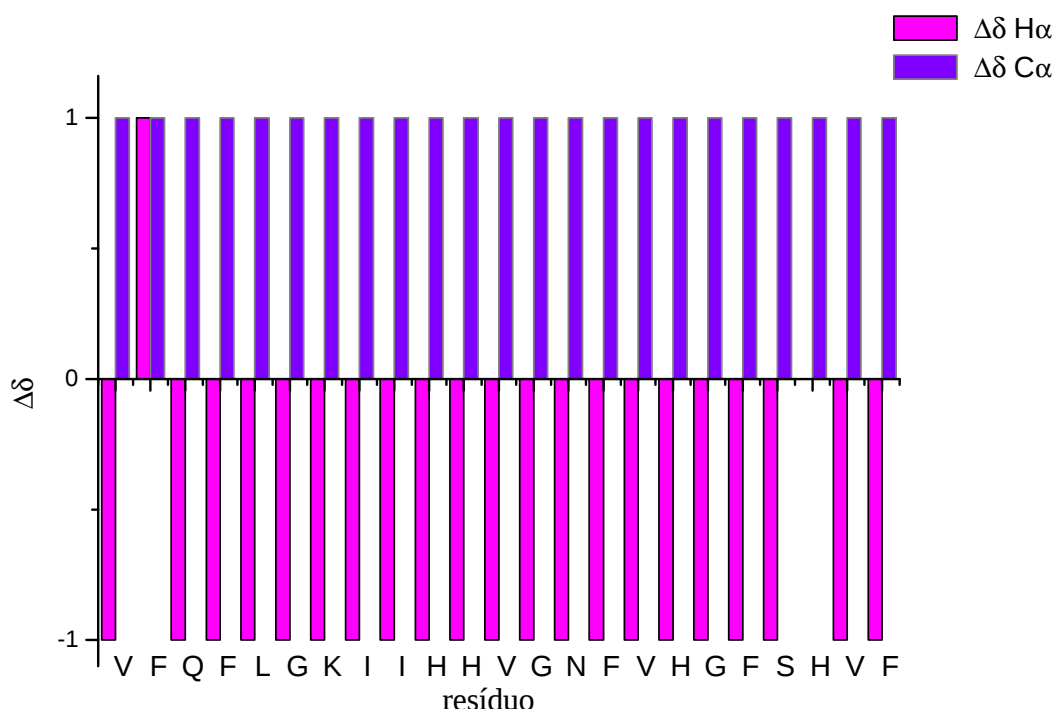


Figura 4.13 Índice de deslocamento químico (CSI). As barras em rosa são referentes aos CSI dos hidrogênios alfa (H_α) e em azul ao CSI dos carbonos alfa (C_α).

O CSI calculado pelo programa NMRView (B. A. Johnson & Blevins, 1994), que considera o co-solvente, pH e temperatura, foi determinado para o peptídeo clavanina A utilizando os deslocamentos químicos de H_α , H_N , C_α , C_β e N. O resultado está apresentado na Figura 4.14. As barras e caixas vermelhas indicam uma provável estruturação em α -hélice, as azuis em conformação β , já as cinzas indicam valor inexistente ou igual a zero. Sendo assim, as barras e caixas vermelhas para essas predições indicaram uma provável estruturação do peptídeo clavanina A em α -hélice de 73,9 % do resíduo Leu-5 ao His-11 e Gly-13 ao Phe-23.

A análise estatística das restrições utilizadas nos cálculos estruturais está descrita na Tabela 4.3. As 42 restrições angulares foram obtidas a partir dos dados de deslocamentos químicos de 1H , ^{13}C e ^{15}N , utilizando-se o programa TALOS+. O conjunto de restrições utilizadas nos cálculos resultou em uma média de 12,3 restrições para cada resíduo de aminoácido. A média de restrições por resíduos de aminoácidos representa um dos mais simples indicadores da qualidade de um conjunto de restrições experimentais. Esse indicador pode ser tendencioso, se não obtido com cuidado.

Alguns resíduos podem apresentar quantidades de restrições muito menores do que a média. Isto é tipicamente observado para as regiões da molécula com desordem conformacional, por exemplo, regiões flexíveis, regiões com grandes *loops* e também para resíduos com cadeia lateral curta (Nabuurs et al., 2004).

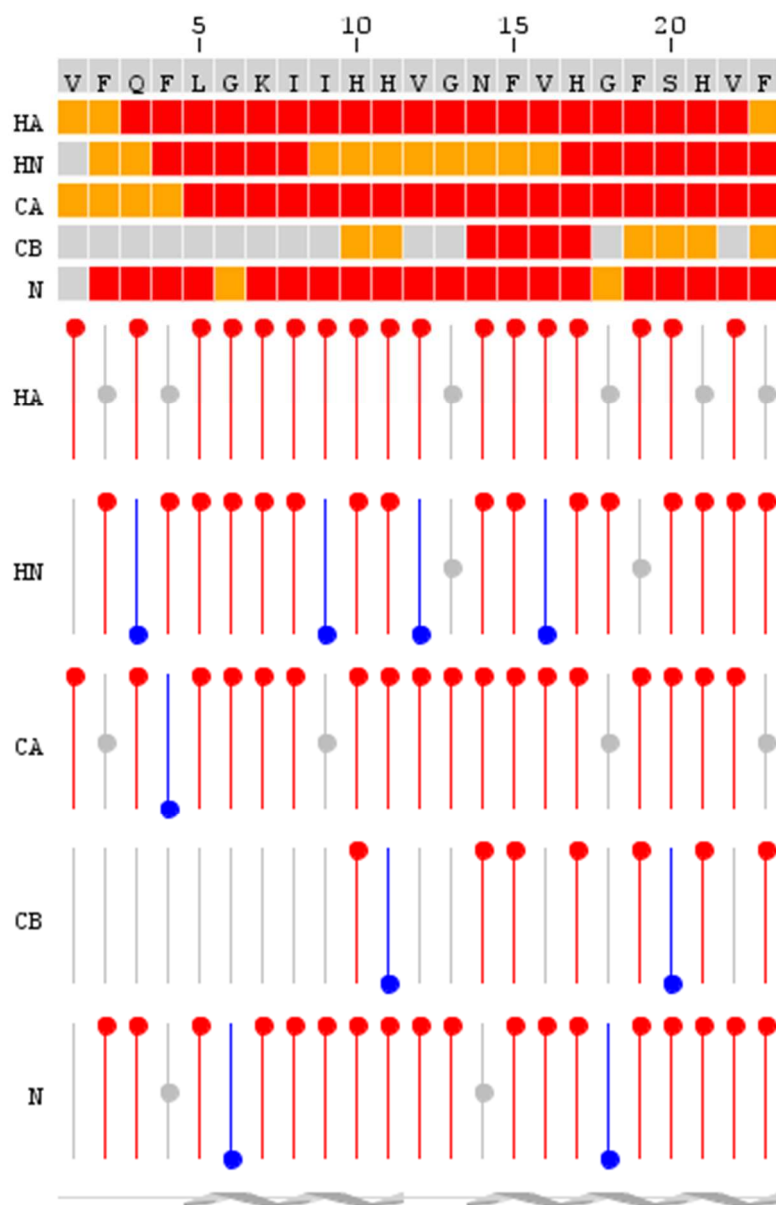


Figura 4.14 Gráfico de CSI obtido pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α-hélice, as caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou igual a zero.

No caso do peptídeo clavanina A, foram observadas, para os resíduos terminais, poucas restrições quando comparados ao conjunto de resíduos, principalmente para a região C-terminal. Isso indica que a média obtida para os resíduos está tendenciosa,

possivelmente devido a maior flexibilidade estrutural a partir do resíduo Gly-18 ao Phe-23, como apontado pelo baixo número de correlações observadas para os resíduos próximos a Gly-13, mostrado no painel de NOE (Figura 4.15).

Tabela 4.3. Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo clavanina A.

Restrições utilizadas	
Total de restrições de distância	283
Intra residuais	138
Sequencial	81
Média distância ($1< i-j <5$)	22
Restrições de ângulos diedros	42

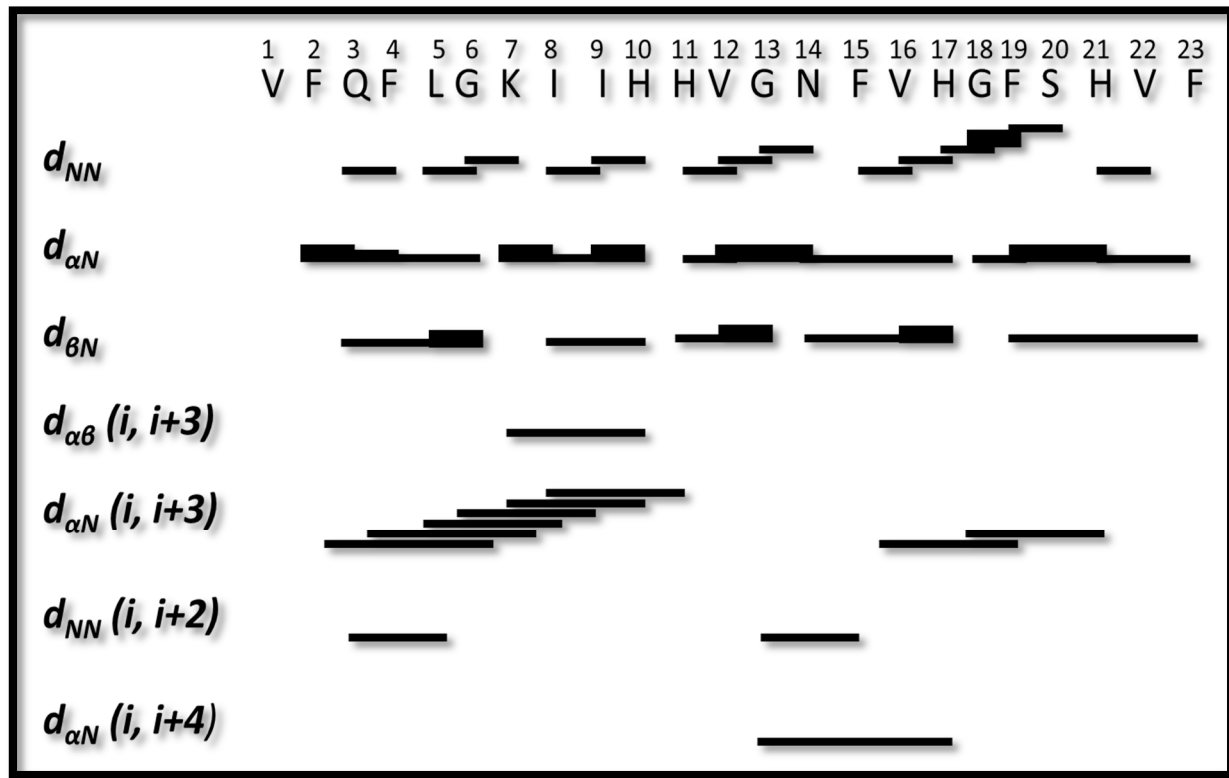


Figura 4.15 Diagrama de conectividade de NOEs, característicos de estrutura secundária, para o peptídeo clavanina A em TFE-*d*₃:H₂O 35:65 (v/v). As intensidades das interações *d*_{NN}, *d*_{αN} e *d*_{βN} estão representadas no diagrama. As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, media e forte.

O painel de NOE é importante para descrever os padrões de estrutura secundária. Ele compõe algumas importantes restrições utilizadas nos cálculos,

apresentando-se como um diagrama de conectividades. Durante as análises não foram observadas correlações envolvendo o sinal H_N do resíduo Val-1, provavelmente devido à troca rápida deste com o hidrogênio das hidroxilas dos solventes. O grande número de restrições de curta e média distância representou um indicador de que o peptídeo estaria estruturado em α -hélice, como observado pelas ocorrências predominantes de correlações $d_{\alpha N}(i+3)$, $d_{\alpha N}(i+1)$, $d_{NN}(i+1)$, principalmente na região N-terminal. As correlações observadas entre os hidrogênios alfa e amídicos ($i+3$) demonstram uma estabilização estrutural do peptídeo em hélice entre os resíduos Phe-2 a His-11 e Val-16 a His-21.

Existe apenas uma restrição ($i+4$) correspondente a correlação entre Gly-13 e His-17, que também indica uma estruturação helicoidal nesta região. Não foi observado restrições de média distância $i+3$ entre os resíduos His-11 a Val-16 e His-21 a Phe-23. Tal fato sugere que a estrutura secundária, neste intervalo, não seja tão rígida. Nessa região localizam-se resíduos responsáveis por desestabilizarem estruturas helicoidais (NELSON, David L.; COX, 2011), como por exemplo o resíduo de glicina (Gly-13), que confere flexibilidade conformacional à estrutura pela ausência de cadeia lateral, além da repulsão eletrostática entre os resíduos sucessivos de histidina (His-10 e His-11), com a cadeia lateral carregada.

As restrições utilizadas nos cálculos estruturais foram analisadas pelo programa QUEEN (Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints). Esse programa faz uma avaliação quantitativa das restrições dos dados experimentais de RMN. O método calcula uma medida para a informação contida numa única restrição de distância, dado todos os outros sistemas de restrições, fornecendo então uma maneira de quantificar a contribuição de cada restrição em relação ao conjunto total de dados (Nabuurs et al., 2003).

Desta forma, o programa QUEEN permitiu verificar e corrigir possíveis erros de atribuições pelas análises das restrições que apresentavam em alta unicidade. A Figura 4.16 mostra que as restrições utilizadas para o cálculo final das estruturas apresentam baixa unicidade (I_{uni}), confirmando a confiabilidade das restrições utilizadas. Uma medida qualitativa do conteúdo da informação em relação as restrições de distância foi realizada, quanto a sua classificação no conjunto de restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).

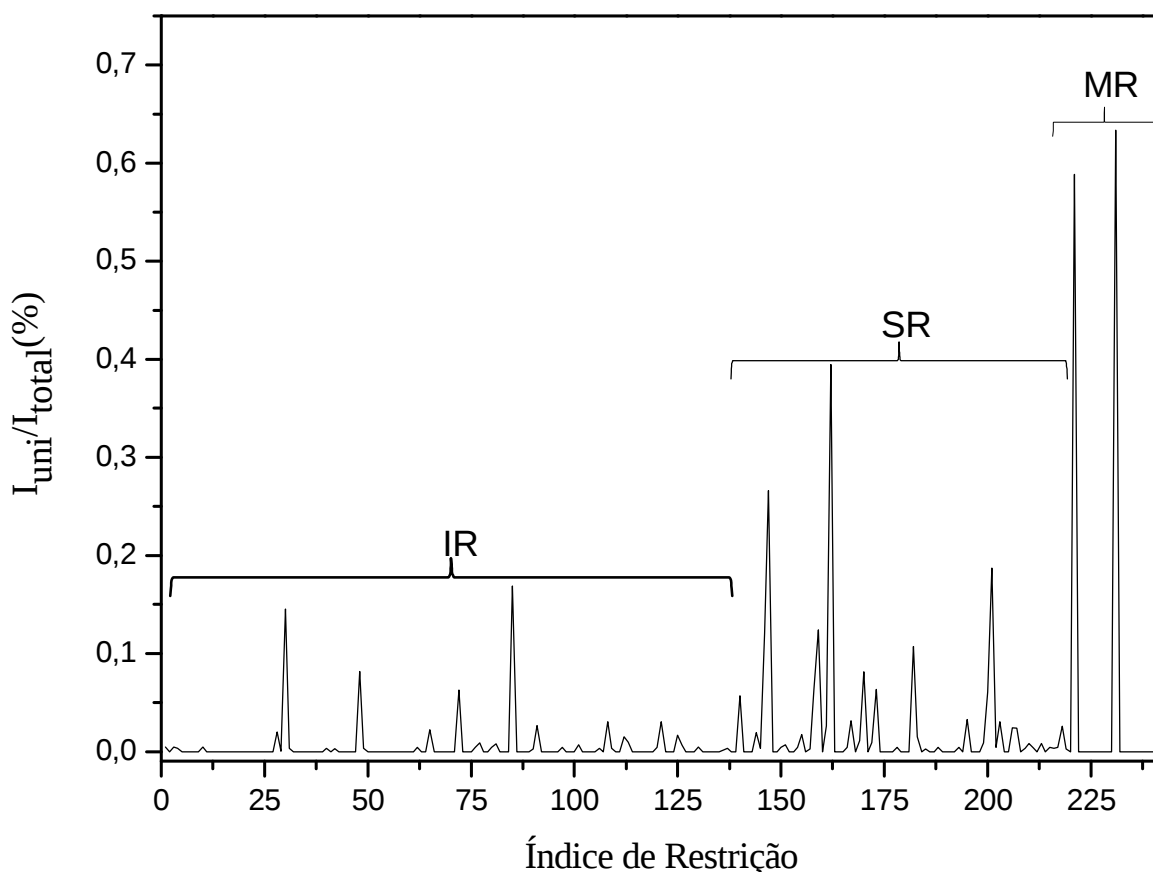


Figura 4.16 Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição, para a clavanina A em solução de TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3. A classificação no gráfico indica restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).

Também foram identificadas as restrições de distância mais importantes para a estrutura (I_{med}), ou seja, os sistemas de restrições que contêm a maior parte da informação relativa à estrutura molecular (Figura 4.17). As interações de média distância possuem grande impacto sobre a estrutura e, portanto, pode-se considerar que elas possuem maiores informações estruturais. A informação média (I_{med}) revelou que as restrições de média distância fornecem grande informação estrutural para o peptídeo clavanina A. São elas: H_α-H_N (i+3) segundo a seguinte ordem de peso: 17H_N-13H_α, 11H_N-8H_α, 8H_N-5H_α, 19H_N-16H_α, 6H_N-3H_α, 10H_N-7H_α, 21H_N-18H_α, 10H_β-7H_α, 9H_N-6H_α. A presença da interação H_N-H_N (i+2) entre o resíduo Gly-13 e Phe-15, indica uma torção nesta região da cadeia principal do peptídeo.

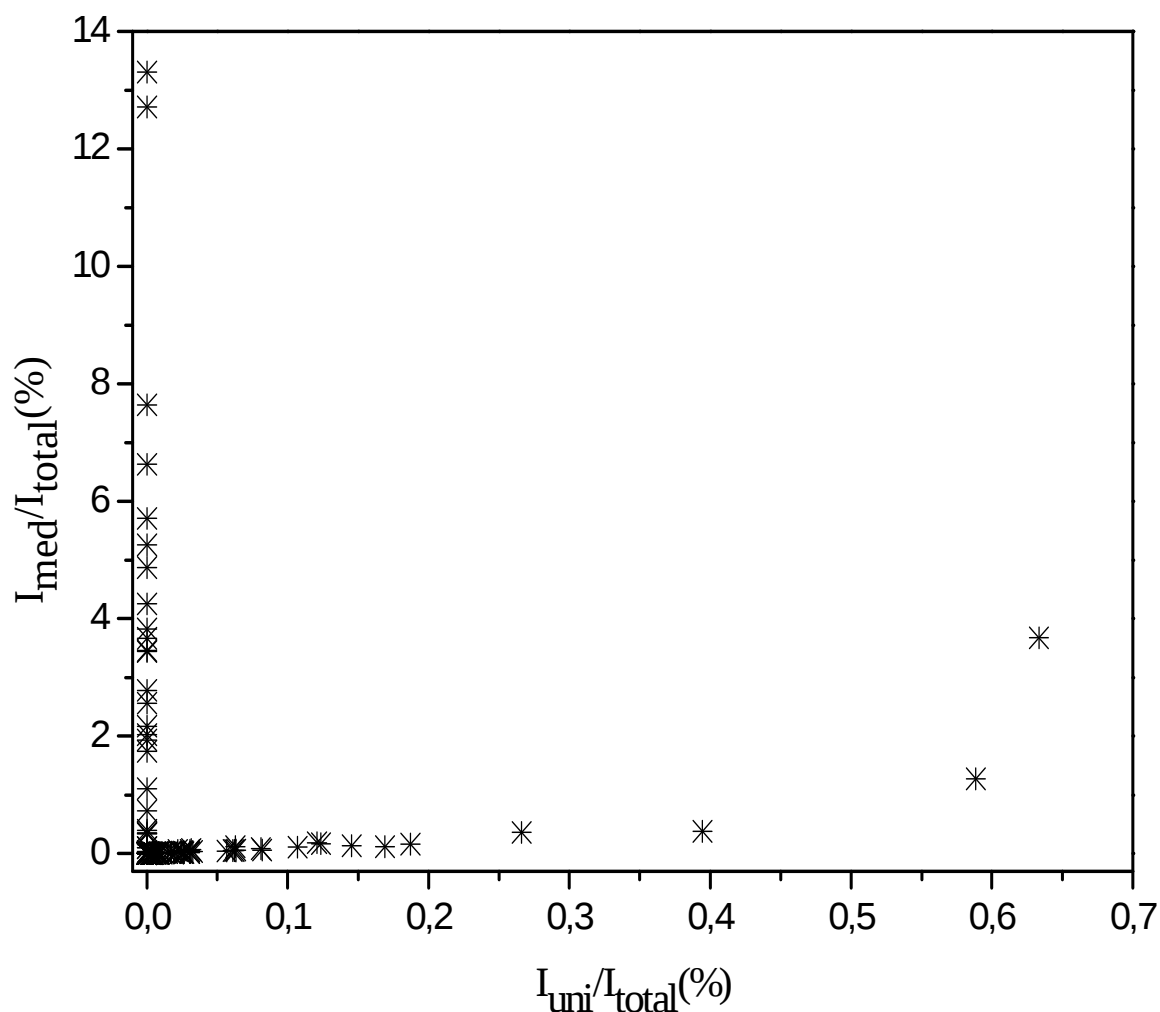


Figura 4.17 Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_{med}) versus informação única (I_{uni}) para a clavanina A em solução de TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3.

Esses dados confirmam que as restrições intra residuais, como esperado, contenham apenas poucas informações estruturais, embora componham uma parte importante do conjunto de dados, pois interações de curto alcance são bastante úteis para confirmar as atribuições e indicar a integralidade dos conjuntos de dados, porém não como uma fonte importante de informação estrutural.

Durante os cálculos estruturais, realizados com apenas restrições de distância, observaram-se que as estruturas obtidas de menor energia apresentavam uma quebra da hélice na posição 13 do resíduo de glicina (Gly-13), como mostra a Figura 4.18. Inicialmente considerou-se que seriam referentes à erros de atribuição, porém, após todas atribuições serem reavaliadas, não foi constatado nenhum erro.

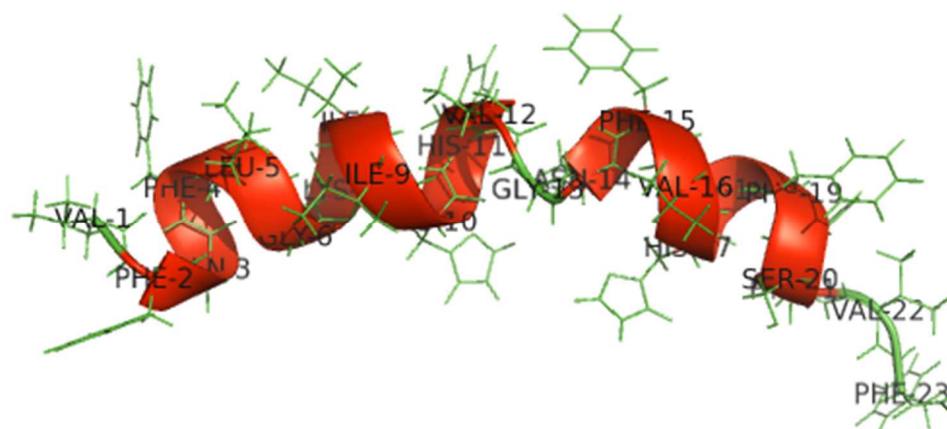


Figura 4.18 Estrutura de menor energia para o peptídeo clavanina A em solução de TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3 e 25 °C. Cálculos estruturais realizados sem restrições de ângulos diedros.

Em vista disso, procurou-se obter estruturas melhores resolvidas. Para isso, foram realizados experimentos de HSQC de ¹³C e HMQC de ¹⁵N, através dos quais foi possível realizar a determinação dos ângulos de torção ϕ e ψ da cadeia principal.

É conhecido que os deslocamentos químicos dos átomos da cadeia principal são muito sensíveis à conformação local do segmento peptídico. A partir desse conceito, o programa TALOS+ estabelece uma relação empírica entre os deslocamentos químicos dos átomos da cadeia principal e os ângulos de torção PHI e PSI (ϕ e ψ). Sendo assim, o processo de determinação do ângulo de torção utilizando o programa TALOS+ foi baseado na comparação dos deslocamentos químicos e sequência de aminoácidos do peptídeo com um banco de dados de polipeptídeos homólogos, que possui ângulos de torção e deslocamentos químicos conhecidos (Shen, Delaglio, Cornilescu, & Bax, 2009). A Figura 4.19 apresenta a interface gráfica do programa TALOS+, mostrando a exatidão da predição em verde, o índice de desvio do parâmetro de ordem RCI-S² em função do número de resíduo e a previsão da estrutura secundária.

Uma tabela com a predição dos ângulos diedros gerados pelo programa TALOS+ para o peptídeo clavanina A é apresentada no Anexo 2. As predições dos ângulos ϕ e ψ para todos os resíduos indicaram uma estruturação em α -hélice, em toda a extensão do peptídeo.

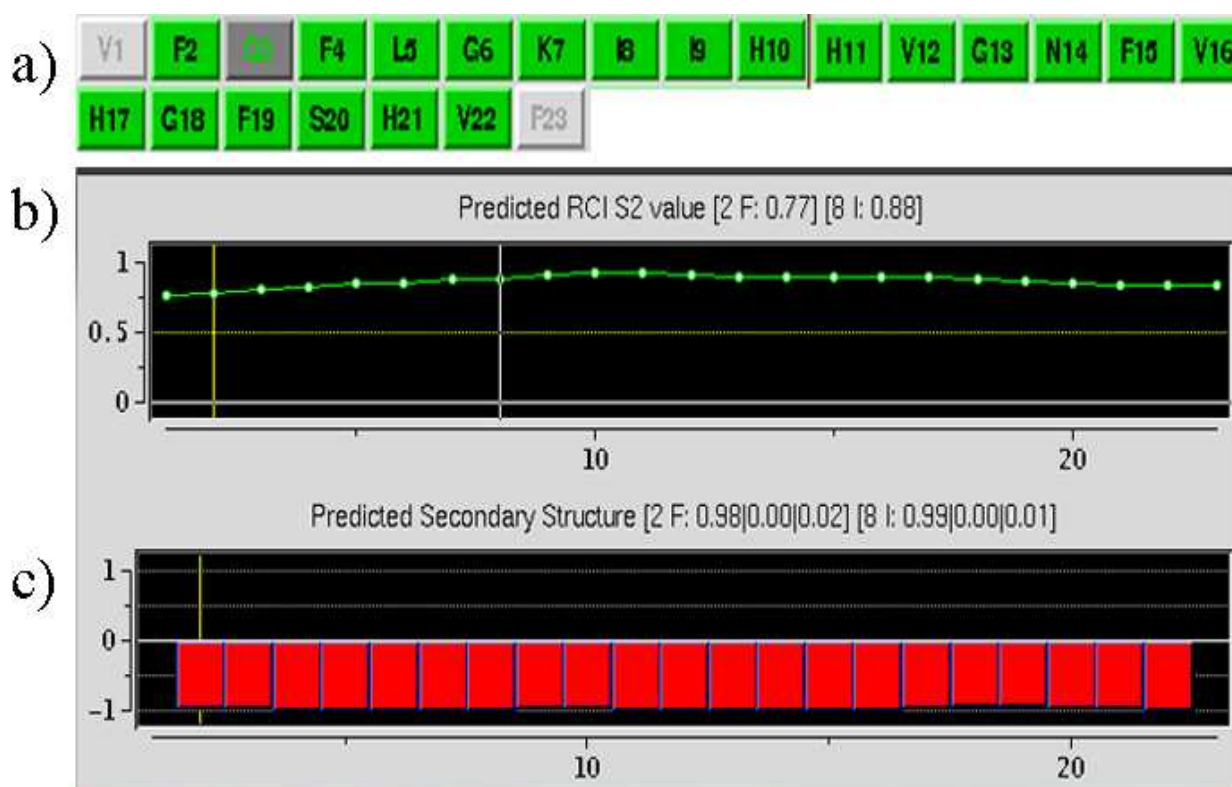


Figura 4.19 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo clavanina A com a estimativa da exatidão da predição, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes b) Índice de desvio do parâmetro de ordem RCI-S² em função do número de resíduo c) Previsão da estrutura secundária.

O programa TALOS+ (Shen et al., 2009) previu a estrutura secundária, para a cadeia principal do peptídeo com boa exatidão, o que é indicado pela cor verde. A Figura 4.19.a mostra que as previsões dos ângulos foram todas consistentes, já que não foram observadas previsões em amarelo e azul, que corresponderiam a previsões ambíguas e resíduos dinâmicos, respectivamente.

O método RCI representa uma maneira simples e eficaz de quantificar a flexibilidade do peptídeo. Ele é capaz de estimar quantitativamente a média da flutuação quadrática dos parâmetros de ordem da cadeia principal (RMSFs), usando para isto apenas os valores de deslocamentos químicos. O método RCI é extremamente robusto, oferecendo uma excelente alternativa aos métodos tradicionais de medição de flexibilidade de proteínas (Berjanskii & Wishart, 2007).

Na Figura 4.19.b, pode-se observar que os valores de Índice de desvio do parâmetro de ordem RCI-S² são maiores que 0,5 e indicaram a ausência de resíduos dinâmicos, concordando com a ausência de previsões em azul na Figura 4.19.a. Por fim, as barras em vermelho na Figura 4.19.c refletiram a probabilidade atribuída pela

previsão de uma estruturação em hélice, entre os resíduos phe-2 e val-22, apontando uma estruturação provável, além de uma estimativa confiável da probabilidade de ocorrência dos valores apropriados. Tais resultados de predição de estrutura concordam com mesmos elementos de estrutura secundária, previstos pelo método CSI.

Para cada ângulo diedro predito, foi gerado pelo programa TALOS+ um diagrama de Ramachandran (Anexo 3), com as dispersões dos ângulos ϕ e ψ dos 10 resultados mais próximos. Todas as predições se localizaram na região de α -hélice do gráfico de Ramachandran.

As restrições de ângulos diedros foram inseridas nos cálculos estruturais. Calculou-se um total de 200 estruturas, sendo as vinte estruturas de menor energia selecionadas para um novo cálculo, agora utilizando um protocolo de refinamento em água. O protocolo *water refinement* (Michael Nilges, Jens Linge 26.8.98) utiliza um algoritmo de análise em ambiente aquoso, ao contrário do refinamento *simulated annealing* (sa_new.inp), onde o cálculo estrutural é realizado considerando o sistema no vácuo (Linge & Nilges, 1999). O protocolo de refinamento em água inclui alternativas interações não ligantes, eletrostáticas e interações de Van der Waal mais realísticas (C. Schwieters et al., 2006). As dez estruturas de menor energia foram selecionadas para representar a família de estruturas Figura 4.20.

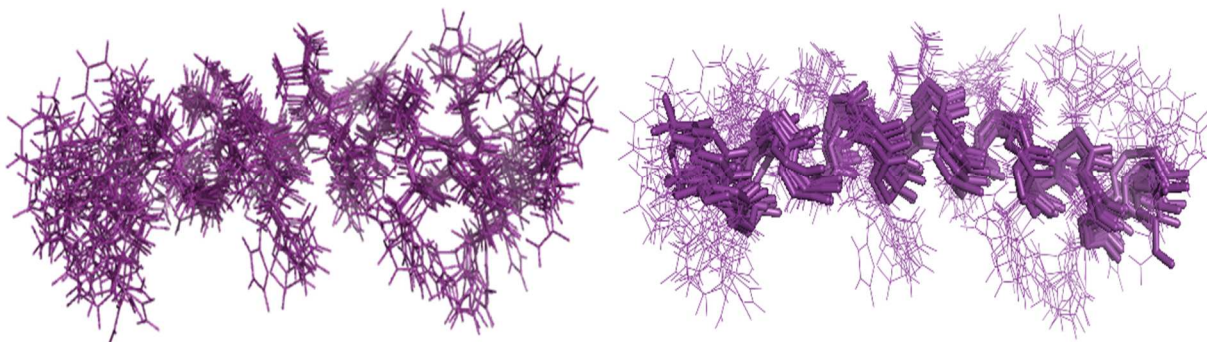


Figura 4.20 Estruturas de menor energia para o peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3 a 25 °C A) Sobreposição das dez estruturas de menor energia B) Sobreposição apenas dos átomos da cadeia principal (código pdb: **2MVE** <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

O peptídeo clavanina A, na presença de solução TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), estruturou-se em α -hélice, abrangendo a região entre os resíduos de Phe-2 e Val-22. O esqueleto peptídico está enrolado ao longo do eixo da molécula, com o sentido para

a direita. Grande parte das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos está projetada para fora do esqueleto helicoidal, sendo cada passo da hélice constituída por cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos.

A Figura 4.18 (pág. 61) mostra claramente uma quebra na estrutura do peptídeo centrada no resíduo de Gly-13. Tal estrutura, após a adição das restrições de ângulos diedros, apresentou-se torcida, com tal curvatura centrada no mesmo resíduo. Também a Magainina2, um peptídeo antibiótico de 23 resíduos de aminoácidos, cuja estrutura secundária mostrou-se em α -hélice em todos os sistemas de solventes (dodecilphosphocolina (DPC), micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) e em solução de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE)), apresentou estruturas curvadas, com curvatura centrada nos resíduos Phe-12 e Gly-13 (Gesell, Zasloff, & Opella, 1997).

Os resíduos de glicina podem atuar como dobradiças entre os vários segmentos do peptídeo, permitindo uma ótima interação com a membrana alvo. A flexibilidade conformacional e carga são essenciais na inserção dos peptídeos nas monocamadas de fosfolípidios. Estudos realizados por Van Kan et al. (Ellen J. M. van Kan et al., 2002) mostraram que os resíduos de glicina e histidina presentes no peptídeo clavanina A desempenham um papel importante em sua atividade. Para os derivados da clavanina A, os resíduos de glicina foram substituídos por resíduos de alanina, tendo-se observado diferenças na interação peptídeo-membrana e na atividade biológica (Ellen J. M. van Kan, van der Bent, Demel, & de Kruijff, 2001).

Um estudo realizado por Bowie e colaboradores mostra a importância da flexibilidade estrutural do peptídeo em sua atividade. O peptídeo Caerin 1.1 (GLLGVLVSIAKHVLPHVVPVIAEHL-NH₂) é um peptídeo de largo espectro antibacteriano, isolado a partir de rãs australianas do gênero *Litoria*. Nos meios miméticos do tipo membranas, esse peptídeo possui dois segmentos em α -hélices, separadas por uma região flexível articulada, delimitadas pelos resíduos de Pro-15 e Pro-19. A importância dos dois resíduos de prolina foi avaliada pela substituição desses por alanina ou glicina. As estruturas resultantes indicam que o ângulo central de dobra e a atividade biológica diminuíram significativamente após a substituição dos resíduos de Pro por Gly e ainda mais quando substituídos por resíduos de alanina, assim sendo, os resultados evidenciaram a necessidade da curvatura estrutural. Tal estudo permitiu mostrar a relação entre a flexibilidade conformacional e atividade, sugerindo uma relação direta entre esses dois fatores (Pukala, Brinkworth, Carver, & Bowie, 2004).

Além disso, a importância da carga positiva Lys-11, que também pode estar envolvida na interação com fosfolipídios aniônicos na membrana, onde a substituição deste por glicina diminuiu bastante sua atividade (Apponyi et al., 2004). Tais relações indicam que a dobradiça flexível em torno do resíduo de Pro-15 deve permitir uma orientação ótima em toda região *N*- e *C*-terminal do peptídeo, quando interage com as membranas das células bacterianas (Boland & Separovic, 2006; Haney, Hunter, Matsuzaki, & Vogel, 2009).

Os resíduos de glicina da sequência da clavanina A mostraram ser essenciais para o mecanismo de permeabilização da membrana. Em meio neutro o peptídeo atua através de um mecanismo de permeabilização da membrana não-específico, para induzir a morte das células (Ellen J. M. van Kan et al., 2002). Van Kan et al. propuseram o modelo carpet (Ellen J. M. van Kan et al., 2002), onde os peptídeos se inserem na membrana ancorando seus resíduos hidrofílicos na região de interface da membrana, conduzido pela interação eletrostática entre o peptídeo carregado positivamente e os fosfolipídios da membrana alvo carregados negativamente. Os peptídeos anfipáticos saturam a superfície da membrana como um tapete, de modo que as cargas positivas dos resíduos básicos interajam com as cabeças dos grupos fosfolipídicos carregados negativamente ou moléculas de água. A rotação da molécula conduz à reorientação dos resíduos hidrofóbicos para o interior da membrana, o que desintegra a membrana pela perturbação da bicamada causada pela curvatura (Oren & Shai, 1998).

Para bactérias gram-negativa, o diferente mecanismo sugerido de permeabilização da membrana diferenciado em meio ácido, sugerido por Ellen et al, seria um mecanismo via fluxo de prótons, onde os peptídeos matam as bactérias de forma eficiente pela permeabilização da membrana. Provavelmente através da interação com proteínas envolvidas na translocação de prótons, como resultado de uma alteração específica na permeabilidade da membrana para os cátions pequenos (Ellen J. M. van Kan et al., 2002). Estudos realizados por Barker et. al. mostraram que as propriedades de formação do canal pelo peptídeo magainina em bicamadas lipídicas são dependentes da composição lipídica da bicamada e da presença de um gradiente elétrico ou iônico (Barker, 1991). É proposto por esse modelo, que a membrana alvo apenas é permeada após um limiar de concentração, isso pode explicar o fato de que metade do MIC do peptídeo clavanina A não causa nenhum dano à membrana ou parede celular para as células *S. aureus* e *E. coli* (Silva et al., 2016).

Conforme resultados de simulação de dinâmica molecular obtidos por Silva et al. (2016), a região da clavanina A que possui alta similaridade com magainina 1 apresentava uma maior contribuição na interação com lipídeos (DOPC e DPPC). Em simulações, observou-se que os resíduos Gly-3, Asn-14, His-17 Gly-18 e Phe-19 apresentavam contato com lipídios com elevada similaridade à magainina 1. Esses dados esclarecem os resultados obtidos por van Kan et al. (Ellen J. M. van Kan et al., 2001), onde, em experiências, fizeram modificações no peptídeo, substituindo resíduos de glicina por resíduos alanina. Eles observaram que substituições na posição Gly-6 Gly-13 e Gly-18, em meio ácido, levava à diminuição da atividade do peptídeo contra *L. sake* (bactéria Gram positiva). Substituindo-se apenas o resíduo de Gly-13, obtiveram-se peptídeos ligeiramente menos potentes, enquanto substituições da Gly-6 dobram a MIC (Ellen J. M. van Kan et al., 2002). A glicina na posição 6 mostrou-se importante para a flexibilidade peptídeo, o resíduo de Gly-18 importante na interação com lipídeos e Gly-13 para ambos (Silva et al., 2016). Essa articulação flexível pode estar atuando de modo a facilitar extremidade *N*-terminal do peptídeo a se inserir profundamente na bicamada da membrana (Ellen J. M. van Kan et al., 2002).

Constata-se, com base no exposto acima, que o peptídeo clavanina A apresenta uma atividade diretamente relacionada com sua flexibilidade conformacional, assim como Caerin 1.1 e magainina. Essa flexibilidade favorece uma orientação ótima, quando o peptídeo interage com as membranas das células bacterianas.

O meio em que o peptídeo se encontra, influência bastante em sua estruturação. Constata-se que a água desempenha um papel importante para macromoléculas biológicas em sua estrutura, estabilidade e função (Nicholls, 2000). No entanto, o papel da água às vezes é ignorado em cálculos estruturais por RMN. Embora as restrições são derivadas a partir de dados experimentais, coletados a partir de amostras em solução, o refinamento das estruturas em solução através de dinâmica molecular e análise simulada (simulated annealing) geralmente é realizada em vácuo com carga molecular reduzida, sem considerar o efeito do solvente sobre a estrutura.

O modelo de solvente implícito ou modelo de solvatação contínuo trata o solvente, usualmente água, como um meio dielétrico contínuo em torno do soluto, perto da superfície de van der Waals, interagindo com as cargas sobre a molécula de soluto (Xia, Tsui, Case, Dyson, & Wright, 2002). A estrutura de menor energia refinada em

água para o peptídeo clavanina A está apresentada na Figura 4.21, com os resíduos de aminoácidos catiônicos destacados em rosa.

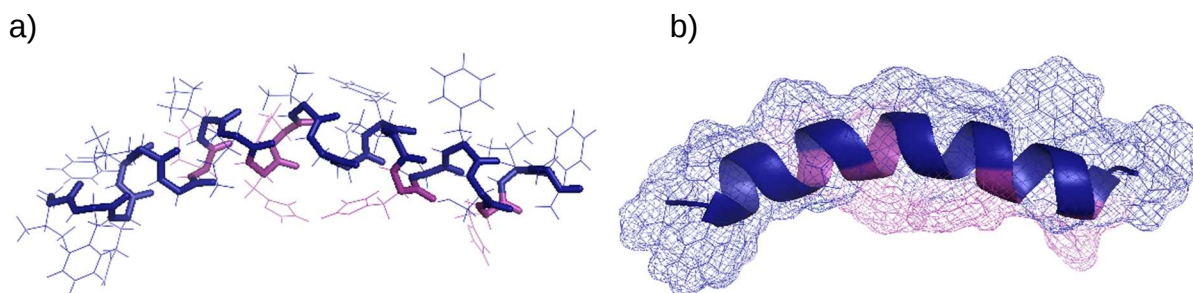


Figura 4.21 Estrutura de menor energia para o peptídeo clavanina A em solução de TFE- d_3 :H $_2$ O 35:65 (v/v), pH 4,3. A) Estrutura de menor energia com os resíduos catiônicos destacados em rosa B) Visualização em superfícies.

A curvatura observada na estrutura do peptídeo é coerente com a ausência de alguns NOEs (Figura 4.15, pág. 57) de média distância ($i+3$) na região entre os resíduos His-11 a Val-16, no entanto, a estrutura de menor energia mostra uma estruturação em toda região compreendida entre os resíduos de Phe-2 e Val-22. Esse fato realça a observação feita por Spronk et al. com base no modelo da estrutura estática de que certos NOEs podem ser esperados, mas não detectados devido a presença de dinâmica interna na molécula (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004).

A precisão das estruturas resolvidas por RMN foram expressas em função do desvio quadrático médio. Verificou-se a qualidade geométrica dos modelos obtidos, pois esse é um aspecto importante na validação das estruturas obtidas. As coordenadas moleculares foram descritas, usando-se o desvio de coordenadas RMSD (*Root of Mean Square Deviations*). Esse parâmetro foi utilizado como uma medida da qualidade na determinação da estrutura. Presume-se que valores mais baixos indicam resultados mais precisos e melhores, porém a exatidão também é muito relevante na determinação de um conjunto de estruturas verdadeiro, pois um valor de RMSD baixo pode ser preciso mas não exato (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004).

Através do programa MOLMOL (Koradi et al., 1996), as dez estruturas de menor energia foram sobrepostas (Figura 4.20) e foram obtidos os valores de RMSD (Tabela 4.4), pelo alinhamento dos átomos entre os confórmeros. O valor de RMSD equivalente a 1,05 Å evidenciou que as estruturas exibem uma boa geometria, indicando uma boa flexibilidade conformacional. Tal valor reflete a dinâmica interna da molécula e as

incertezas que derivam da conversão experimental dos dados e processos computacionais. Spronk ressalta que, para estruturas determinadas por RMN em solução, é de se esperar que, devido à dinâmica interna, as estruturas sempre exibam uma variação conformacional em torno de uma conformação média (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004). A existência de conformações convergentes mostra a consistência e a compatibilidade das restrições utilizadas nos cálculos estruturais.

Tabela 4.4 Estatística das dez estruturas de menor energia, quanto à geometria das estruturas obtidas.

RMSD – Todos os resíduos ^a	Å
Cadeia principal	1,05 ± 0,34
Cadeia principal e átomos pesados	1,99 ± 0,41
RMSD – Segmento helicoidal ^a	
Cadeia principal	0,92 ± 0,32
Cadeia principal e átomos pesados	1,83 ± 0,40

a-Dados obtidos pelo programa MOLMOL

A Figura 4.22 mostra a estrutura do peptídeo representada por projeções bidimensionais em forma helicoidal, inicialmente proposto por Schiffer & Edmundson, 1967. A projeção em hélice predita para o peptídeo clavanina A (<http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>), destaca uma grande quantidade de resíduos verdes, indicando a alta hidrofobicidade, principalmente pela presença dos 5 resíduos de fenilalanina. A maior intensidade da cor verde indica maior hidrofobicidade. Os resíduos mais hidrofílicos sem carga estão destacados em vermelho. Desta forma, a disposição dos resíduos mostra a tendência do peptídeo em formar uma α -hélice anfipática.

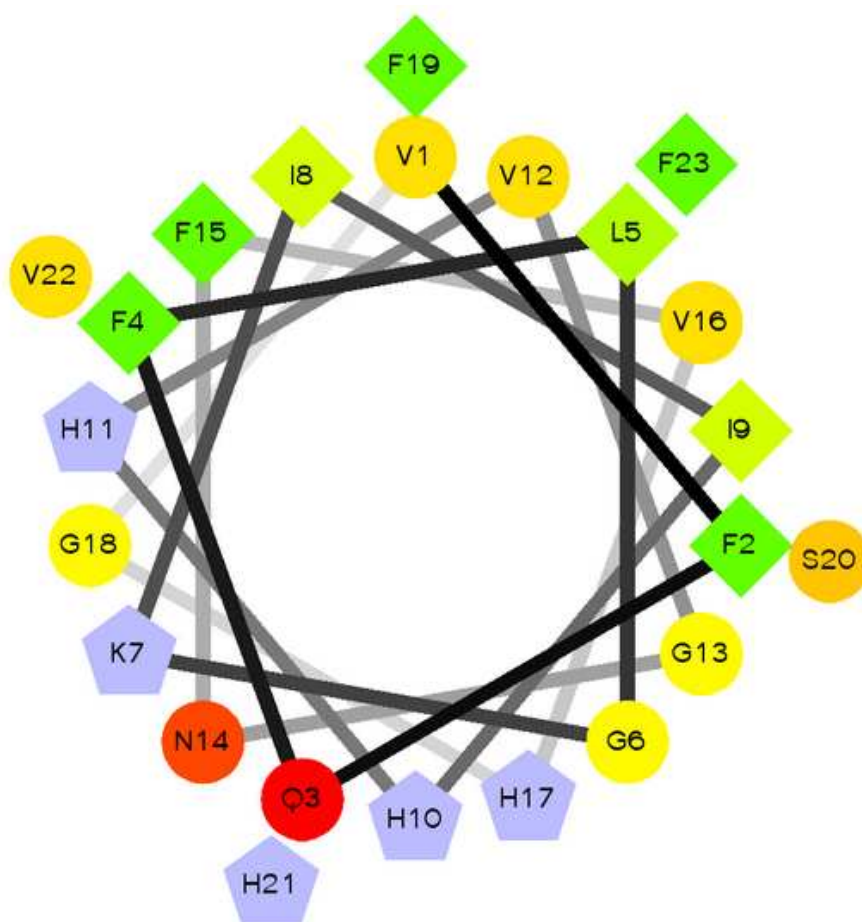
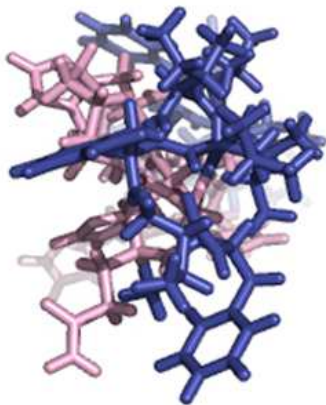


Figura 4.22 Projeção helicoidal para o peptídeo clavanina A. Estão apresentados os resíduos catiônicos como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores, assim os resíduos mais hidrofóbicos apresentam-se em verde, com hidrofobicidade zero em amarelo, e aqueles mais hidrofílicos em vermelho.

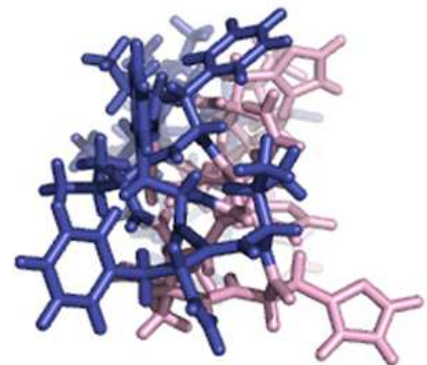
A presença de aminoácidos polares em intervalos relativamente regulares na cadeia principal sugere que o peptídeo é formado por uma hélice anfipática, sendo 52% dos resíduos hidrofóbicos (http://aps.unmc.edu/AP/database/query_output.php?ID=00276, acessado 12/02/2014). Lehrer e colaboradores também observaram, pela projeção helicoidal juntamente com os dados de dicroísmo circular, essa tendência anfipática (I.Hee Lee et al., 1997). As vistas frontais do peptídeo, deixam clara a natureza anfipática do peptídeo clavanina A (Figura 4.23.a), estando os resíduos hidrofóbicos (Val-1, Phe-2, Phe-4, Leu-5, Ile-8, Ile-9, Val-12, Phe-15, Val-16, Phe-19, Val-22 e Phe-23) destacados em azul, como já esperado pela projeção em hélice (Figura 4.22) que mostra a tendência do peptídeo em formar uma α -hélice anfipática.

A)

vista frontal

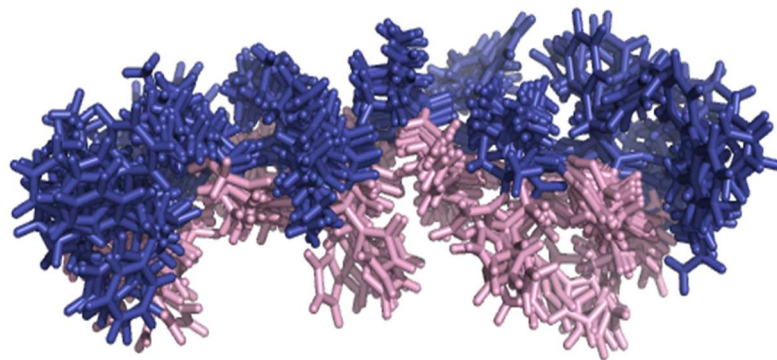


N-terminal



C-terminal

B)



C)

180°

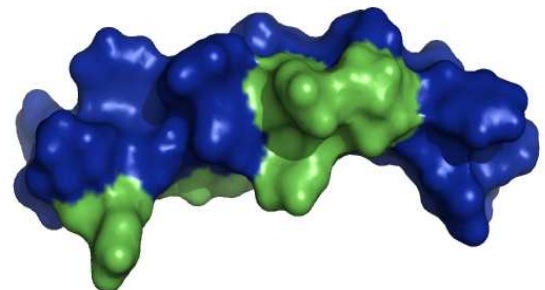
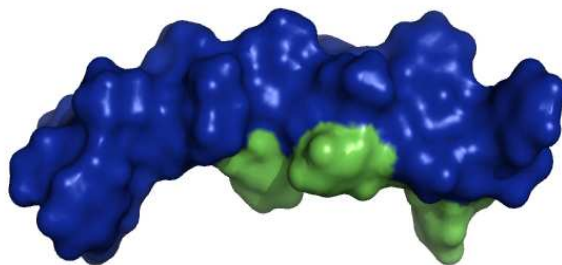


Figura 4.23 Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3, a 25 °C. A) Vista frontal N-terminal e C-terminal, em azul resíduos hidrofóbicos e em rosa resíduos hidrofílicos b) Sobreposição das dez estruturas de menor energia, em rosa resíduos polares e azul apolares C) Vista em Superfícies com resíduos catiônicos destacados em verde, código pdb: 2MVE.

Um estudo realizado por Van Kan et al. (2003) explorou a importância dos resíduos de fenilalanina no modo de ação do peptídeo clavanina A. Substituíram os resíduos de fenilalanina pelos resíduos hidrofóbicos de leucina e isoleucina e aromáticos por triptofano e tirosina. Observaram que as fenilalaninas poderiam ser substituídas por esses resíduos, sem perda significativa de sua atividade, sugerindo que o papel das fenilalaninas na sequência do peptídeo nativo seria para proporcionar hidrofobicidade e, com isso, afinidade pelas membranas (Ellen J M Van Kan, Demel, Bent, & Kruijff, 2003) Esses resíduos, como pode ser observado na Figura 4.23, se localizam na face hidrofóbica do peptídeo (representada em azul).

Há de se considerar que a estrutura helicoidal deste peptídeo, em meio ácido, inclui cinco resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys-7, His-10, His-11, His-17, His-21), localizados em uma mesma face, e nenhum resíduo de aminoácido com carga negativa. Os resíduos de histidina têm um pK_a do nitrogênio protonado da cadeia lateral geralmente de 6,0 (NELSON, David L.; COX, 2011). Consequentemente, os peptídeos ricos em histidina, como clavanina A, têm cargas positivas líquidas elevadas em meio ácido.

A presença de quatro resíduos de histidina na sequência peptídica indica que a carga líquida do peptídeo está na faixa fisiológica, dependente do pH. Com base nisto Van Kan et al. verificaram que o peptídeo apresentava atividade antimicrobiana mais elevada a pH 5,5 (meio ácido) do que em meio neutro. Além disso, a Clavanina A permeabiliza a membrana alvo através de dois mecanismos completamente distintos, que dependem do pH (Ellen J. M. van Kan et al., 2002). O aumento de atividade foi sugerida resultar da maior afinidade da clavanina A com a membrana bacteriana aniônica, porém a inserção seria essencialmente independente do pH, sendo essas interações conduzidas principalmente por forças hidrofóbicas (Ellen J. M. van Kan et al., 2001). Para melhor ilustração das informações discutidas, são destacados na estrutura de menor energia, Figura 4.24, os resíduos de aminoácidos conforme suas características hidrofóbicas e catiônicas.

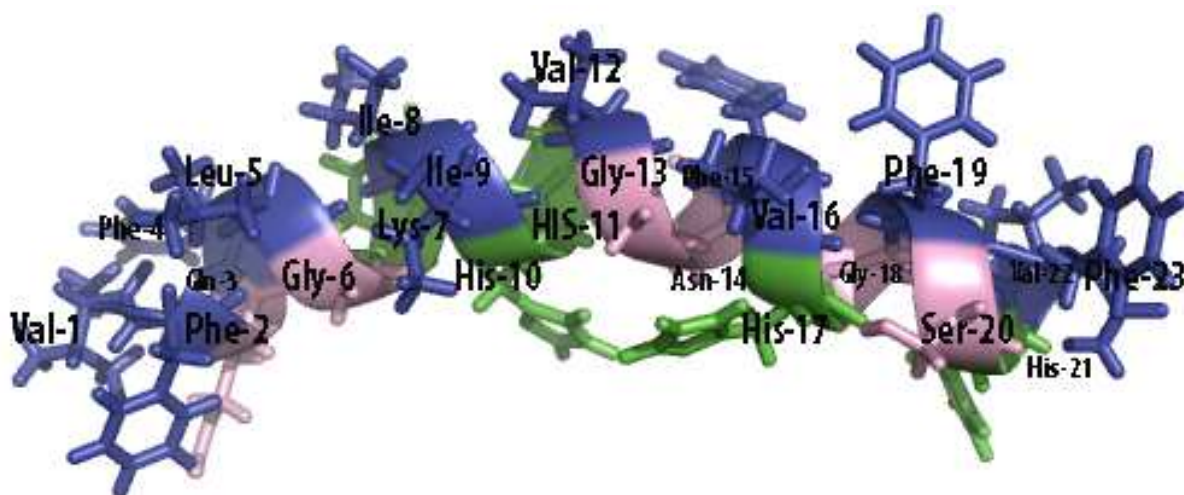


Figura 4.24 Estrutura de menor energia do peptídeo clavanina A em TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa e catiônicos em verde.

Destaca-se que as estruturas apresentadas acima também foram avaliadas quanto a sua qualidade estereoquímica através do programa PROCHECK (Laskowski, MacArthur, Moss, & Thornton, 1993). A combinação dos ângulos diedros ϕ e ψ foram um importante indicador de qualidade estrutural para o peptídeo, pois baseando-se em considerações estéricas por Ramachandran et al. (Ramachandran, Ramakrishnan, & Sasisekharan, 1963), mostraram que a combinação dos ângulos ϕ e ψ dos resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica está restrita a certos intervalos, podendo ser visualizados no chamado gráfico de Ramachandran. O ângulo de torção ϕ corresponde a 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).

O gráfico possui a combinação de quatro regiões: favorecidas, permitidas, menos permitidas e proibidas. O gráfico de Ramachandran, para as dez estruturas obtidas (Figura 4.25), mostrou que a família das estruturas calculadas apresenta boa qualidade, pois 100% dos ângulos ϕ e ψ se localizaram em regiões favorecidas, características de α -hélice de sentido horário, ou seja, apresentam conformações sem impedimento estérico. O peptídeo assume conformações energeticamente favoráveis, ou seja, o modelo não possui ligações peptídicas com ângulos de torção incompatíveis com a estrutura.

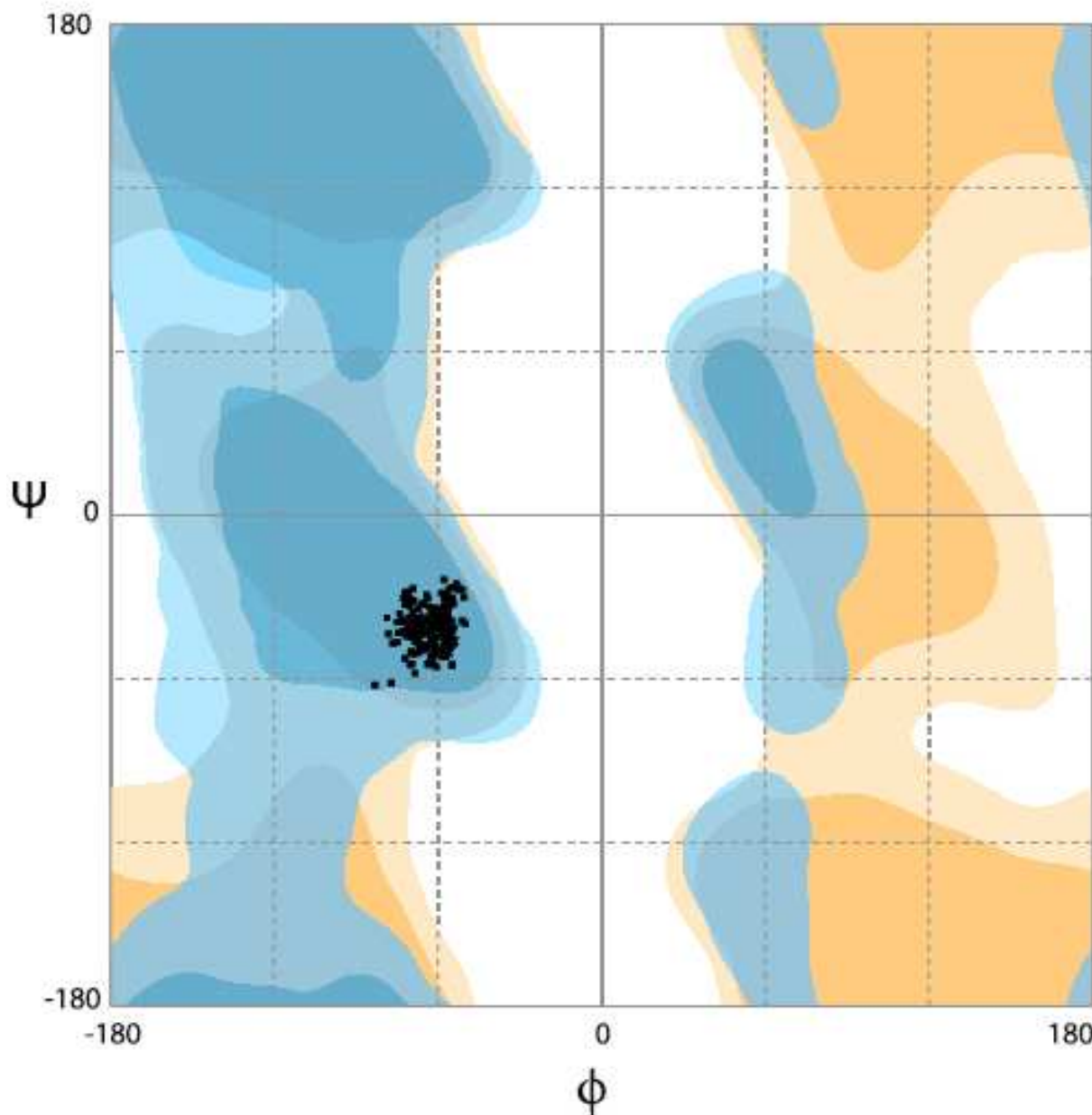


Figura 4.25 Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do *Ramachandran Plot* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

A qualidade da geometria das estruturas calculadas foi inferida pelo programa WHAT IF (Vriend, 1990), utilizado como método de validação, diretamente relacionado às propriedades geométricas. O programa utiliza de parâmetros estatísticos os chamados Z-scores e RMS Z-scores como indicadores de aceitabilidade das propriedades calculadas (<http://www.cmbi.ru.nl/whatif/checkhelp>). Os valores de Z-

scores (Equação 3. 7) mostram vários indicadores de qualidade, que independem das restrições. É um parâmetro de distribuição Gaussiana normalizada derivada de um banco de dados de estruturas definidas por raios-X. Já os valores de RMS Z-scores (Equação 3. 8) mostram o quão bem o modelo está em conformidade com valores de restrições e refinamento.

$$Z = \frac{x - (x_{db})}{\sigma(x_{db})} \quad \text{Equação 3. 7}$$

$$RMSZ = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n Z_j^2}{N}} \quad \text{Equação 3. 8}$$

Os desvios padrão de distância da média são chamados de "Z". Ele corresponde ao valor medido menos a média do banco de dados, dividido pelo desvio padrão da população, onde (x_{db}) corresponde à média do banco de dados e σ ao desvio padrão (variação em relação aos modelos no conjunto).

Assim Z será negativo, se x for menor do que a média, e positivo se o valor for maior do que a média. Os valores de Z-scores negativos na tabela refletem uma menor qualidade das estruturas refinadas em comparação as estruturas definidas por raios-X do banco de dados. Z-scores inferiores a -2,0 indicam problemas no modelo, e Z-scores inferior a -4,0 indicam erros graves, todos os valores de $Z < -4$ ou $Z > 4$, são "Outliers".

Observa-se na Tabela 4.5 que os valores de Z-scores estão dentro do esperado, com exceção dos chi-1/chi-2 rotômetros de normalidade. Esse dado possui valores isolados, podendo ser *outliers*, improváveis de ocorrer, isto indica que existem cadeias laterais com preferências conformacionais eclipsadas, de alta energia. Provavelmente devido, nos cálculos estruturais, o termo de campo de força para os ângulos diedros ser muitas vezes desligado, resultando em rotômetros bastante pobres com elevado número de estados eclipsados. Apesar do observado é descartada a possibilidade da ocorrência de verdadeiros desvios conformacionais preferenciais.

Tabela 4.5 Indicadores de qualidade estrutural para o peptídeo clavanina A.

Z-scores	
1ª geração qualidade de empacotamento	1,694 +/- 1,4 87
2ª geração qualidade de empacotamento	-0,371 +/- 0, 783
Aspecto do gráfico de Ramachandran	-0,017 +/- 0,498
Chi-1/chi-2 rotâmetros de normalidade	-7,513 +/- 0,663
Conformação da cadeia principal	2,497 +/- 0,489
RMS Z-scores	
Comprimentos de ligação	1,085 +/- 0,004
Ângulo de ligação	0,707 +/- 0,019
Restrição de ângulo Ômega	0,156 +/- 0,028
Planaridade da cadeia lateral	0,157 +/- 0,049
Inadequada distribuição diedral	0,825 +/- 0,026
Distribuição de resíduos internos/externos	1,386 +/- 0,094

O Z-score do aspecto do diagrama de Ramachandran mostra o quão bem as conformações da cadeia principal, de todos os resíduos, correspondem às áreas permitidas conhecidas no gráfico Ramachandran. O valor está dentro dos limites esperados para estruturas bem refinadas, sendo assim a elevada porcentagem de resíduos nas regiões mais favorecidas (100%) implicaram efetivamente em um bom Z-scores.

O outro parâmetro da tabela, o RMS Z-score, faz uma análise da qualidade dos dados do Z-score. Ele verifica se a distribuição dos valores tem mais (ou menos) valores atípicos do que o esperado, a partir da distribuição de referência (Equação 3. 9), onde Z_j corresponde ao Z-escore definido para a observação j e N o número total de observações.

No caso em que a distribuição de um dado parâmetro tem uma média e desvio padrão idêntico à distribuição de referência, o RMS Z-score é geralmente próximo de 1. Para distribuições mais estreitas, o RMS Z-scores será <1 e, para distribuições mais largas, >1 . Deve-se ressaltar aqui que, a fim de calcular um significativo RMS Z-score, as médias de distribuição de referência e a distribuição do modelo têm que ser iguais. Como será mostrado abaixo, o parâmetro geométrico RMS Z-scores é um indicador muito sensível para problemas relacionados à geometria local.

No que se refere aos indicadores de conformidade com valores de restrição de refinamento, Tabela 4.5, observa-se que o modelo apresenta boa qualidade, apesar de que existam alguns problemas como baixo RMS Z-score de ângulo ômega e planaridade das cadeias laterais. Isto porque as estruturas estão fortemente restringidas e devido à falta de restrições geométricas, respectivamente. No entanto, Spronk e colaboradores destacam que tais efeitos de restrição apertada não é grave sobre a qualidade da estrutura (Christian A E M Spronk et al., 2002).

As distâncias e ângulos das ligações entre os resíduos encontram-se próximos de 1. Eles possuem variação dentro do esperado para a média de tamanhos de ligações padrões para um peptídeo normalmente restrito, indicando que não foram utilizadas restrições muito fortes ou errôneas no refinamento.

A distribuição de resíduos internos/externos deve ser muito próxima de 1,0 para proteínas globulares, e deve estar próxima de 1,2 ou maiores valores para proteínas transmembranares (<http://swift.cmbi.ru.nl/gv/pdbreport/checkhelp/explain.html>). O peptídeo clavanina A apresenta o valor de 1,386 +/- 0,094, que concorda com a característica anfipática do peptídeo como observado na Figura 4.23 (página 70).

Desta forma, os resultados positivos do modelo superam os problemas observados, por apresentar um ótimo ambiente de empacotamento, comprimento e ângulo de ligação e cadeia principal estável, mostrando claramente que a modelagem apresenta resultados satisfatórios.

As interações e afinidade do peptídeo clavanina A foram investigadas em diferentes meios, utilizando o experimento de DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), uma técnica analítica não invasiva, desenvolvida em 1992 por Morris e Johnson (Morris & Charles S. Johnson, 1992), capaz de identificar os componentes moleculares de misturas e, simultaneamente, caracterizar os tamanhos de agregados e outras estruturas presentes.

O experimento de DOSY é um método de análise alternativo, um experimento de RMN pseudo-bidimensional, que, usando a transformada inversa de Laplace (TIL), apresenta os deslocamentos químicos (RMN 1D) na dimensão direta, dispersos ao longo da segunda dimensão em relação ao coeficiente de difusão (D) ou tamanhos de partículas no outro. Assim, o coeficiente de difusão de cada substância é obtido pela correlação com seus respectivos sinais de hidrogênio.

Vale ressaltar que esse método é eficaz na detecção de impurezas e agregados em amostras, além disso é relativamente fácil de ser implementado em sistemas modernos de espectrômetros de RMN (Morris & Charles S. Johnson, 1992). Ele é baseado em uma sequência de pulsos com ecos de spin com gradientes de campo magnético pulsados.

Destaca-se que os experimentos de DOSY podem ser utilizados para avaliar a afinidade da ligação de peptídeos a micelas. A ligação de um peptídeo a uma micela altera efetivamente o volume molecular do peptídeo. Desta forma, as interações moleculares podem ser monitoradas através da observação de alterações do coeficiente de difusão do peptídeo. No entanto, deve-se considerar que a ligação de um peptídeo na superfície de uma micela é um processo de equilíbrio entre a ligação micela-peptídeo e as espécies monoméricas em solução. Assim, o coeficiente de difusão observado é a média do peso das duas espécies (Clark, Bartolotti, & Hicks, 2013).

A técnica de DOSY foi aplicada neste trabalho com o intuito de estudar o comportamento da interação do peptídeo em função da concentração do mesmo e do meio. Esse método é capaz de proporcionar uma visão global da dinâmica translacional dos constituintes de uma solução, sejam eles moléculas pequenas, macromoléculas, complexos ou agregados moleculares.

A taxa de difusão relativa é inversamente proporcional à alteração da viscosidade da solução. No entanto, a equação de Stokes-Einstein fornece a dependência do coeficiente de difusão de uma partícula esférica em solução em uma diluição infinita, sendo r o seu raio hidrodinâmico, η viscosidade do solvente, T temperatura e k é a constante de Boltzmann (Souza & Laverde Jr., 2002). Os coeficientes de difusão e raios hidrodinâmicos podem ser correlacionados na relação teórica de Stokes-Einstein,

Equação 3. 10 (Courtenay Lewis, 1973).

$$D = (kT)/(6\pi\eta r) \quad \text{Equação 3. 10}$$

Sabe-se que o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico da molécula, assim quanto menor o coeficiente de difusão maior o raio hidrodinâmico da molécula (Clark et al., 2013).

A Figura 4.26 apresenta o mapa de contornos de DOSY do peptídeo a 2 mM em água e TMSP- d_4 . No mapa de contornos de DOSY, os deslocamentos químicos em ppm estão apresentados em uma dimensão e os coeficientes de difusão molecular em outra. O coeficiente de difusão em $67,0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ corresponde a difusão do TMSP- d_4 e o sinal em 3,81 ppm é referente a uma contaminação. O peptídeo em água apresenta um coeficiente de difusão de $13,3 \cdot 10^{-11} \pm 4,71 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$, com sinal de difusão bem definido, indicando que o peptídeo clavanina A encontra-se em solução na forma de monômeros.

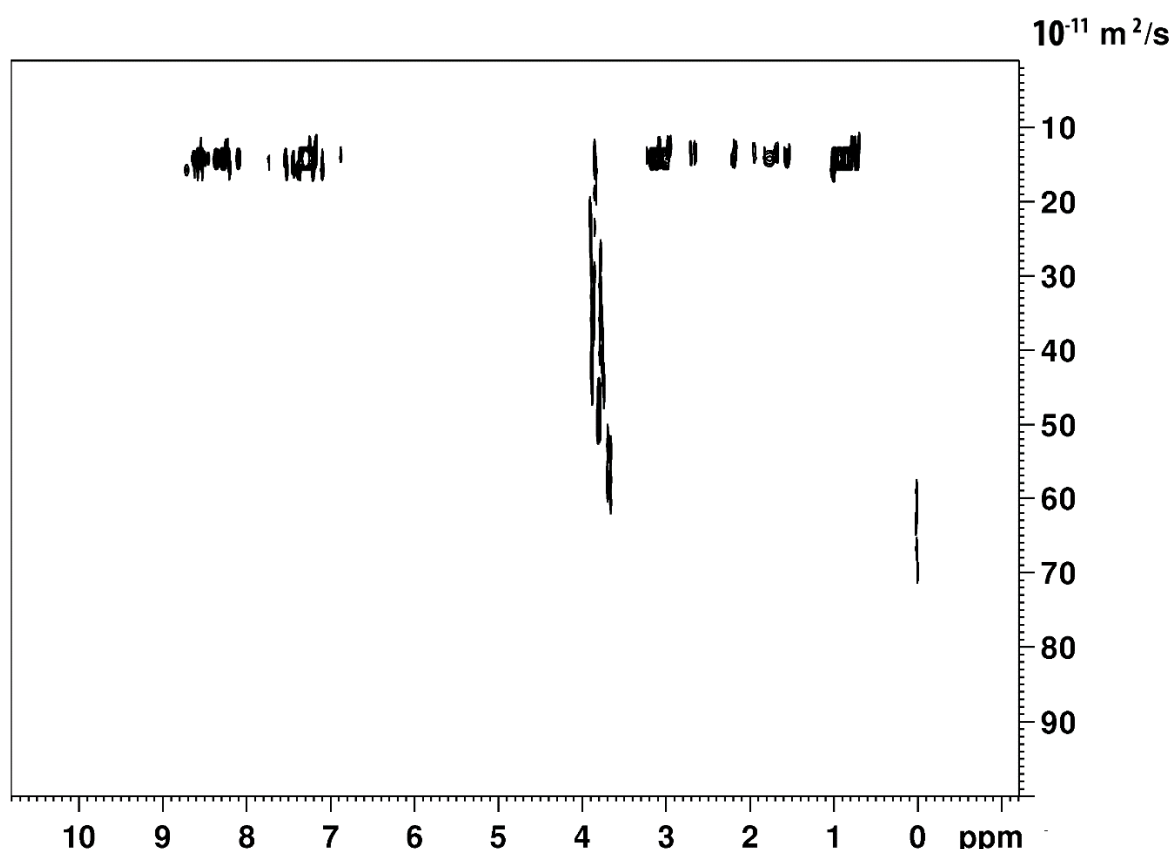


Figura 4.26 Mapa de contornos de DOSY ^1H , do peptídeo clavanina A à 2 mM em solução aquosa, pH 4,3 e 25 °C.

Experimentos de RMN de medidas de difusão utilizando DOSY 2D auxiliam na exploração das interações intermoleculares (Gayen, Goswami, & Mukhopadhyay, 2011). O conhecimento das interações proteína-ligante é essencial, porque muitos processos, biologicamente importantes, são mediados pela ligação de uma pequena molécula a uma enzima ou receptor da superfície celular. Medidas de coeficiente de difusão permitem a análise quantitativa da ligação ao longo de uma ampla gama de

constantes de dissociação e proporções de concentração de proteína-ligante (Lucas & Larive, 2004).

Germann e colaboradores, em vários experimentos, variaram os meios e solventes e observaram a associação de L45, S6c e 1-butanol com micelas. Em seus resultados, observaram que dois peptídeos podem coexistir em uma mesma micela, pois o aumento da concentração do peptídeo levava a um menor coeficiente de difusão (Zhang, Qu, Covarrubias, & Germann, 2013). Moureau et al. (2004) também abordaram o comportamento de oligomerização da proteína O2bZIP, realizando experimentos de diluição da proteína. Os resultados de difusão ordenada por RMN e CD mostraram-se úteis, para determinar o tamanho das partículas e os estados de auto associação da proteína. O aumento do coeficiente de difusão em função da diminuição da concentração de proteína sugeriu que a perda da estrutura secundária de O2bZIP foi devido à dissociação das subunidades da proteína (Moreau et al., 2004).

O coeficiente de difusão do peptídeo, à concentração de 2 mM, diminuiu para $12,2 \cdot 10^{-11} \pm 2,06 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ em solução de 35% de TFE- d_3 , indicando a ocorrência de interação entre o peptídeo e as moléculas de TFE- d_3 . Quando preparado uma solução de 100 mM de meio mimético (SDS- d_{25}) e 1 mM do peptídeo, o coeficiente de difusão diminuiu para $5,9 \cdot 10^{-11} \pm 1,2 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$, devido ao aumento do raio hidrodinâmico do complexo peptídeo-micela, demonstrando que o peptídeo interage com as micelas de SDS- d_{25} .

O aumento da concentração do peptídeo não levou a um menor valor de difusão, dentro do erro. Isto indica que não ocorre associação peptídeo-peptídeo-micela, o que descarta a possibilidade de formação de agregados em uma mesma micela (Figura 4.27). O coeficiente de difusão é relativamente mais baixo quando a concentração do peptídeo diminui para 0,05 mM, porém o erro da medida foi maior. Estudos de interação entre um meio mimético e uma droga chamada losartan mostraram que uma concentração maior de losartan levava a dois valores menores de coeficiente difusão, indicando que havia a ocorrência da formação de agregados em uma mesma micela (Zervou et al., 2014). Contudo isto não foi observado neste trabalho, para o peptídeo clavanin A em micelas de SDS.

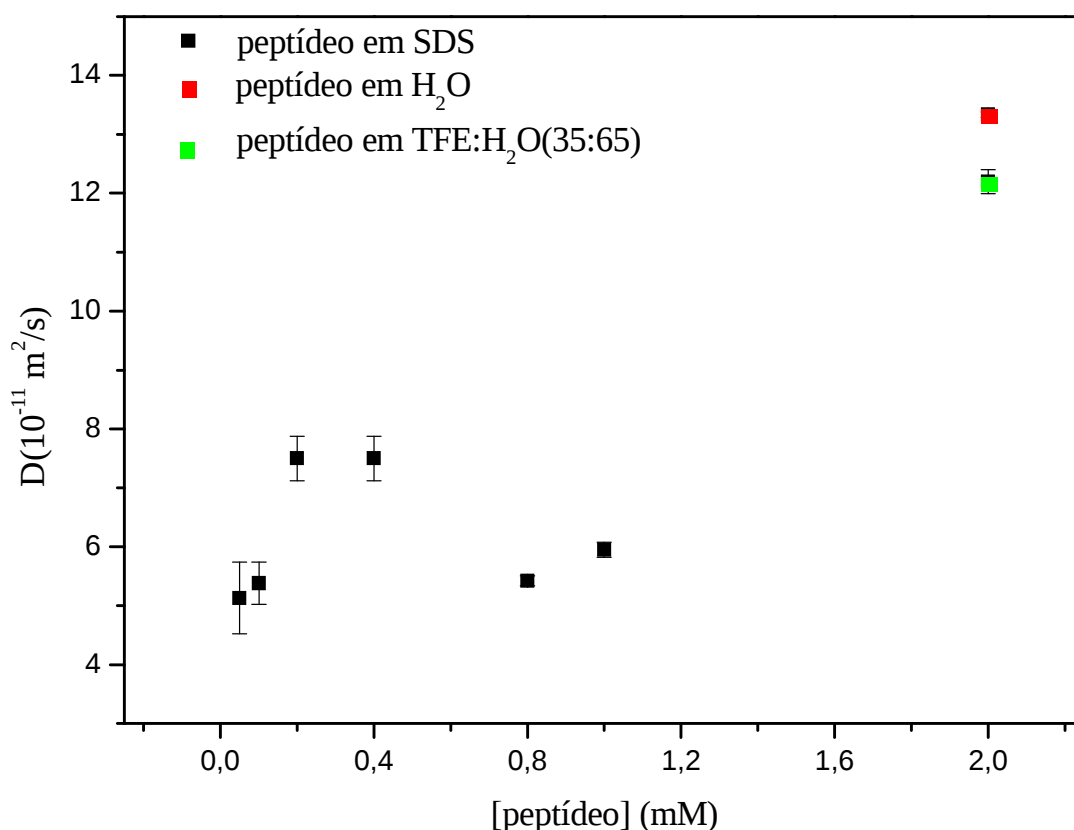


Figura 4.27 Gráfico com valores de coeficiente de difusão ordenada para o peptídeo clavanina A em diferentes meios e concentrações, em vermelho peptídeo em água, em preto peptídeo em solução 100 mM de SDS- d_{25} e em verde peptídeo em solução TFE- d_3 a 35%, pH 4,3 e 25 °C. As barras na figura correspondem ao erro da medida.

Estudos de associação de dois tripeptídeos à micelas de SDS foram realizados por Orfi et al. Nos experimentos de RMN de ^1H e de análise de coeficiente de difusão, utilizaram-se amostras peptídicas em meio ácidos, para que ambos peptídeos apresentassem carga. Observaram que o peptídeo Gly-His-Gly, de baixa hidrofobicidade, apresentou um maior valor de coeficiente de difusão comparado ao peptídeo Phe-His-Phe. O primeiro deveria interagir com as micelas principalmente por forças eletrostáticas, já o segundo por fortes interações hidrofóbicas além de interações eletrostáticas, por isso o maior valor de difusão foi observado para o peptídeo GHG. Observou-se que, na concentração micelar crítica (CMC) de SDS,1 o peptídeo FHF apresentava uma fração livre insignificante, sendo o coeficiente de difusão observado, correspondente praticamente ao peptídeo ligado à micela (Orfi, Lin, & Larive, 1998). Assim concluíram que a hidrofobicidade de um peptídeo desempenha um papel crucial no governo de sua interação com micelas de SDS (Deaton, Feyen, Nkulabi, & Morris, 2001).

O peptídeo clavanina A contém cinco resíduos de Phe com um total de 25 hidrogênios aromáticos. Em solução estes hidrogênios ressonam na região entre 7,44-7,10 ppm. As maiores alterações nos deslocamentos químicos na presença de micelas de SDS são observadas na região aromática do espectro, tal como apresentado na Figura 4.28. Observa-se a atenuação dos sinais dos H ϵ e H δ das cadeias laterais das fenilalaninas (Phe-2 em 7,39 e 7,30, Phe-4 em 7,33 e 7,24, Phe-15 em 7,34 e 7,22, Phe-19 em 7,21 e 7,15 e Phe-23 em 7,25 e 7,17) quando na presença de solução de TFE- d_3 , comparados às respectivas ressonâncias do peptídeo na presença de micelas de SDS- d_{25} , além do alargamento dos sinais hidrogênio na região dos amídicos indicando o aumento no tempo de correlação rotacional e portanto que o peptídeo está associado a micelas.

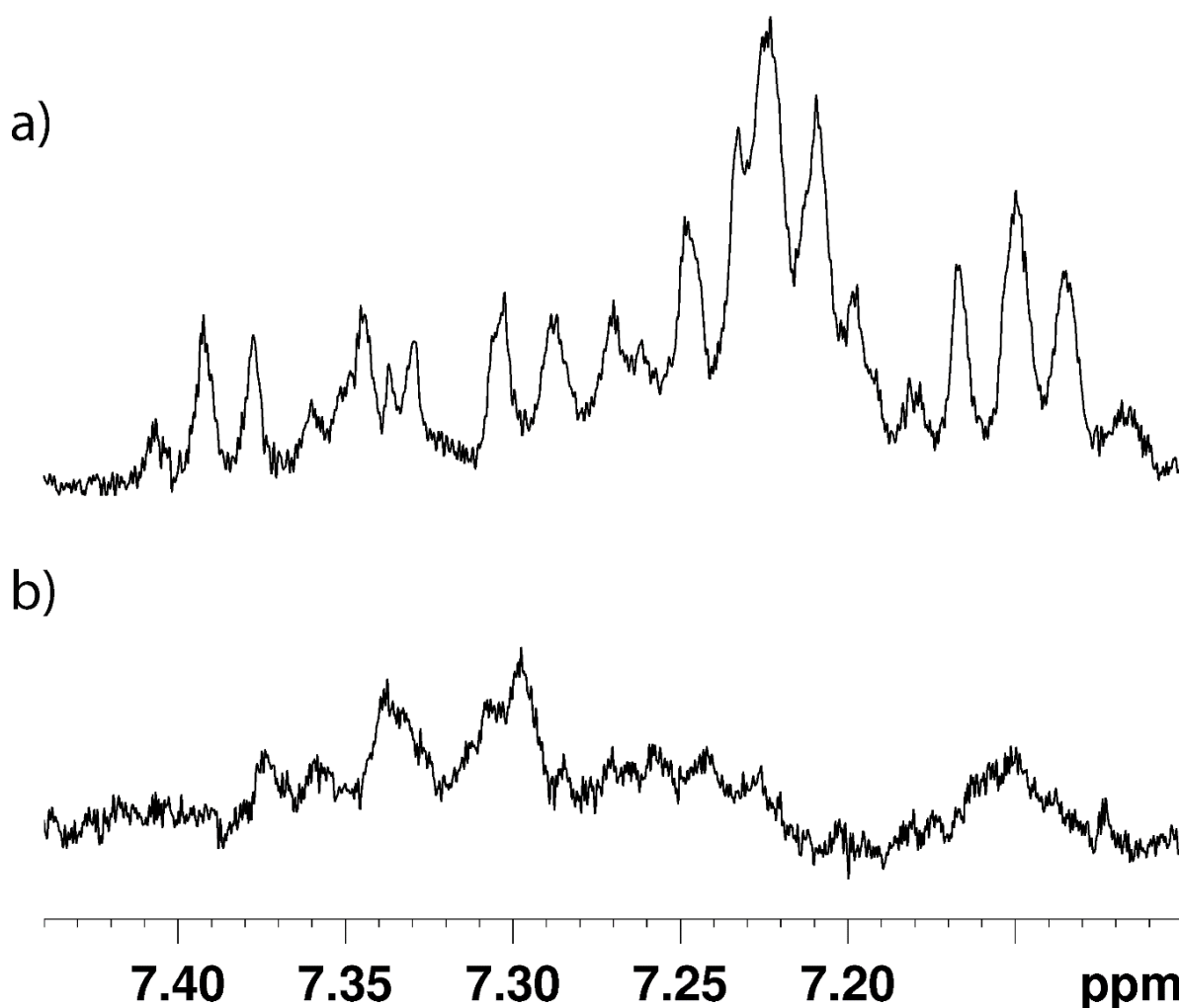


Figura 4.28 Espectro de ^1H para o peptídeo clavanina A a) 1 mM do peptídeo em solução de 35% de TFE- d_3 b) 1 mM do peptídeo na presença de 100 mM de SDS- d_{25} H $_2$ O/D $_2$ O 9:1 (v/v), pH 4,3, a 25 °C.

Tomados em conjunto, o comportamento dos deslocamentos químicos os dados de difusão, sugerem que os anéis aromáticos dos resíduos de fenilalanina penetram o interior da micela e as cadeias laterais das histidina localizam-se no exterior da micela. Observa-se a atenuação dos sinais das cadeias laterais da fenilalanina quando na presença de micelas de SDS- d_{25} , comparados aos em solução de TFE- d_3 , indicando a inserção dos anéis no interior das micelas ou em sua direção, como mostra a Figura 4.28.

Os resultados obtidos através dos experimentos de DC e de DOSY mostraram-se em concordância. Nos experimentos de DC, o aumento da concentração do peptídeo não conduziu à diminuição da estruturação do mesmo (Figura 4.3, pag. 46), bem como nos experimentos de DOSY, permanecendo quase que inalterado o coeficiente de difusão. A estruturação do peptídeo não está ligada à interação do peptídeo-peptídeo, mas apenas peptídeo-micela. Ou seja, não ocorre o favorecimento de estruturação pela existência de interação entre os monômeros ou a formação de agregados nas micelas.

Com os dados apresentados para o peptídeo clavanina A, pode-se destacar que os confórmeros do peptídeo apresentaram segmentos helicoidais bem definidos, exceto entre os resíduos Gly-13 e His-17. Neste intervalo, observou-se a existência de resíduos de aminoácidos responsáveis por desestabilizarem estruturas helicoidais, tal como resíduos de glicina, além de possíveis repulsões eletrostáticas entre os resíduos de histidina próximos espacialmente. Segundo Seo et al., em uma revisão, os PAMs ricos em aminoácidos específicos, tais como prolina, triptofano, arginina e histidina, geralmente não possuem elementos de estrutura secundária regulares (Seo et al., 2012). Porém, apesar da flexibilidade conformacional fornecida pelos três resíduos de glicina presentes na estrutura, esses não desfavorecem sua forma helicoidal o suficiente para promover uma quebra estrutural.

O painel de NOE já indicava esta região com uma região de estrutura secundária pouco definida pela ausência de correlações de média distância, isso também explica a leve curvatura na região central das estruturas obtidas. Observou-se também que o peptídeo estruturado em α -hélice mostrou uma anfipaticidade segregada, que pode permitir que ele interaja melhor com a membrana bacteriana.

A ausência de violações nos cálculos confirma que foram satisfeitas as condições conformacionais impostas pelas restrições, sendo que a qualidade dos resultados mostrou-se em concordância com os dados experimentais e o modelo.

4.2 Peptídeo Cm-p1

A espectroscopia de dicroísmo circular, muito utilizada para o estudo de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos, permitiu avaliar a dependência da estrutura do peptídeo Cm-p1 com a variação do pH, bem como em diferentes meios miméticos. Em solução aquosa (Figura 4.29), em solução de TFE:H₂O (Figura 4.30) e na presença de micelas de DPC (Figura 4.31) os espectros mostraram que o peptídeo não se orienta em uma estrutura secundária regular. O peptídeo apresenta-se na forma randômica, como evidenciado pela presença da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ próximo de 198 nm negativos e $n \rightarrow \pi^*$ em comprimento de onda de 212 nm.

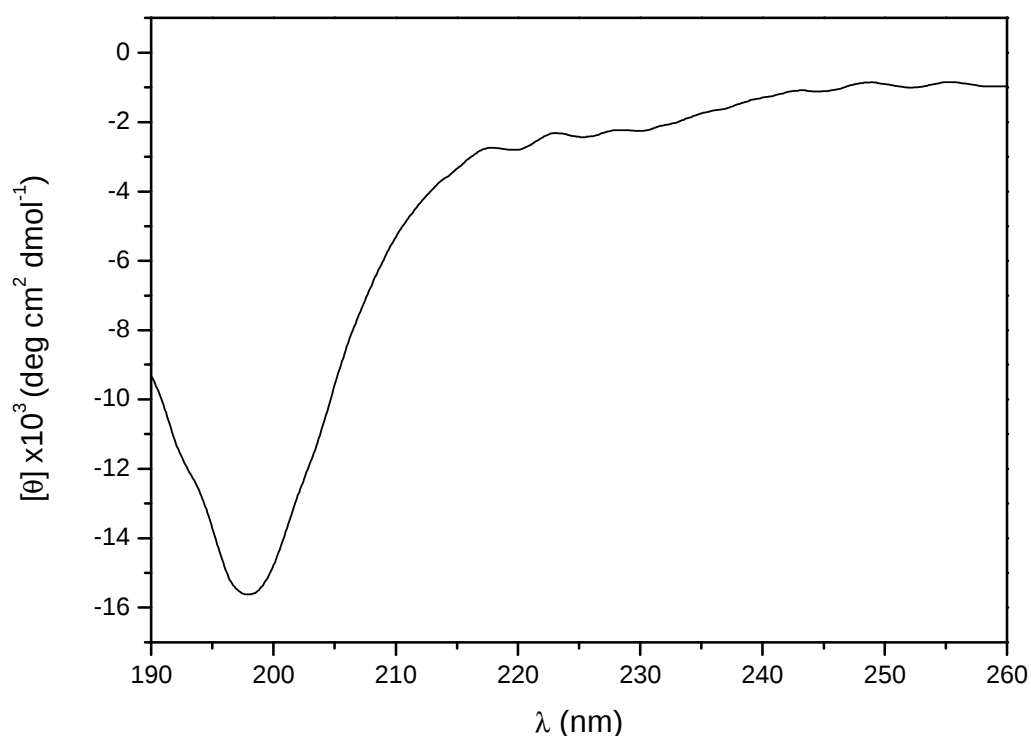


Figura 4.29 Espectro de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm² dmol⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 51 μ M, em água, pH 4 (tampão tris HCl) e 25 °C.

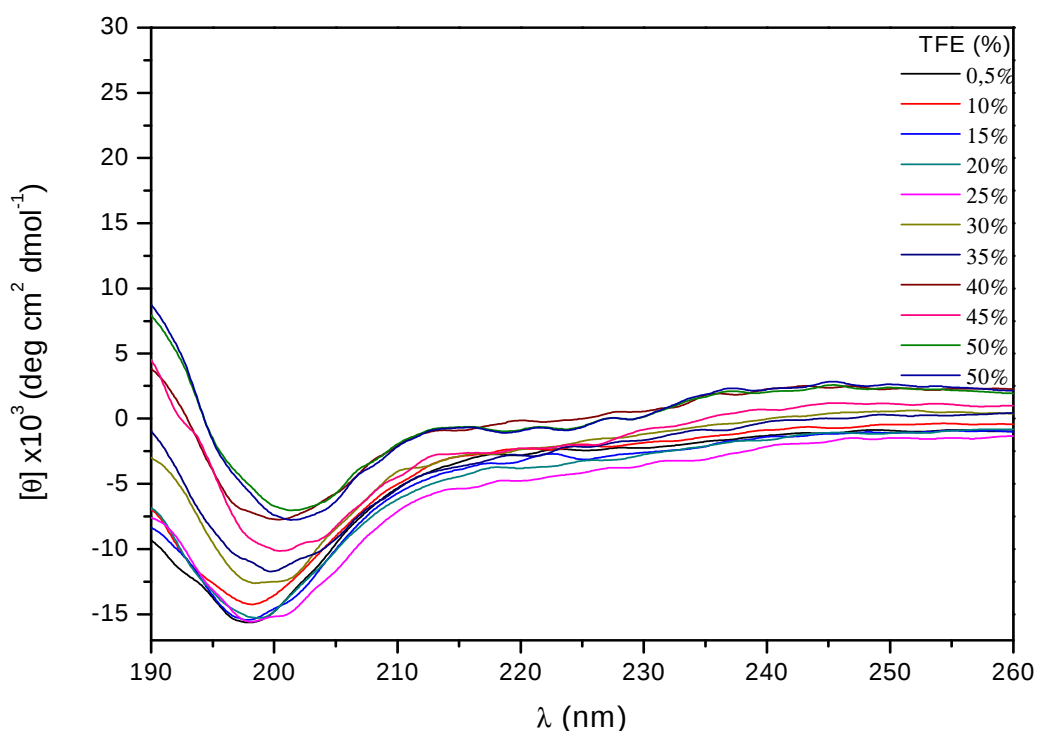


Figura 4.30 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm² dmol⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 51 μM, soluções de TFE:H₂O em diferentes proporções, pH 4 (tampão tris HCl) e 25 °C.

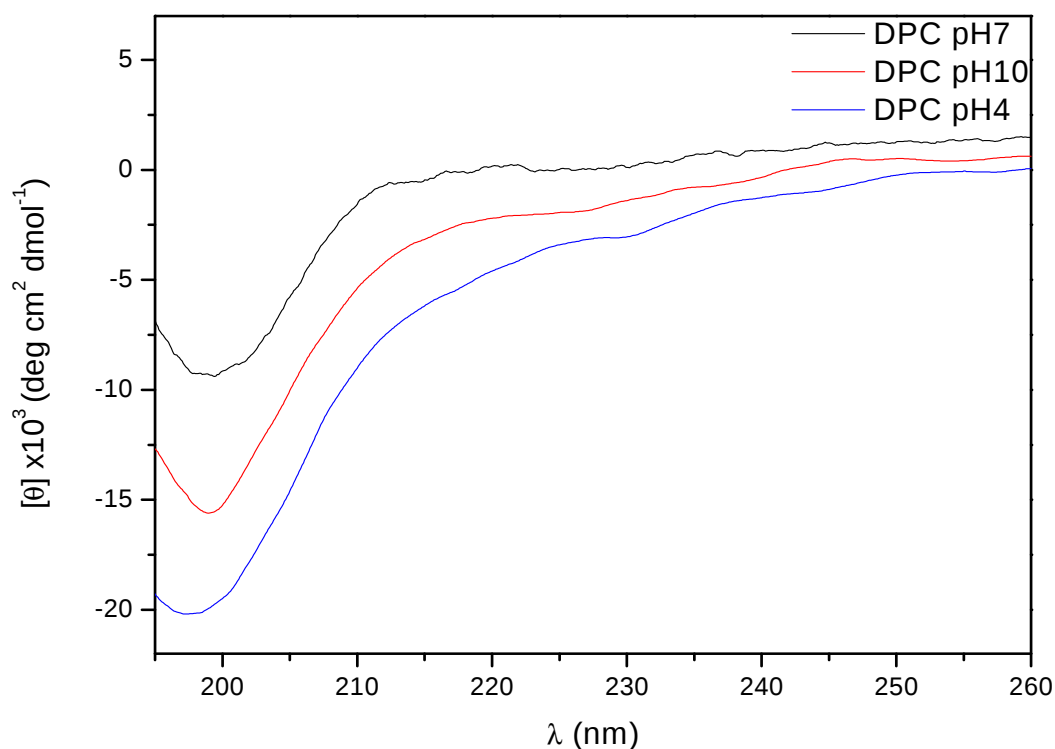


Figura 4.31 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ (deg cm² dmol⁻¹) em função de λ (nm). Peptídeo Cm-p1, a concentração de 30 μM, na presença de micelas de DPC (100 mM), diferentes pH (tampão 4, 7 e 10) e 25 °C.

A Figura 4.32 indica que o peptídeo *Cm-p1*, na presença de micelas de SDS e tampão tris HCl (pH 4), apresenta uma estrutura em conformação β pela transição $\pi \rightarrow \pi^*$ em 196 nm positivos e $n \rightarrow \pi^*$ em 218 nm negativos. O espectro também mostra que a estruturação se iniciou a partir de 0,2 mM de SDS. Quando o peptídeo estava na presença de 8 mM de SDS, a mudança conformacional da estrutura foi máxima. A Figura 4.32 mostra que a interação do peptídeo é governada pela interação com as micelas e que essas favorecem sua estruturação.

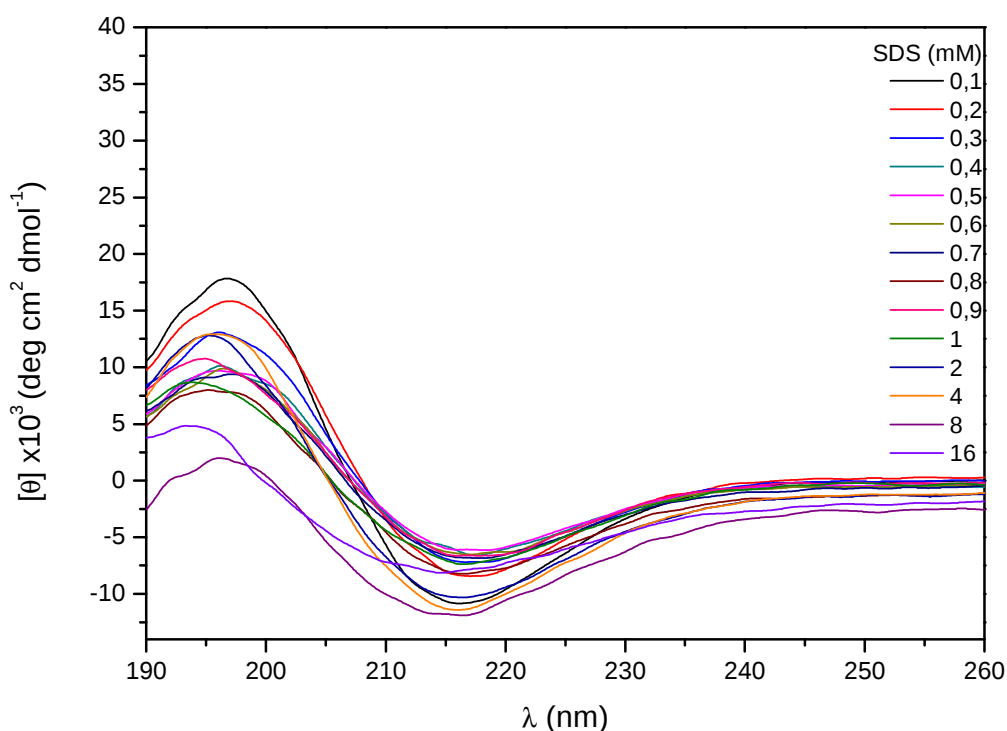


Figura 4.32 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo *Cm-p1* à 51 μM em diferentes concentrações de SDS (mM), pH 4 e 25 $^{\circ}\text{C}$.

Os resultados de DC mostram que o peptídeo apresenta uma preferência conformacional na presença de micelas de SDS, ao contrário de água, mistura de TFE:H₂O e na presença de micelas de DPC. Essa preferência pode ser explicada, devido ao peptídeo conter 3 resíduos de aminoácidos carregados positivamente, favorecendo uma melhor interação com as micelas de SDS carregadas negativamente, pela presença dos grupos sulfonato (Oremusova e Lengyel 2007). Já as micelas de DPC (dodecilsulfocolina), por serem compostas por um surfactante zwitteriônico, não favorecem uma maior estabilidade estrutural.

A variação de pH para o meio contendo as micelas de SDS (Figura 4.33) demonstra uma maior estruturação entre os pH 4 e 5 (tampão tris HCl). Sendo que o peptídeo não apresenta conformação preferencial em pH 7. Isto mostra que a estruturação do peptídeo é estabilizada em micelas principalmente por forças eletrostáticas. Durante o experimento de variação de pH, foi observado que o peptídeo precipitou-se a pH 3, contudo não houve modificação no aspecto do espectro de DC, indicando que o perfil característico de conformação β era devido as interações entre as próprias moléculas. É possível identificar a presença de um ponto isodicroico, ao redor de 212 nm, caracterizando a presença de apenas dois tipos de estruturas: conformação β e randômica.

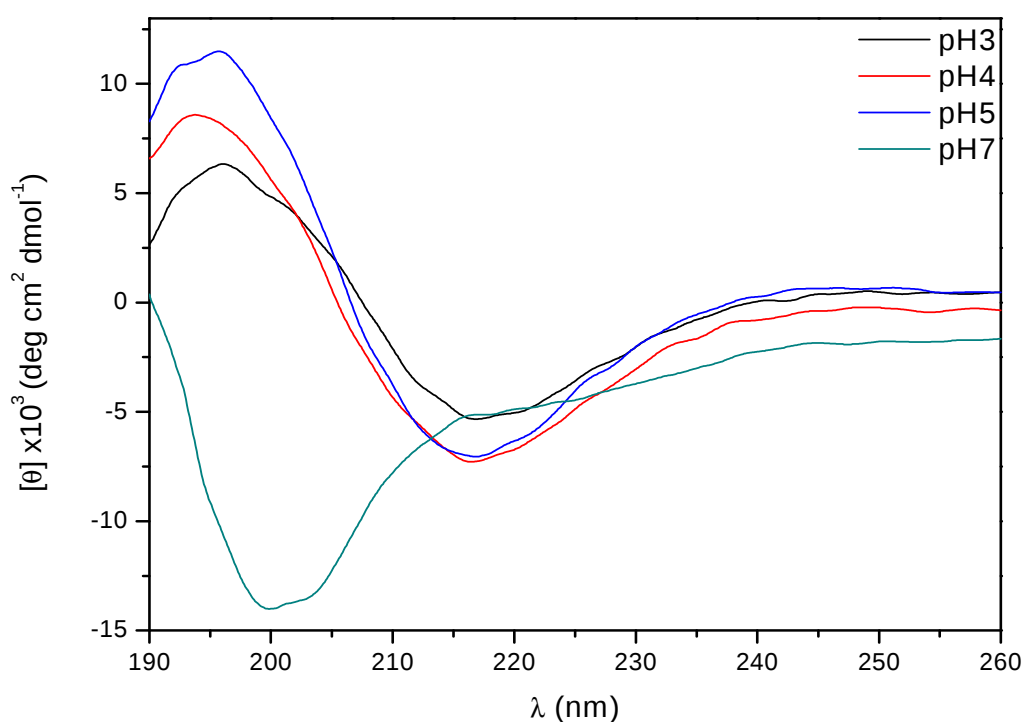


Figura 4.33 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo *Cm-p1* à 51 μM em 8 mM de micelas de SDS e tampões pH 3, 4, 5 e 7 e 25 $^{\circ}\text{C}$.

Como o tampão pode influenciar na estruturação do peptídeo, foram realizados experimentos de dicroísmo circular com o peptídeo *Cm-p1* em pH 4,3, na ausência de tampão.

O espectro de DC (Figura 4.34) do peptídeo em na presença de 16 mM de micelas de SDS (acima da concentração micelar crítica) mostra que o peptídeo se

estrutura em hélice como indicado pela presença de uma região positiva em 190 nm, correspondente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguida dos mínimos com valores negativos em 203 nm e em 217 nm, correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente. Observou-se uma estruturação máxima equivalente a 41,31 %.

Os resultados de DC mostraram que o peptídeo *Cm-p1* se estrutura em um meio muito específico, apenas em SDS, entre os 4 meios testados, justificando a sua atividade, muito específica, apenas antifúngica.

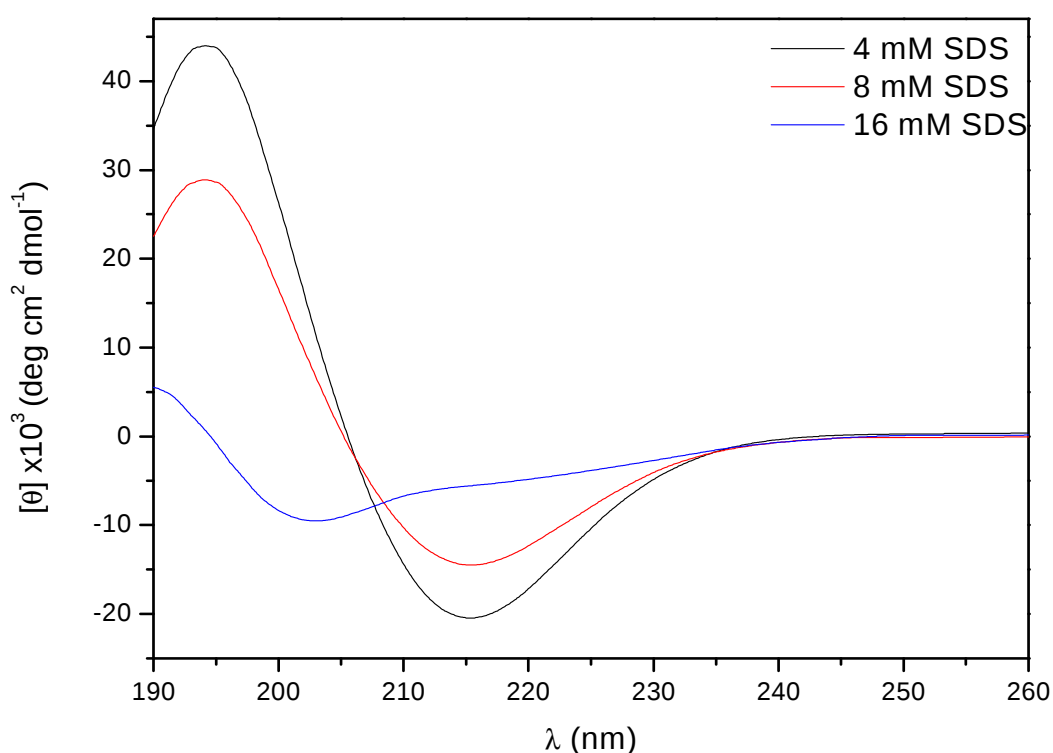


Figura 4.34 Espectros de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Peptídeo *Cm-p1* à 121 μM em 4, 8 e 16 mM de micelas de SDS, sem tampão, pH 4,3 e 25 °C.

Diante das observações dos resultados de DC, para o peptídeo *Cm-p1*, as amostras para os experimentos realizados no RMN, para a determinação estrutural, foram preparadas sem o uso de tampão na presença de 100 mM de micelas de SDS.

Vale salientar que, para a determinação estrutural por espectroscopia de RMN, é necessária a solubilização eficiente da amostra. A baixa solubilidade, oligomerização, agregação, isômeros conformacionais e impurezas da amostra podem acarretar em problemas que manifestam-se tipicamente por uma relação sinal/ruído baixa, rápida relaxação transversal e linhas largas ou múltiplos sinais. A boa solubilidade da amostra

necessária para estudos de RMN não é garantia de bons resultados, pois as características espectrais podem ser comprometidas, mesmo sem uma agregação aparente, aparecendo como sinais fracos ou linhas alargadas. Algumas condições podem ser variadas, para evitar o aumento no tempo de correlação rotacional, por exemplo: temperatura, pH e força iônica (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003; Kupče & Freeman, 2013).

Por isso, o peptídeo *Cm-p1* foi analisado em solução na presença de micelas de SDS-*d*₂₅ em diferentes temperaturas. Foram realizados experimentos de hidrogênio com variações de temperatura de 5 °C a 35 °C. A Figura 4.35 apresenta a região de deslocamento químico de hidrogênio de grupos amídicos e aromáticos.

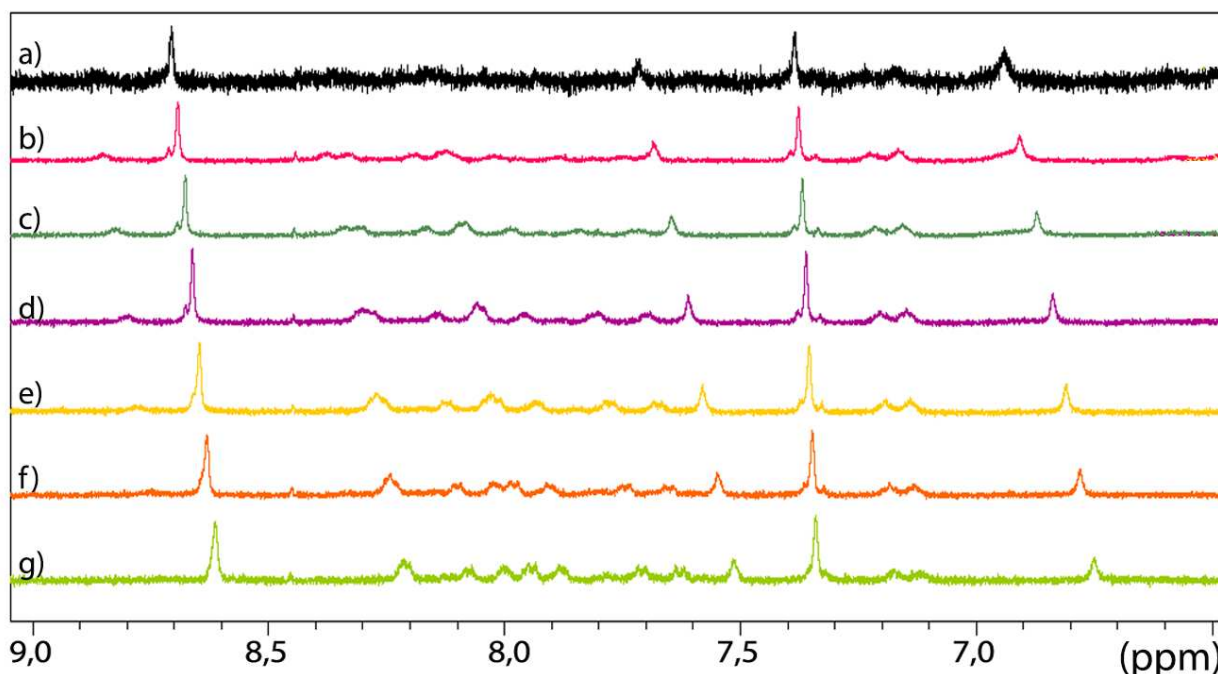


Figura 4.35 Espectros unidimensionais de ^1H . Ampliação da região de ^1H amídicos e hidrogênios aromáticos a diferentes temperaturas, para 1 mM do peptídeo *Cm-p1* na presença de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅ a) 5 °C b) 10 °C c) 15 °C d) 20 °C e) 25 °C f) 30 °C g) 35 °C.

Os sinais de ressonância do peptídeo na presença micelas apresentaram-se bastante alargados a 5 °C. Isto se deve ao fato de ter ocorrido a diminuição da solubilidade do peptídeo e do SDS, e consequente, agregação destes a baixa temperatura.

Uma melhor resolução dos sinais foi observada a partir de 15 °C, porém, a 30 °C e 35 °C, verificaram-se sinais alargados, que revelam um comportamento dinâmico, com equilíbrio entre outros conformeros em solução. Isto porque em solução as moléculas podem adotar uma série de conformações. Como as moléculas estão muitas vezes em troca rápida entre as conformações disponíveis, o deslocamento químico observado corresponde ao desvio da média ponderada de todas as conformações presentes. Esta inter conversão torna-se mais lenta a temperaturas menores e os sinais dos prótons ficam melhor resolvidos. Desta forma, para se evita em possíveis problemas de agregação a baixas temperaturas e a dinâmica da molécula a altas temperaturas, optou-se por realizar a determinação estrutural por RMN à temperatura de 25 °C.

A dispersão dos sinais observado nos experimentos de hidrogênio 1D para macromoléculas é um atributo importante das características estruturais de peptídeos e proteínas bem estruturadas. Neste caso são observados sinais mais dispersos (Yao, Dyson, & Wright, 1997). A dispersão de sinais na região de deslocamento químico de hidrogênios amídicos, alfa e metila é um bom indicativo de estruturação (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003). Para macromoléculas não estruturadas ou desdobradas os sinais de ressonância agrupam-se, possuindo valores semelhantes aos encontrados para estruturas randômicas.

A Figura 4.36 mostra os espectros de hidrogênio para o peptídeo *Cm-p1* em diferentes meios, a saber na presença de SDS- d_{25} , TFE- d_3 :H₂O e em água, respectivamente. Na presença de SDS- d_{25} os sinais de hidrogênios amídicos estão dispersos na faixa de 7,68 e 8,67 ppm. Em TFE- d_3 :H₂O estes sinais estão localizados na faixa de 7,79 e 8,87 ppm, muitos deles concentrados em torno de 8,3 ppm e em solução localizados na faixa de 8,16 e 8,78 ppm. O maior alargamento e dispersão dos sinais de ressonância do peptídeo em SDS (Figura 4.36.a) é um indicativo claro de estruturação neste meio, o que não ocorre em TFE (Figura 4.36.b) e em água (Figura 4.36.c). Estes dados corroboram com os dados de DC onde observou-se estruturação do peptídeo em SDS- d_{25} e randômico em TFE- d_3 :H₂O e em água.

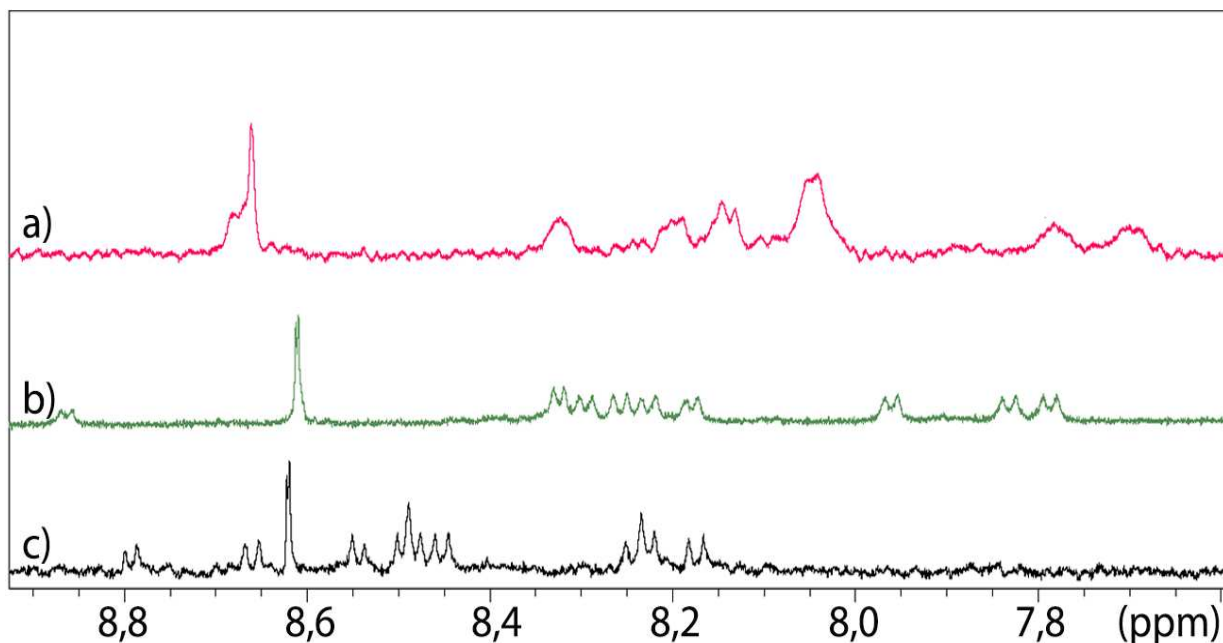


Figura 4.36 Espectros unidimensionais de ^1H . Ampliação da região de hidrogênios amídicos. 1 mM do peptídeo *Cm-p1* em diferentes meios a) na presença de SDS- d_{25} b) TFE- d_3 : H_2O c) água.

Como os dados de CD e RMN de ^1H mostraram que o peptídeo *Cm-p1* não apresentava estrutura em água, DPC e TFE, a determinação estrutural por RMN foi realizada com a utilização de micelas de SDS- d_{25} , como meio mimético, já que micelas de detergentes são utilizadas em investigações espectroscópicas como um modelo de membrana mimética experimental.

Os estudos da estrutura do peptídeo por RMN foram realizados com a concentração da amostra de 1 mM na presença de 100 mM de micelas de SDS. A escolha desta concentração é crítica para os experimentos de RMN. Para que ocorra a formação de 1 micela, são necessárias em torno de 60 moléculas de SDS (Jarvet, Zdunek, Damberg, & Gräslund, 1997). Para uma concentração de 100 mM de micelas de SDS a concentração da micela é acima de 1,6 mM. Para uma solução com concentração de peptídeo menor que 1,6 mM, provavelmente não será encontrado mais que 1 peptídeo para cada micela de SDS.

As atribuições sequenciais foram obtidas com o auxílio dos experimentos de TOCSY e NOESY (Wüthrich, 1986). O mapa de contornos de TOCSY (Figura 4.37), mostra a atribuição da região de impressão digital H_N - H_α e cadeias laterais.

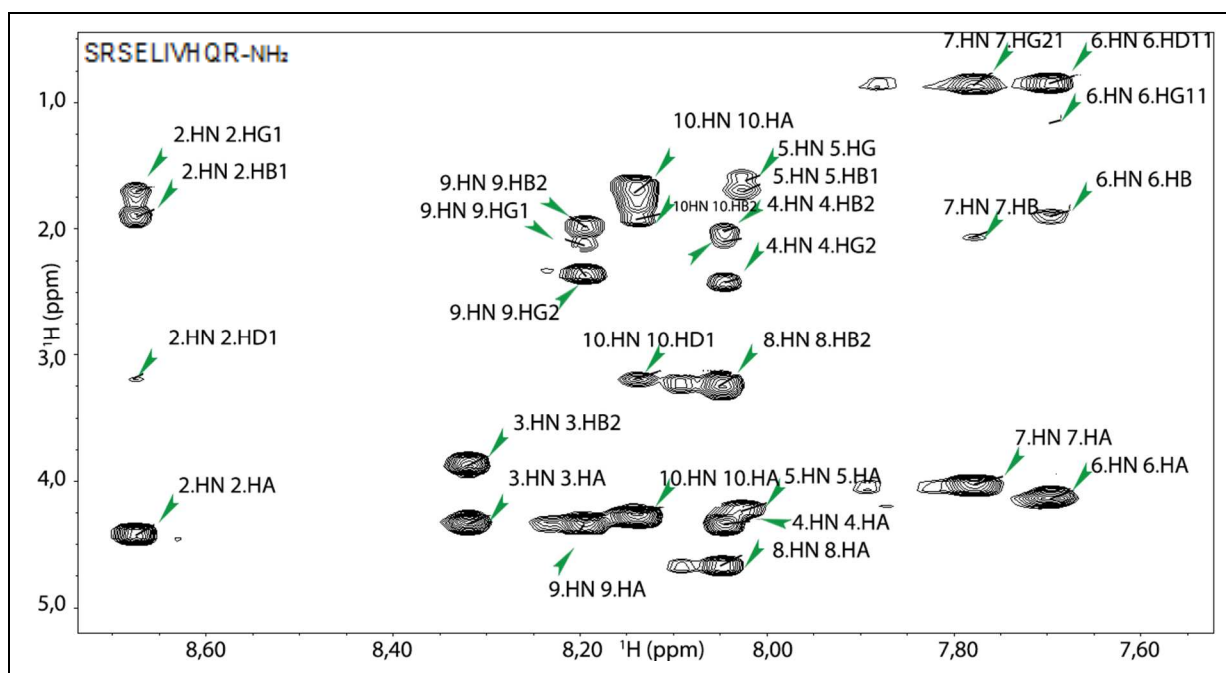


Figura 4.37. Expansão do mapa de contornos TOCSY, região de impressão digital e cadeias laterais, 1 mM do peptídeo *Cm-p1* em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

Para a determinação da estrutura do peptídeo *Cm-p1* em solução micelar foi utilizado no experimento de NOESY um tempo de mistura de 250 ms, melhor tempo de mistura encontrado pela variação desse parâmetro. As restrições conformacionais, entre os resíduos de aminoácidos do peptídeo *Cm-p1*, foram observadas no experimento de NOESY. Os volumes dos picos foram integrados sobre a área do sinal e convertidos em restrições distância utilizando o programa NMRView.

O experimento homonuclear NOESY ^1H - ^1H forneceu informações de acoplamento dipolar de hidrogênios próximos espacialmente. A Figura 4.38 apresenta as correlações H_N - H_α entre os resíduos de aminoácidos, sendo observadas apenas correlações entre resíduos próximos na cadeia linear.

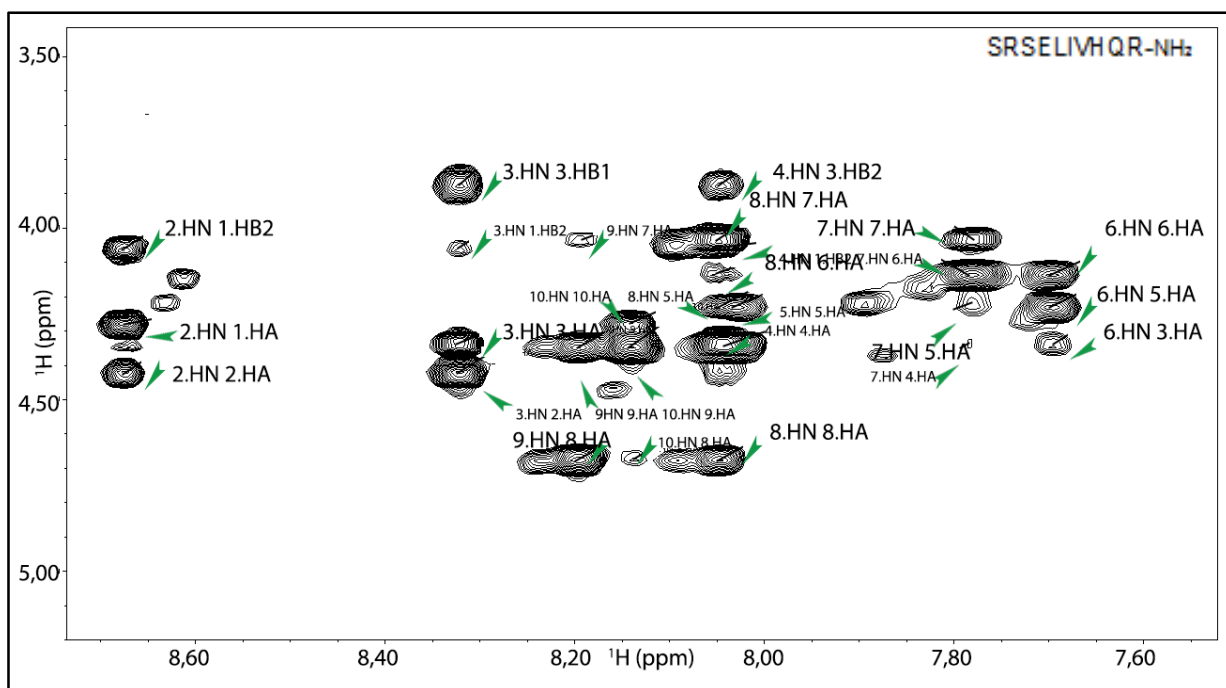


Figura 4.38 Expansão do mapa de contornos parcial NOESY, região de interação H_N e H_α , 1 mM do peptídeo *Cm-p1* em solução de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

A Figura 4.39 apresenta o mapa de contornos parcial para o experimento de NOESY, apenas para a região H_N - H_N . Foram observadas correlações do tipo d_{NN} ($i, i+1$), com exceção para aqueles resíduos que apresentaram deslocamentos químicos de hidrogênios amídicos muito próximos. Essa região foi muito útil na confirmação das conectividades entre os resíduos de aminoácidos.

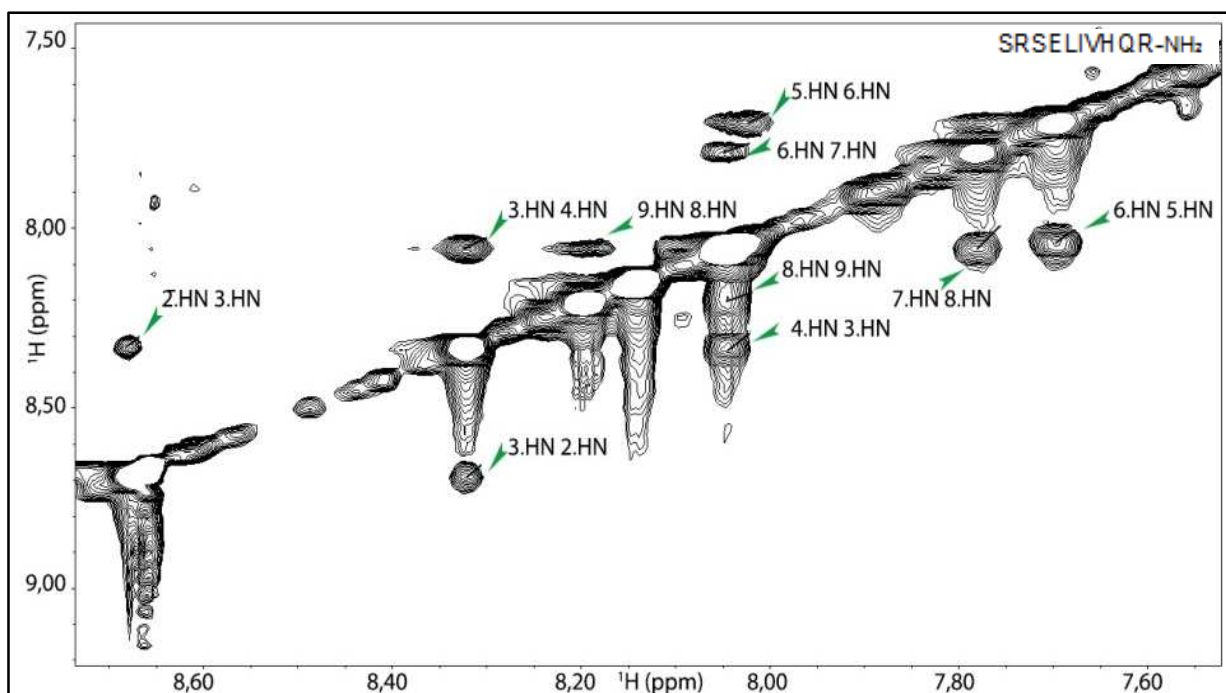


Figura 4.39. Expansão do mapa de contornos NOESY, região de interação H_N-H_N , 1 mM do peptídeo *Cm-p1* em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

O mapa de contornos 1H - ^{13}C HSQC editado (Figura 4.40) mostra a região de correlações $H_\alpha-C_\alpha$ para todos os resíduos de aminoácidos, exceto para o resíduo His-8, que não foi observado, uma vez que está sobreposto ao sinal de ressonância da água. Os sinais correspondentes às correlações referentes aos acoplamentos CH e CH_3 (fase positiva) estão em preto e CH_2 em vermelho (fase negativa). Também se determinam os deslocamentos químicos dos núcleos de nitrogênio (^{15}N), pela atribuição do mapa de contornos 1H - ^{15}N sofast-HMQC (Figura 4.41).

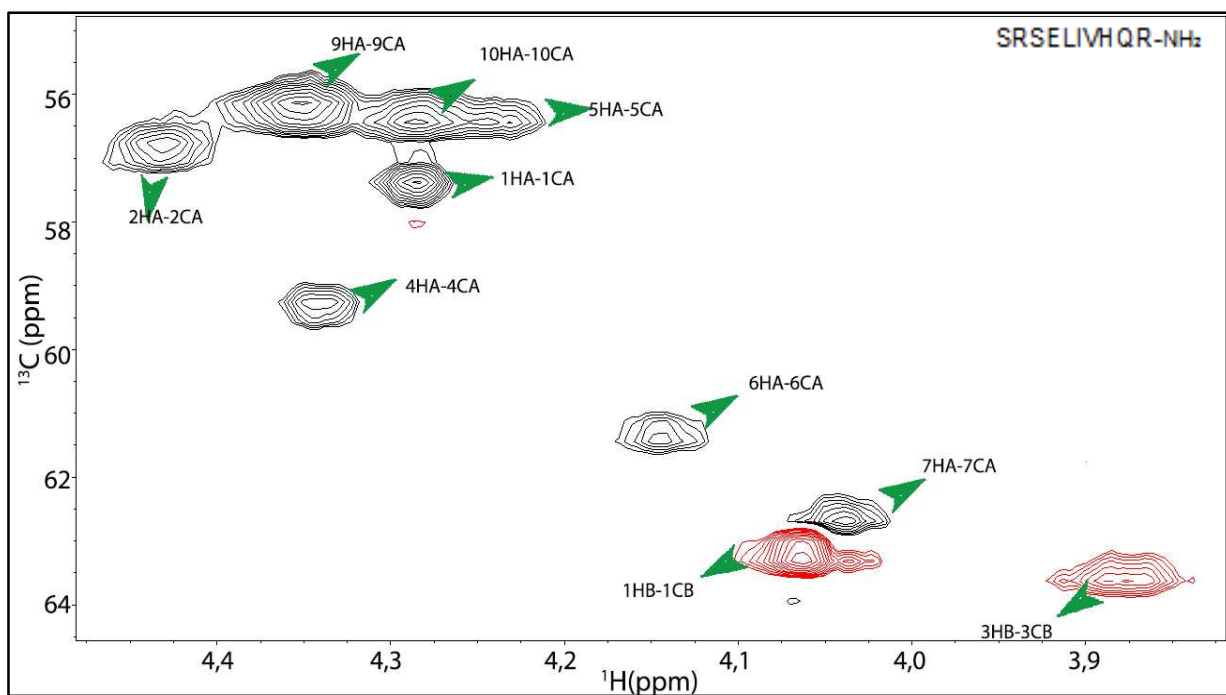


Figura 4.40. Expansão do mapa de contornos HSQC ^1H - ^{13}C do peptídeo *Cm*-p1 a 1 mM em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

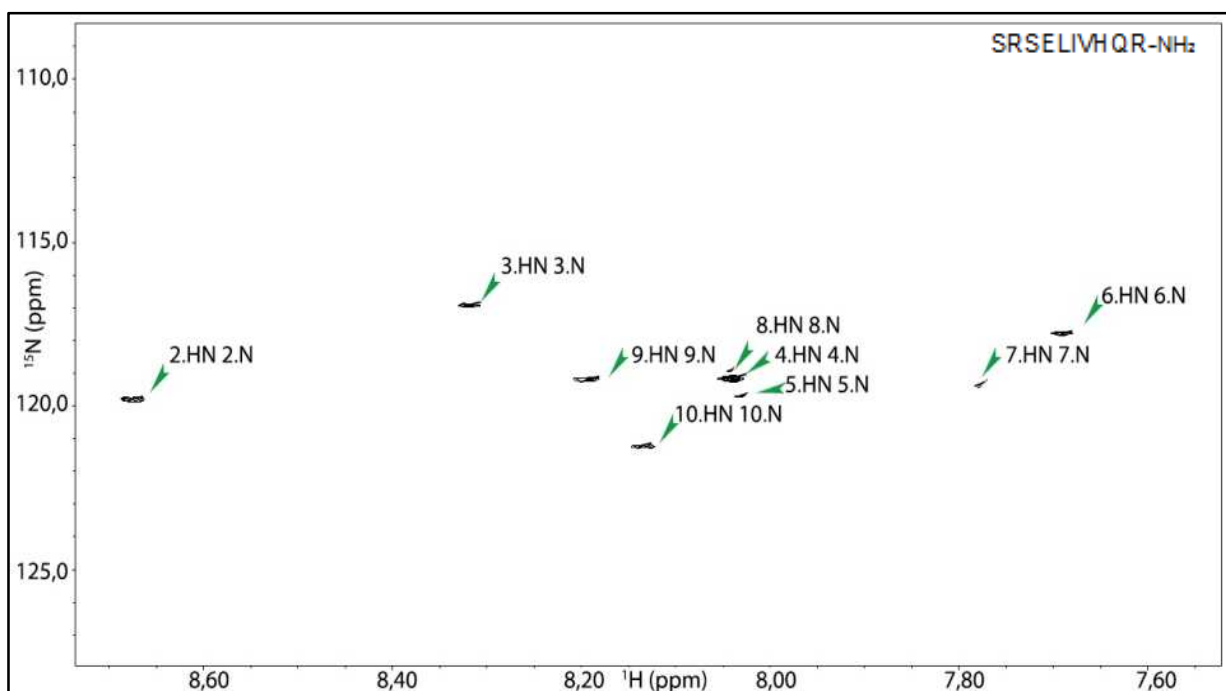


Figura 4.41. Expansão do mapa de contornos HMQC ^1H - ^{15}N do peptídeo *Cm*-p1 a 1 mM em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

O método de predição da estrutura secundária proposto por Wishart et al. (D. S. Wishart et al., 1992) foi empregado, para se ter acesso à informação estrutural do peptídeo *Cm*-p1. A diferença de valores de deslocamentos químicos para as

ressonâncias dos hidrogênios H_α experimentais menos os H_α teóricos de uma estrutura randômica forneceram informações a respeito da estrutura secundária para o peptídeo, uma vez que esses são influenciados pela geometria local da molécula.

A Figura 4.42 mostra o gráfico de CSI para o peptídeo *Cm-p1*. O CSI referente aos deslocamentos químicos de H_α (rosa) e C_α (azul). A presença de no mínimo quatro índices negativos consecutivos, sem interrupção de um índice positivo ou de dois 0 para os valores de $\Delta\delta$ do H_α indicaram a presença de uma estrutura secundária em α -hélice entre os resíduos Ser-3 a Arg-10 (David S. Wishart & Nip, 1998).

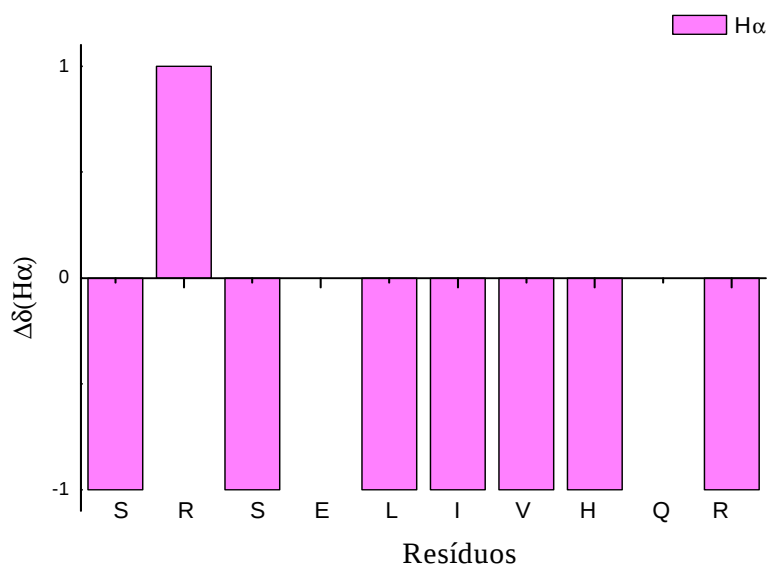


Figura 4.42. Gráfico de CSI: diferença entre os deslocamentos químicos dos H_α observados e os valores padrões não estruturados obtidos da literatura.

O CSI calculado pelo programa NMRView (Figura 4.43) pela metodologia de Wishart para peptídeos considerou o pH e a temperatura em que os experimentos foram realizados. Esse método indicou uma estruturação provável de 50% dos resíduos em hélice. Nessa estimativa foram utilizados os deslocamentos químicos de H_N , C_β e N . Os agrupamento denso de quatro ou mais barras vermelhas é característico de hélice. Dessa forma os CSI dos deslocamentos químicos indicaram estruturação em hélice do resíduo Ser-3 ao de Val-7 (David S. Wishart & Nip, 1998).

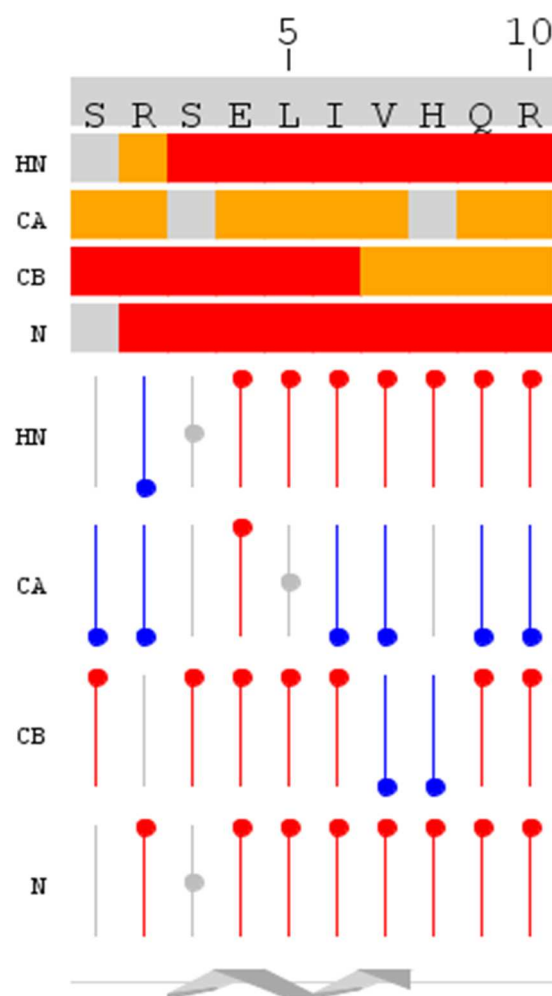


Figura 4.43 Gráfico de CSI, diferença entre os deslocamentos químicos experimentais e os valores padrões não estruturados pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α -hélice. As caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou iguais a zero

Um conjunto de 167 restrições de distância foi utilizado nos cálculos estruturais do peptídeo Cm-p1 (Tabela 4.6), resultando em uma média final de 16,7 restrições por resíduo. Essa medida é um indicador da qualidade do conjunto de restrições experimentais. Foram observadas poucas restrições apenas para o primeiro resíduo, provavelmente porque seu hidrogênio amídico é mais lábil, por estar na extremidade da cadeia peptídica, e seu contato com o solvente é maior, sendo rapidamente trocado com o hidrogênio do solvente.

Na lista de restrições utilizadas no cálculo estrutural não consta nenhuma restrição de media a de longa distância. Porém, foram observadas restrições únicas, referentes à atribuições apenas de um lado da diagonal, para as correlações $5H_{\beta}-2H_{\alpha}$,

$6H_{\beta}-3H_{\alpha}$, $6H_N-3H_{\alpha}$ e $7H_N-4H_{\alpha}$. Essas restrições foram removidas dos cálculos estruturais por apresentarem alta unicidade e forte impacto sobre a estrutura.

Tabela 4.6 Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo *Cm-p1*.

Restrições utilizadas	
Total de restrições de distância	167
Intra residuais	117
Sequenciais	34
Média distância ($1< i-j <5$)	0
Restrições de ângulos diedros	16

Algumas restrições utilizadas podem ser visualizadas no painel de NOE (Figura 4.44). As atribuições inter residuais do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, observadas apenas de um lado da diagonal, estão destacadas em cinza e não foram utilizadas nos cálculos estruturais. O aspecto do painel de NOEs, os dados de CSI e informação média indicam pequena estruturação do peptídeo na presença de micelas.

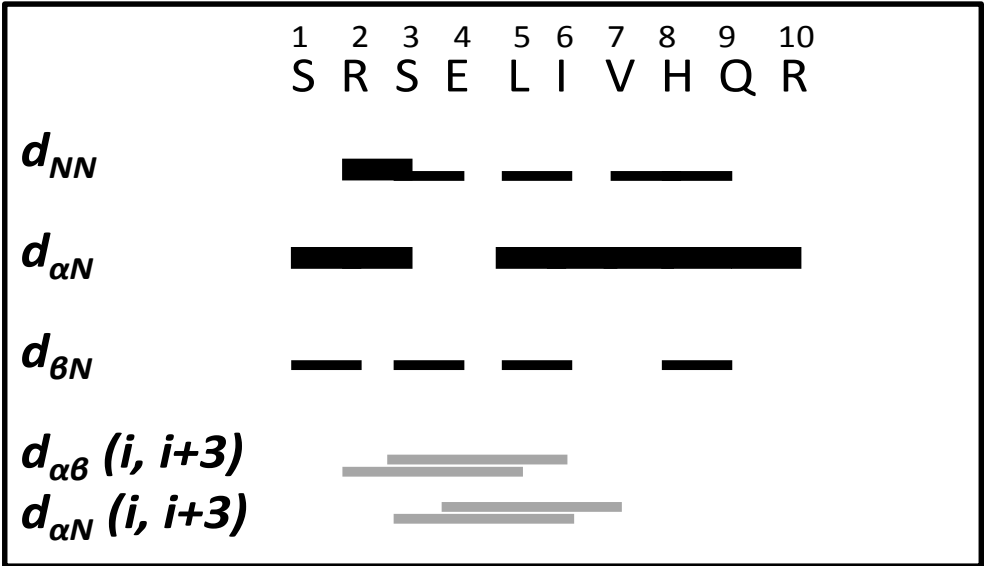


Figura 4.44. Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo *Cm-p1* a 1 mM em solução micelar de micelas de SDS-*d*₂₅. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama. As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, média e forte.

As restrições utilizadas nos cálculos estruturais foram analisadas pelo programa QUEEN (Nabuurs et al., 2003), a fim de se determinar o conteúdo das informações referentes às restrições utilizadas. Através dele foi possível calcular uma medida para a informação contida numa única restrição de distância, dado todos os outros sistemas de restrição. Através dele foi possível obter dados sobre a contribuição de cada restrição em relação ao conjunto de dados total (Nabuurs et al., 2003).

As atribuições que apresentavam alta unicidade e alta informação média foram removidas dos cálculos estruturais, a fim de eliminar possíveis erros de atribuição. A Figura 4.45 mostra o gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição para o peptídeo *Cm-p1*. As restrições utilizadas para o cálculo final das estruturas apresentaram baixa unicidade (I_{uni}). Esse dado confirma a confiabilidade das restrições utilizadas.

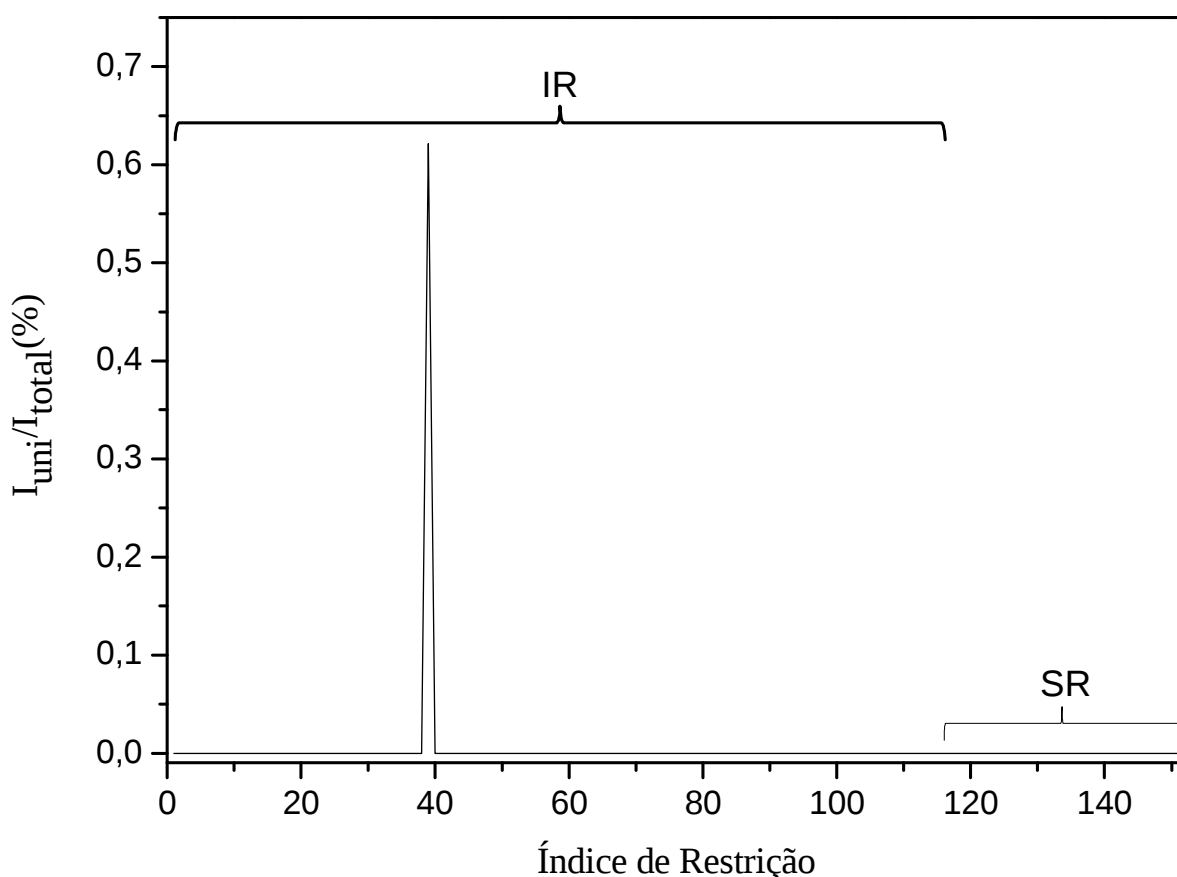


Figura 4.45. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição para o peptídeo *Cm-p1* a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C. A classificação no gráfico indica m restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).

O gráfico (Figura 4.46) de I_{uni} versus I_{med} mostra que as restrições apresentam baixos valores de unicidade ($I_{uni} < 1$) e informação média ($I_{med} < 2$). O primeiro devido as restrições serem atribuídas dos dois lados da diagonal, indicando a alta confiabilidade das restrições utilizadas e o segundo devido às restrições utilizadas não apresentarem forte impacto sobre a estrutura, principalmente pelo fato das restrições serem compostas apenas por restrições intra residuais (IR) e sequenciais (SR), que contêm poucas informações estruturais, indicando a pouca estruturação do peptídeo.

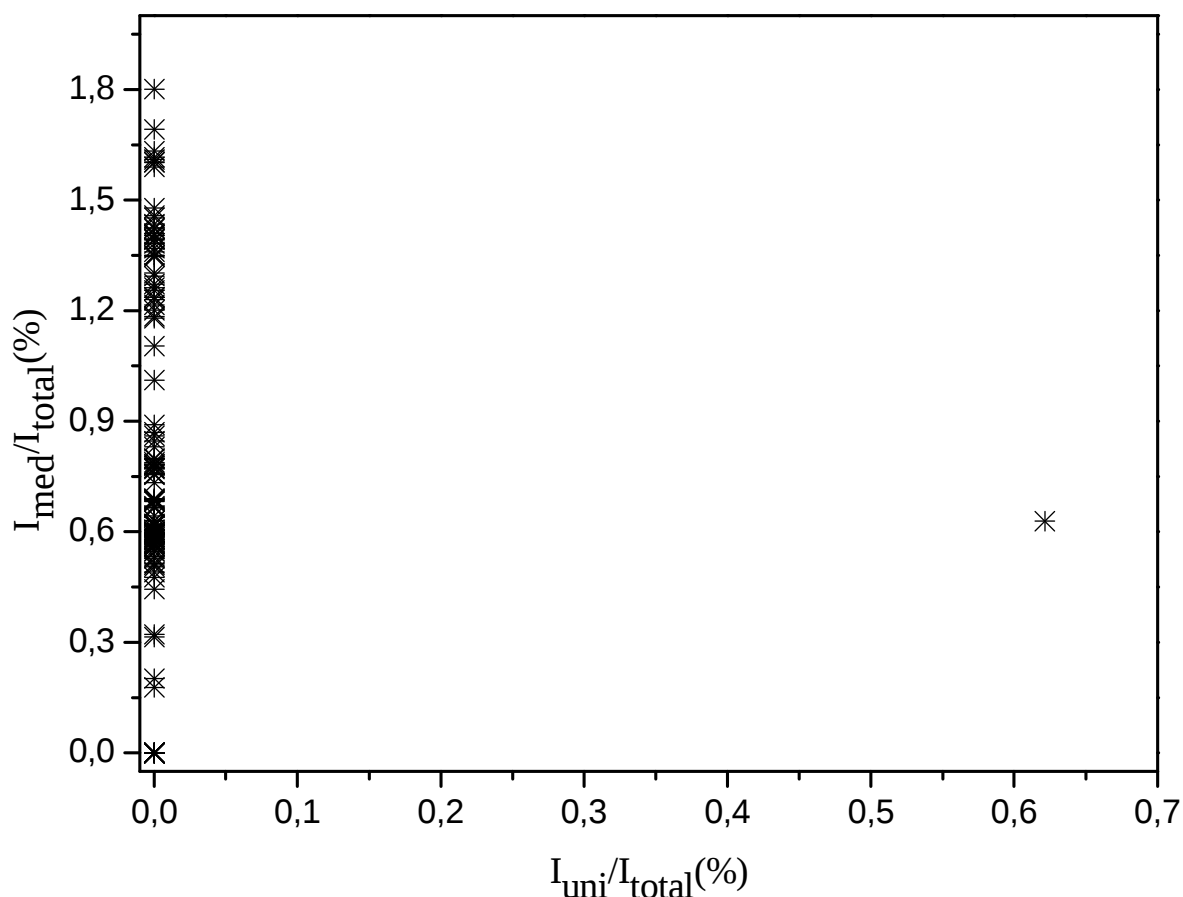


Figura 4.46. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_{med}) versus informação única (I_{uni}) para o peptídeo *Cm-p1* a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

As informações de deslocamentos químicos foram inseridas em uma tabela (Anexo 5) e, a partir delas, foram preditos os ângulos diedros, gerados pelo programa TALOS+. As predições de ângulos ϕ e ψ para todos os resíduos foram classificadas

como boas e indicaram uma estruturação em α -hélice próximo ao *N*-terminal e conformação β próximo ao C-terminal.

Para cada resíduo de aminoácido foi gerado um diagrama de Ramachandran (Anexo 6), com as dispersões dos ângulos ϕ e ψ dos dez resultados mais próximos. As previsões se localizaram na região de α -hélice do diagrama de Ramachandran para os resíduos: Arg-2, Ser-3, Glu-4, Leu-5 Ile-6 e na região de conformação β para os resíduos Val-7 His-8 Gln-9.

Constata-se, pela Figura 4.47.a, que o programa TALOS+ previu a estrutura secundária do peptídeo com boa exatidão, consistente com o banco de dados de polipeptídeos homólogos, que possuem ângulos de torção e deslocamentos químicos conhecidos (Shen et al., 2009), como indicado pela cor verde para todos os resíduos de aminoácidos. Não foram observados resíduos dinâmicos (cor azul) e ambíguos (cor amarela). Também não houve resíduos inconsistentes, como observado pela ausência da cor vermelha.

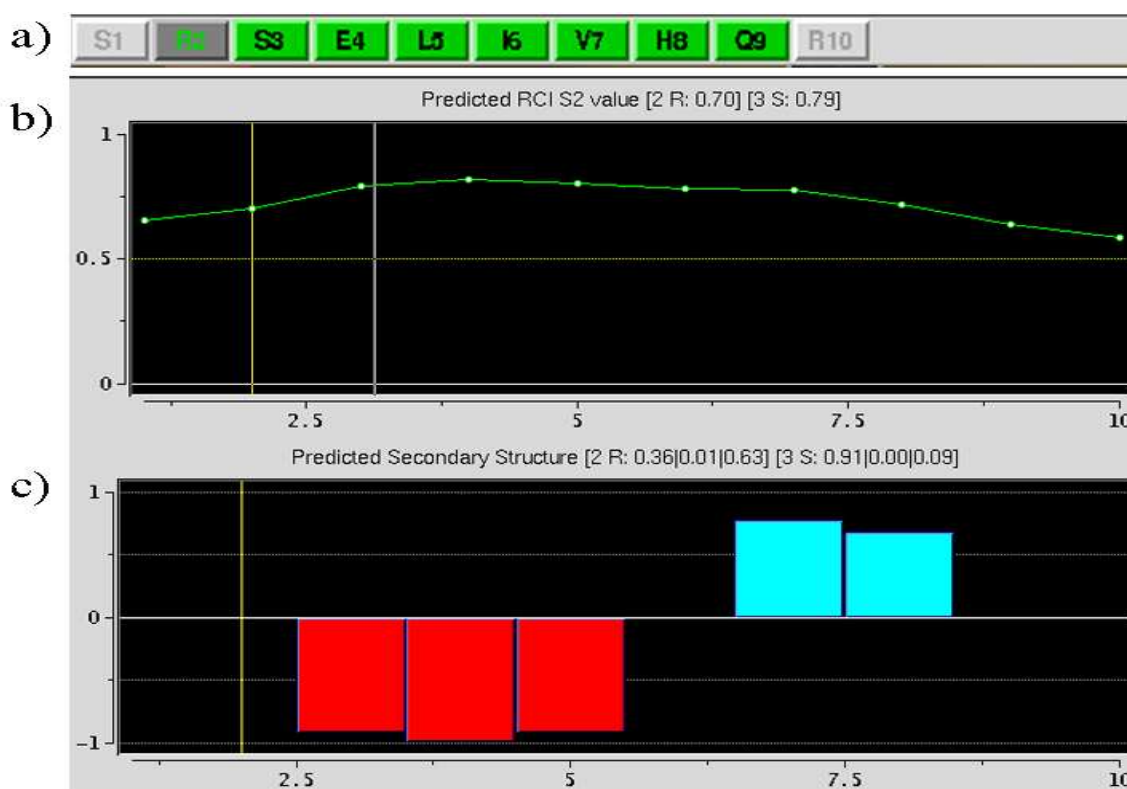


Figura 4.47 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo Cm-p1 com predição da exatidão, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes e em amarelo previsão ambígua b) Índice de desvio do parâmetro de ordem RCI-S² em função da posição dos resíduos na sequência primária c) Previsão da estrutura secundária.

O diagrama de Ramachandran para as previsões ϕ e ψ para cada resíduo de aminoácido (Anexo 6) concordou com estrutura secundária predita no programa TALOS+, apontando uma estruturação provável e uma estimativa confiável da probabilidade de ocorrência dos valores apropriados, confirmando os resultados esperados pelas previsões do CSI.

Os valores do índice de desvio do parâmetro de ordem (Figura 4.47.b) $RCI-S^2 > 0,5$, conforme classificado por Shen e colaboradores (Shen et al., 2009), indicam a ausência de resíduos dinâmicos, concordando com a ausência de previsões em azul na Figura 4.47.a. Por fim as barras na Figura 4.47.c refletem a probabilidade atribuída pela previsão de uma estruturação em α -hélice do resíduo Ser-3 ao de Leu-5, como indicado pelas barras vermelhas em -1, e conformação β do Val-7 ao His-8, como indicado pelas barras azuis em +1.

As vinte estruturas de menor energia (de um total de 200 estruturas calculadas) foram refinadas em água e as dez estruturas de menor energia foram escolhidas para representarem a família de estruturas do peptídeo *Cm-p1*. A Figura 4.48 apresenta a estrutura de menor energia sem refinamento (esquerda) e com refinamento em água (direita).

A estrutura de menor energia do peptídeo sem refinar em água e refinado em água, apresentam-se estruturados do resíduo Arg-2 ao Ile-6. Comparando as duas estruturas (Figura 4.48 a e b) não é possível observar nenhuma variação significativa entre elas.

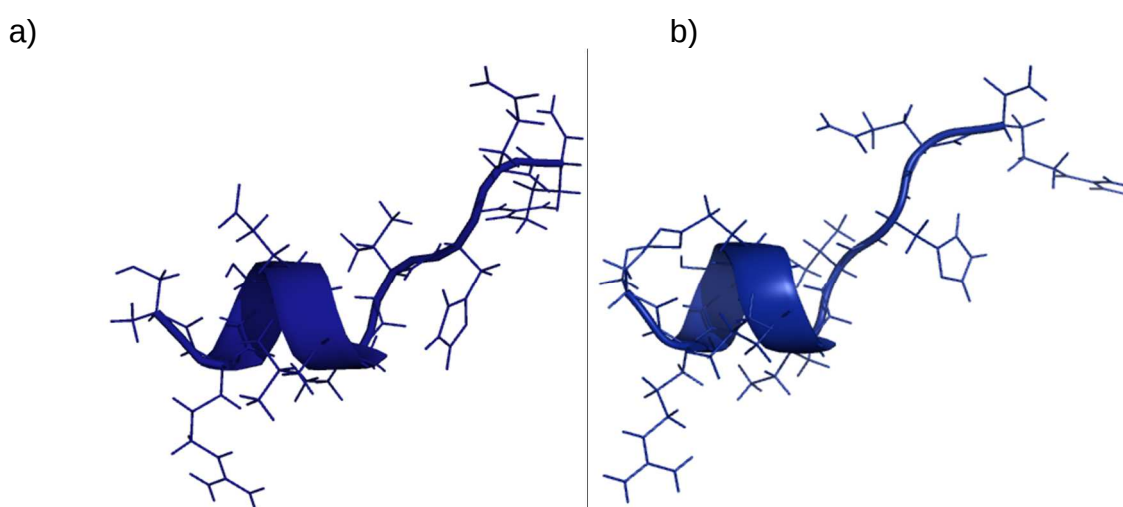


Figura 4.48 Estrutura de menor energia para o peptídeo *Cm-p1* a) sem refinamento em água b) com refinamento em água.

O padrão dos CSI já estimava que a região C-terminal apresentava uma região randômica, isso provavelmente devido a polaridade dessa região, que desfavorece sua interação com a micela proporcionando uma região randômica. Observa-se que o esqueleto peptídico está enrolado com o sentido para a direita com suas cadeias laterais projetadas para fora da região helicoidal, sendo o passo da hélice constituído por cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos.

Destaca-se que, na presença de micelas de SDS- d_{25} , o peptídeo *Cm-p1* apresentou-se estruturado em hélice, abrangendo a região entre os resíduos de Arg-2 à Ille-6. Observando a estruturação do peptídeo *Cm-p1*, na Figura 4.49, verifica-se que as restrições: $5H_{\beta}$ - $2H_{\alpha}$, $6H_{\beta}$ - $3H_{\alpha}$, $6H_N$ - $3H_{\alpha}$ e $7H_N$ - $4H_{\alpha}$, removidas dos cálculos, devido à alta unicidade e informação média, realmente correspondiam a sinais, pois é observado uma estruturação em α -hélice nesta região.

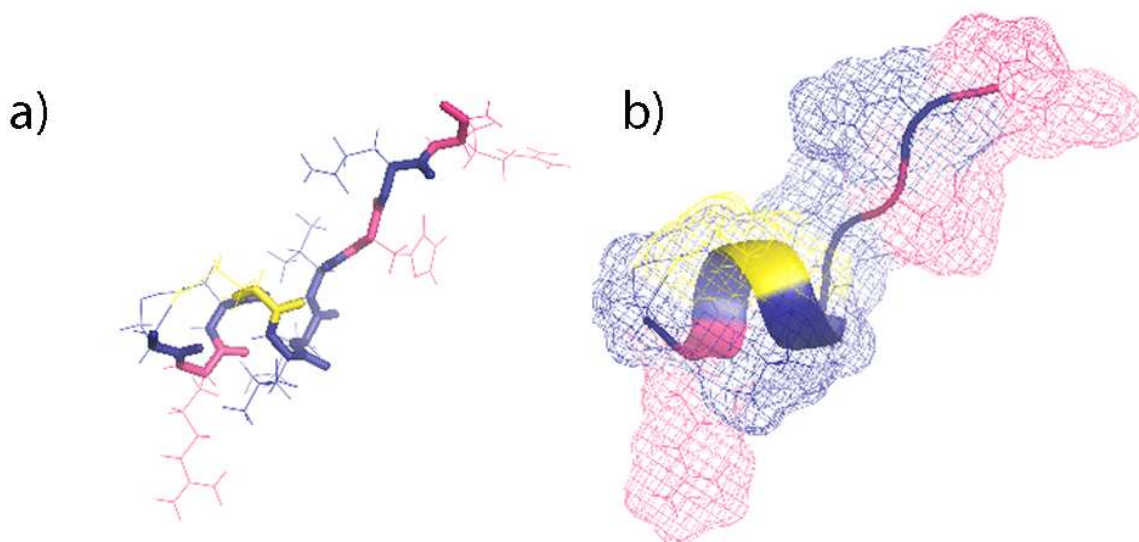


Figura 4.49. Estrutura de menor energia para o peptídeo *Cm-p1* em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} e pH 4,3. A) Estrutura de menor energia com os resíduos catiônicos estacados em rosa e aniônico em amarelo B) Visualização em superfícies.

As coordenadas moleculares para o peptídeo *Cm-p1* foram descritas usando o desvio de coordenadas RMSD. Esse parâmetro foi utilizado como uma medida da qualidade na determinação da estrutura. O RMSD foi calculado através do programa MOLMOL (Koradi et al., 1996), tendo sido os dez confórmeros de menor energia foram sobrepostos (Figura 4.50) e obtidos os valores de RMSD (desvio médio quadrático) obtidos pelo alinhamento dos átomos da estrutura de menor energia e as demais estruturas (Tabela 4.7).

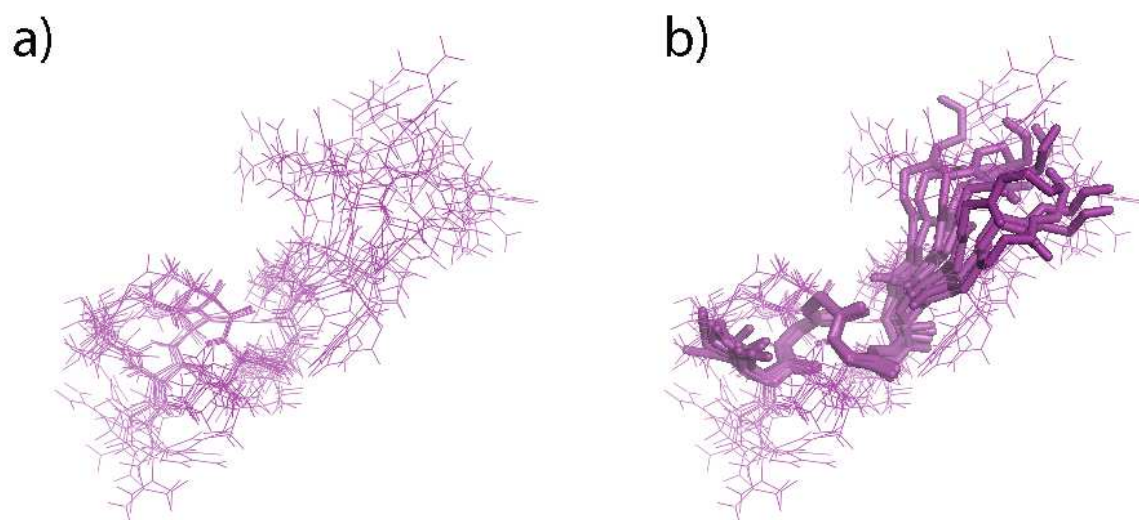


Figura 4.50. Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo *Cm-p1* em solução micelar de SDS- d_{25} A) Sobreposição das estruturas mais estáveis B) Com a cadeia principal em destaque.

O alinhamento apenas da região estruturada em hélice apresentou um baixo valor de RMSD ($0,28 \pm 0,10$ Å), que é coerente com o pequeno segmento de sobreposição selecionado. O valor de RMSD equivalente à $0,97 \pm 0,28$ Å, obtido pelo alinhamento de todos os átomos, evidenciou que as estruturas exibem uma boa geometria, indicando uma alta flexibilidade conformacional, principalmente devido a região C-terminal estar randômica. Tal valor reflete a dinâmica interna da molécula e as incertezas que derivam das conversões experimentais dos dados e processos computacionais. Desta forma, a existência de conformações convergentes mostrou a consistência e compatibilidade das restrições utilizadas no cálculo estrutural.

Tabela 4.7. Estatística das vinte estruturas de menor energia, quanto à geometria das estruturas obtidas.

RMSD – Todos os resíduos ^a	Å
Cadeia principal	$0,97 \pm 0,28$
Cadeia principal e átomos pesados	$2,47 \pm 0,56$
RMSD – Segmento helicoidal ^b	
Cadeia principal	$0,28 \pm 0,10$
Cadeia principal e átomos pesados	$1,46 \pm 0,38$

a-Dados obtidos através do programa MOLMOL; b-Resíduo 2 ao 6

Peptídeos catiônicos anfifílicos encontrados na natureza têm atividade de amplo espectro contra vários microrganismos. Tais peptídeos adotam uma estruturação específica, após interagirem com membranas ou meios semelhantes (R. E. W. Hancock & Rozek, 2002). Outra característica comum dos PAMs, em meio mimético, é a aglomeração dos resíduos hidrofóbicos e catiônicos em faces opostas da estrutura α -hélice, caracterizando assim a molécula anfipática. Essas características estruturais devem ser avaliadas, para que se tenha evidências a respeito da forma de interação peptídeo-membrana.

Constata-se que a estrutura do peptídeo *Cm-p1* é constituída por três resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg-2, His-8 e Arg-10) e um resíduo de aminoácido com carga negativa Glu-4. A estrutura refinada em água de menor energia está apresentada na Figura 4.49, com os resíduos de aminoácidos catiônicos destacados em rosa e aniônico em amarelo. As regiões carregadas positivamente do peptídeo ligam-se normalmente aos grupos cabeça com carga negativa das membranas bacterianas (VanCompernelle et al., 2005), ou meio mimético. No entanto, o peptídeo *Cm-p1* (Figura 4.52.A) mostrou-se com baixo caráter anfipático. Os resíduos hidrofóbicos, Leu-5, Ile-6, Val-7, destacados em azul evidenciam a baixa anfipaticidade do peptídeo pelo fato deste não apresentar faces hidrofílicas e hidrofóbicas bem definidas, como já esperado pela predição da projeção em hélice (Figura 4.51). Apenas 30% dos resíduos de aminoácidos são hidrofóbicos http://aps.unmc.edu/AP/database/query_output.php?ID=02305 (acessado 12/02/2015).

A Figura 4.51 mostra a projeção em hélice de Schiffer & Edmundson (Schiffer & Edmundson, 1967), predita para o peptídeo *Cm-p1* (<http://r2lab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>), sendo a hidrofobicidade destacada por cores. A pouca quantidade de resíduos verdes indica a baixa hidrofobicidade deste peptídeo. Observa-se nesta projeção, pela disposição dos resíduos de aminoácidos, que o peptídeo não apresenta tendência em formar uma α -hélice anfipática. Peptídeos com atividade antifúngica tendem a ser relativamente ricos em resíduos de aminoácidos polares e neutros, o que sugere uma relação única entre estrutura e atividade (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006b). Observa-se a falta da tendência de anfipaticidade para o peptídeo *Cm-p1*, não é possível a separação dos resíduos em faces hidrofílicas e hidrofóbicas, como ilustra a figura abaixo.

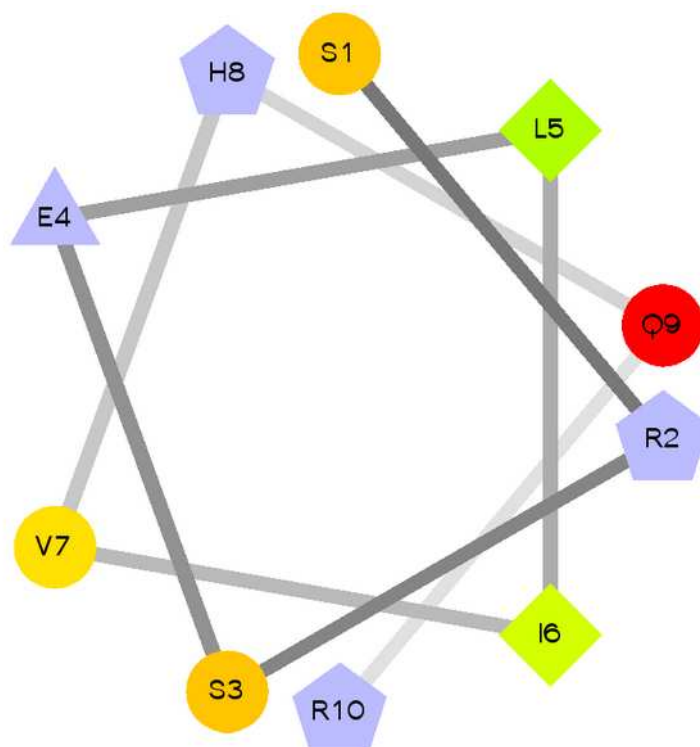


Figura 4.51 Projeção helicoidal para o peptídeo Cm-p1. Estão apresentados os resíduos catiônicos como pentágonos. O único resíduo aniônico está em triângulo. A Hidrofobicidade é codificada por cores, assim os resíduos mais hidrofóbicos apresentam-se em verde, com hidrofobicidade zero em amarelo, e aqueles mais hidrofílicos em vermelho

Os resíduos catiônicos, juntamente com os resíduos hidrofílicos, podem ser a explicação para uma interação não seletiva na membrana biológica, principalmente devido a porção *N*-terminal e *C*-terminal serem constituídas por três resíduos hidrofílicos cada, os quais não favorecem uma estrutura anfipática. Esta característica pode explicar a sua baixa atividade hemolítica e também o fato deste peptídeo sintético apresentar um amplo espectro apenas antifúngico. Sendo sua atividade bem específica apenas contra fungos filamentosos e leveduras.

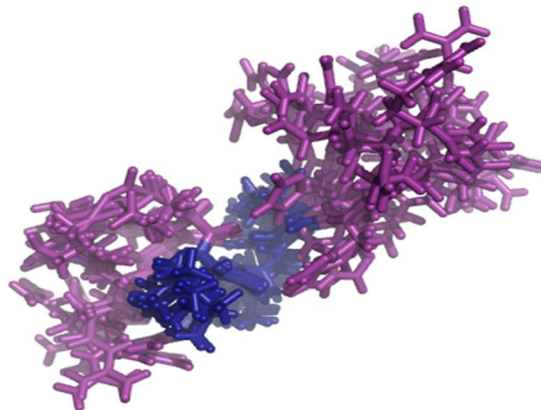
Vale ressaltar que a composição química da parede celular fúngica é bastante complexa, sendo constituída de um modo geral por polissacarídeos, β glucanas, quitina, e algumas proteínas (Debono & Gordee, 1994). Portanto, apesar do estudo estrutural realizado por RMN não ter sido realizado utilizando interações miméticas a fungo, tal estudo foi realizado para um melhor entendimento da interação do peptídeo com outros meios.

A)

vista frontal



B)



C)

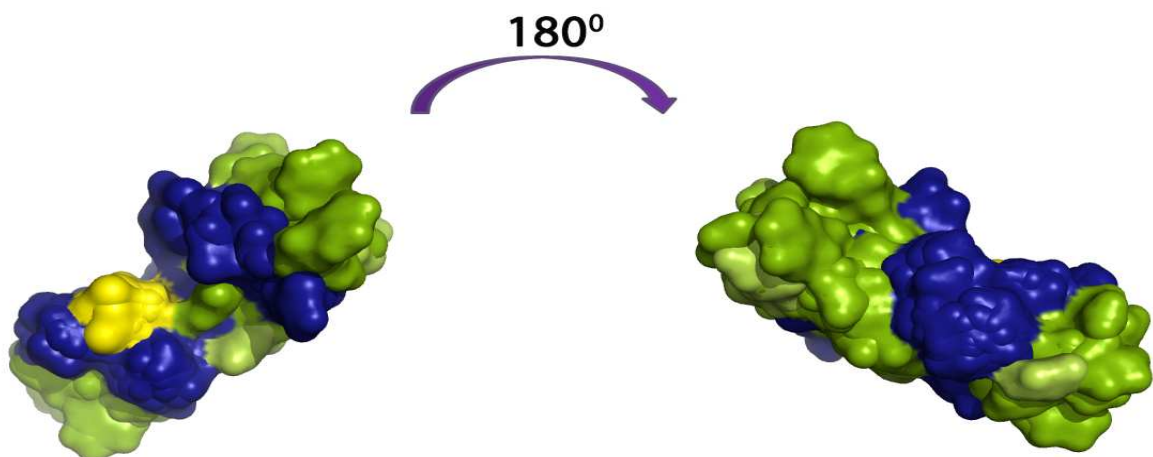


Figura 4.52. Conjunto das dez estruturas de menor energia para o peptídeo *Cm-p1* em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅. A) Vista frontal *N*-terminal (esquerda) e *C*-terminal (direita), em azul resíduos hidrofóbicos e polares em rosa B) Sobreposição das dez estruturas mais estáveis, com resíduos polares em rosa e hidrofóbicos em azul C) Estrutura de menor energia com vista em Superfícies, sendo os resíduos catiônicos destacados em verde e aniônico em amarelo.

Na Figura 4.53 é apresentada a estrutura de menor energia, estando os resíduos de aminoácidos destacados, conforme suas características hidrofóbicas, catiônicas e aniônicas, bem como suas posições na cadeia. Os estudos de dicroísmo circular em solução indicaram que o peptídeo *Cm-p1* não possui conformação preferencial em solução aquosa, presença de DPC e TFE:H₂O, mas adota conformação em α -hélice na presença de micelas de SDS, na ausência de tampão. As estruturas obtidas por RMN são parcialmente estruturadas em α -hélice, como pode ser observado na figura abaixo.

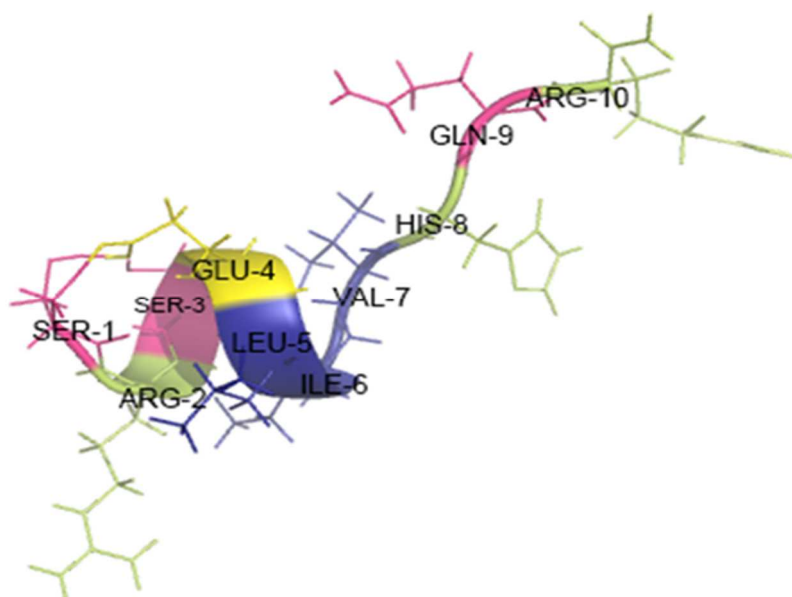


Figura 4.53 Estrutura de menor energia do peptídeo *Cm-p1* em SDS-*d*₂₅, pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa, catiônicos em verde e aniônico em amarelo.

Analisando o diagrama de Ramachandram para as estruturas apresentadas, confirma-se a boa qualidade das dez estruturas obtidas para o peptídeo *Cm-p1*. Nota-se que 100% dos resíduos de aminoácidos estão localizados na região de ângulos diedros ϕ e ψ mais favoráveis. Além disso, a boa qualidade dos modelos de RMN é observada, devido todos os resíduos de aminoácidos estarem na região negativa de ϕ e ψ característica de α -hélice e na região negativa de ϕ e positiva de ψ característica conformação β , mais favorecida como mostra a Figura 4.54.

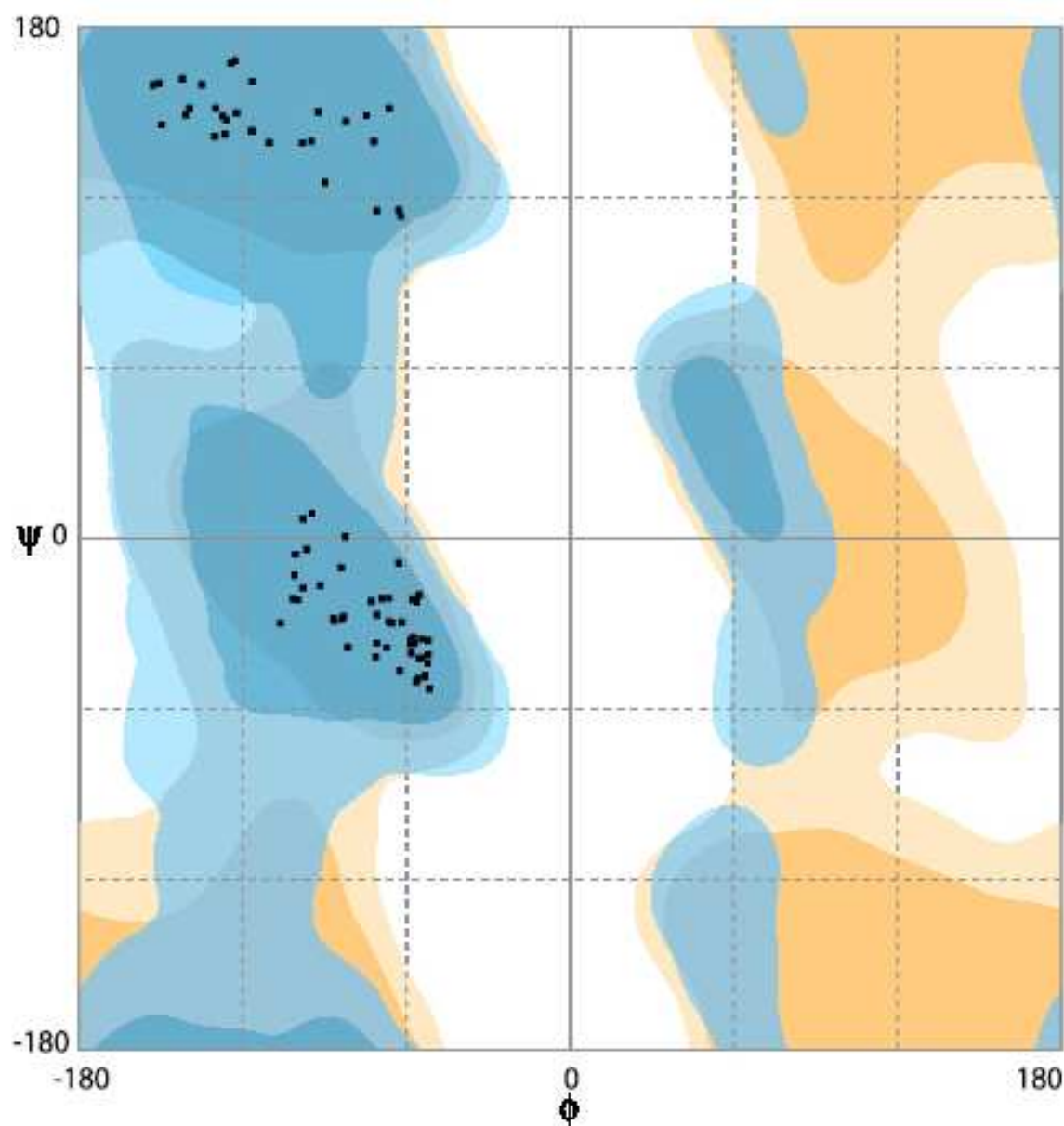


Figura 4.54. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do *Ramachandran Plot* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Uma melhor avaliação dos modelos obtidos foi realizada utilizando o aplicativo WHAT IF, com o qual foi possível analisar os indicadores de qualidade de geometrias locais das estruturas obtidas. Na Tabela 4.8, são apresentados valores de validação utilizando o programa WHAT IF (Vriend, 1990). A tabela apresenta, na segunda coluna indicadores para as estruturas não refinadas em água e, na terceira coluna, indicadores

para as estruturas refinadas em água. Os parâmetros estatísticos Z-scores e RMS Z-scores foram indicadores de aceitabilidade das propriedades calculadas (<http://www.cmbi.ru.nl/whatif/checkhelp>). A partir desses valores, foi possível inferir diretamente a respeito das propriedades geométricas do modelo obtido.

Tabela 4.8 Indicadores da qualidade estrutural para o peptídeo Cm-p1.

Z-scores	Sem refinamento	Refinadas em água
	em água	
1º geração qualidade de empacotamento	-0.978 +/- 2.815	-2.266 +/- 1.951
2º geração qualidade de empacotamento	-1.857 +/- 2.411	-2.768 +/- 1.249
Aspecto do gráfico de Ramachandran	-1.786 +/- 2.177	-3.392 +/- 1.139
Chi-1/chi-2 rotâmetros de normalidade	-3.092 +/- 1.518	-6.643 +/- 1.424
Conformação da cadeia principal	-0.574 +/- 3.310	-1.990 +/- 1.860
RMS Z-scores		
Comprimentos de ligação	1.048 +/- 0.001	1.056 +/- 0.006
Ângulo de ligação	0.599 +/- 0.003	0.603 +/- 0.019
Restrição de ângulo Ômega	0.017 +/- 0.007	0.127 +/- 0.031
Planaridade da cadeia lateral	0.026 +/- 0.008	0.246 +/- 0.088
Distribuição imprópria diedral	0.762 +/- 0.012	0.763 +/- 0.019
Distribuição de resíduos internos/externos	1.278 +/- 0.090	1.331 +/- 0.090

Para as estruturas sem e com refinamento em água, os valores de Z-scores foram negativos, devido ao valor medido ser menor do que a média das estruturas definidas por raios-X do banco de dados. Os valores mais negativos para as estruturas presentes na primeira parte da Tabela 4.8, mostram uma menor qualidade dessas em comparação com as estruturas definidas por raios-X do banco de dados.

Para as estruturas refinadas em água os valores de Z-scores referentes a qualidade de empacotamento da 1ª geração e o aspecto do gráfico de Ramachandran foram classificados como pobres. Tais valores mostram, para esses parâmetros de

qualidade, indicativos de erros graves para Z-scores inferiores a -2,0, e "Outliers para valores inferiores a -4, respectivamente. Foram observados $Z < -2$ para os parâmetros de qualidade de empacotamento de 1ª e 2ª geração, provavelmente devido ao peptídeo apresentar-se pouco estruturado, como mostra Figura 4.48.a. No caso do chi-1/chi-2 rotâmetros de normalidade, Z-scores é inferior a -4,0 indicando erros graves, podendo ser *outliers*, improváveis de ocorrer. Isso indica a existência de cadeias laterais com preferência conformacional eclipsada, de alta energia. Esses rotâmetros são pobres, com elevado número de estados eclipsados, porém, segundo Spronk e colaboradores, existe a possibilidade de ocorrência de verdadeiros desvios conformacionais preferenciais (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004), tal que o aplicativo não acusou o valor como *Outliers* e nem como erro grave.

O aspecto do gráfico de Ramachandran ($Z < -4$) indica a alta ocorrência de resíduos dispersos nas regiões mais favorecidas de Ramachandran, no entanto, observou-se que esse valor é melhor para a estrutura sem refinamento, devido a menor dispersão dos resíduos nas regiões mais favorecidas de Ramachandran (dados não mostrados), em comparação o diagrama de Ramachandran para as estruturas refinadas. Spronk e colaboradores (2004) observaram que o fato de 100% dos resíduos estarem localizados nas regiões mais favorecidas não indica necessariamente uma estrutura regular. Indicadores de qualidade como gráfico de Ramachandran, empacotamento e rotâmetros para estruturas de RMN são, geralmente, significativamente piores do que as melhores estruturas de raio-X do banco de dados, por não ser comum a inclusão de potenciais eletrostáticos nos cálculos das estruturas (Christian A E M Spronk et al., 2002) devido ao protocolo e/ou software utilizado no refinamento (Doreleijers, Rullmann, & Kaptein, 1998), resultando em uma má distribuição de cargas (Chris A.E.M. Spronk et al., 2004). A simplificação de contatos não ligantes conduz a um tratamento não realista das interações eletrostática e forças de Van Waals, que afetam o empacotamento e a ligação de hidrogênio.

Na segunda parte da Tabela 4.8, para as estruturas sem refinamento em água, observa-se que o modelo possui baixo RMS Z-scores para o ângulo ômega, planaridade das cadeias e ângulo das ligações. O estreito valor para os ângulos médios de ligações e ômeegas é devido às estruturas estarem fortemente restringidas, resultando em estruturas com valor alvo adequado, mas com distribuições apertadas. Esses parâmetros foram melhorados, quando as estruturas foram refinadas em água.

Sugere-se que o baixo valor para a planaridade das cadeias laterais seja devido ao baixo número de restrições geométricas.

Na segunda parte da Tabela 4.8, observa-se que o modelo sem refinamento possui um menor valor de RMS Z-score para o ângulo de ligação, ângulo ômega e planaridade das cadeias, comparados à estrutura refinada em água. Isto mostra que, com o refinamento em água, esses valores são menos restringidos, resultando em estruturas com valor alvo mais adequado e com distribuições menos apertadas.

As distâncias das ligações entre os resíduos, para ambos modelos com refinamento e sem refinamento em água, encontram-se próximos de 1. Elas possuem variações dentro do esperado para a média de tamanhos de ligações padrões, para um peptídeo normalmente restrito, indicando que não foram utilizadas restrições muito fortes ou errôneas no refinamento.

Tais valores mostram que os protocolos de refinamentos influenciam diretamente nas estruturas obtidas (Doreleijers et al., 1998). Sendo assim, as estruturas definidas como modelo foram as refinadas em água, devido a estas representarem uma proximidade ao ambiente real, além de possuírem melhores parâmetros de qualidade de RMS Z-scores.

A melhoria nos parâmetros para as estruturas refinadas em água confirmam as observações feitas por Doreleijers et al., de que o protocolo e/ou software utilizado no refinamento podem interferir nos parâmetros de qualidade das estruturas (Doreleijers et al., 1998), como observado para o parâmetro de RMS Z-scores.

Diante do exposto, observa-se que a modelagem apresenta resultados satisfatórios. O modelo final (refinado) apresenta comprimentos de ligação, ângulo de ligação, planaridade da cadeia lateral, distribuição imprópria diedral e distribuição de resíduos internos/externos adequados.

Vale ressaltar que a análise dos indicadores de geometria local para a validação dos modelos foi interessante, para comparar as estruturas de RMN com estruturas de raios-X, a partir de uma perspectiva de validação estrutural, englobando uma visão geral dos aspectos importantes de validação. Essa avaliação foi de grande importância para aferir a confiabilidade dos modelos de estruturas, pois eles foram cuidadosamente verificados e otimizados. Os problemas identificados permitem a reinterpretação e a otimização dos dados e das estruturas quando novos protocolos de refinamento e métodos de melhoramento de estruturas se tornarem disponíveis.

Tendo-se constatado a boa qualidade dos dados obtidos, decidiu-se por realizar estudos da cinética de troca, através da espectroscopia de RMN, que também é utilizada no estudo da dinâmica e estabilidade de peptídeos. O estudo foi realizado pelo monitoramento da troca dos hidrogênios amídicos da cadeia principal por deutério, chamado troca H/D (Chi et al., 2002). Como essa troca é favorecida pela maior acessibilidade do solvente a determinados resíduos de aminoácidos, a cinética de troca H/D é governada pela localidade dos resíduos. Sendo assim, observou-se a atenuação dos sinais de alguns resíduos de aminoácidos na região H_N-H_α , essas atenuações observadas indicam a troca de alguns hidrogênios do peptídeo pelos deutérios do solvente.

A Figura 4.55 mostra a cinética de atenuação dos sinais de correlação H_N-H_α dos mapas de contornos de TOCSY. Foram realizados experimento de troca H/D, totalizando-se 4 horas de duração. A Figura 4.55.a mostra o mapa de contornos para o peptídeo realizado com 90% de H_2O e 10% de D_2O , já a Figura 4.55.b e c mostram os mapas de contornos para o peptídeo realizado com 10% de H_2O e 90% de D_2O com 1 hora e 1:50 hora após o preparo, respectivamente. No segundo mapa de contornos (Figura 4.55.b) foi possível observar a atenuação dos resíduos Ser-1, Arg-2, Ser-3, Glu-4, Val-7, His-8, Gln-9 e Arg-10 (Figura 4.55.b). No terceiro mapa de contornos (Figura 4.55.c) todos os resíduos já haviam trocado (Figura 4.55.c).

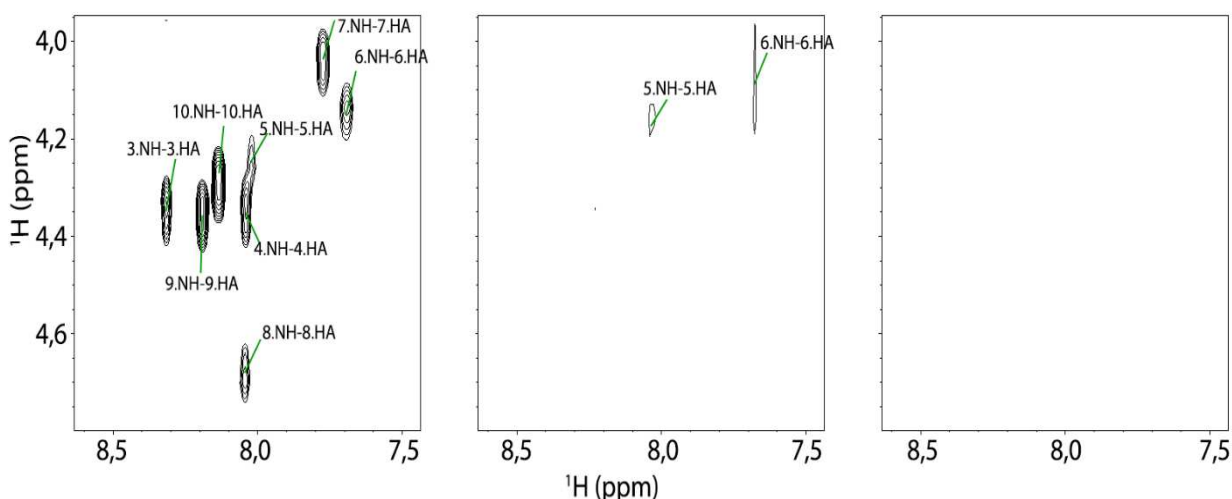


Figura 4.55 Mapas de contornos de TOCSY 1H da região de impressão digital (H_N-H_α) peptídeo Cm-p1 em SDS- d_{25} , a 25 °C. A) peptídeo com 90% H_2O 10% D_2O , B) peptídeo com 10% H_2O 90% D_2O , após 1 hora de troca e C) após 1 hora e 50 minutos de troca.

A menor atenuação, após 50 minutos, observada para os resíduos hidrofílicos Leu-5 e Ile-6, pode ser explicada pelo fato desses resíduos de aminoácidos se encontrarem na face hidrofóbica da micela.

Em ensaios semelhantes realizados para o peptídeo anfipático hilina a1 após 4 horas de experimento ainda haviam sinais sem atenuação total no mapa de contornos (Alves et al., 2015). A rápida troca H/D para o peptídeo *Cm-p1* mostra a alta acessibilidade do solvente a esses resíduos de aminoácidos, indicando que eles estão situados na fase aquosa.

Observando tal detalhe molecular de exposição ao solvente, é possível propor um modelo de interação desse peptídeo com as micelas de SDS-*d*₂₅, indicando a face mais provável de interação peptídeo-micela com os resíduos hidrofílicos Leu-5 e Ile-6 em contato com a micela, ou formando ligações de hidrogênio um pouco mais resistentes impedindo a troca completa nos 60 primeiros minutos.

4.3 Peptídeo *Cm-p1* modificado ([Phe3]*Cm-p1*)

Tendo-se um melhor conhecimento dos detalhes moleculares do peptídeo *Cm-p1*, outro peptídeo análogo foi sintetizado, com o intuito de observar a influência do aumento da hidrofobicidade na atividade e estruturação do mesmo. Desta forma, durante a síntese o resíduo de Ser-3 (polar) foi trocado pelo resíduo de Phe-3 (apolar). Esse novo peptídeo foi chamado de [Phe3]*Cm-p1*. O resíduo de fenilalanina-3 foi estrategicamente posicionado na face de interação do peptídeo, sendo que ele poderia ancorar sua cadeia lateral no interior da micela e favorecer uma maior interação.

Sabe-se que a maior habilidade de peptídeos em se estruturarem numa conformação helicoidal, de natureza anfipática, geralmente contribui para a maior atividade dos mesmos. Giangaspero et al. associou o aumento da atividade com o aumento da anfipaticidade. Segundo seus estudos, a cationicidade, associada à estabilização anfipática, é requerida para uma maior atividade peptídica contra bactérias gram-positivas e fungos (Giangaspero, Sandri, & Tossi, 2001).

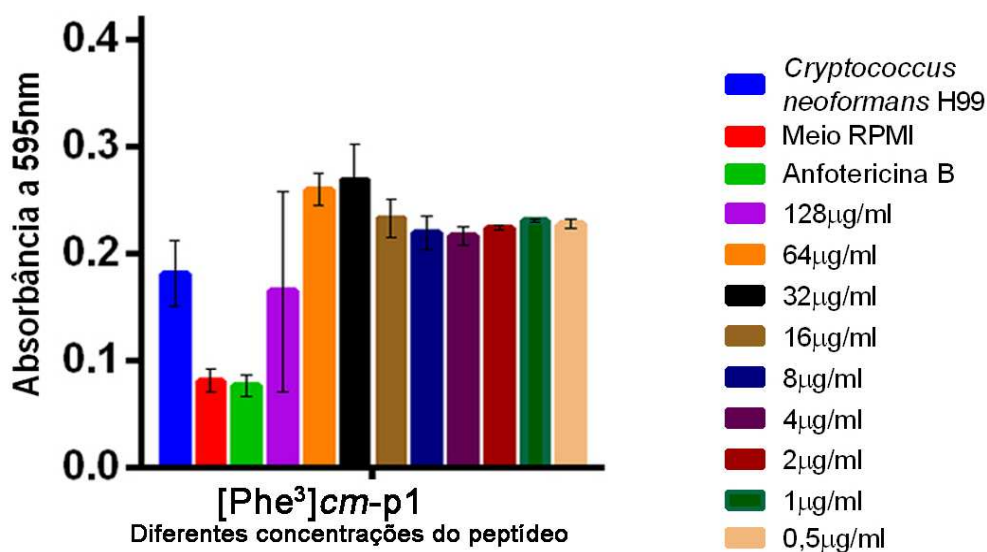
Devido à pequena quantidade de amostra disponível para realização dos testes de atividade, foram realizados testes apenas contra os microrganismos para os quais o peptídeo *Cm-p1* apresentava atividade: *Cryptococcus neoformans* e *Cândida albicans*. Como mostra a Figura 4.56, a modificação realizada na sequência primária

não levou presença de atividade antifúngica do peptídeo modificado, sendo que na máxima concentração do peptídeo utilizada nos testes, não foi encontrada a LD₅₀.

Apesar dos dados não mostrarem um aumento de atividade promovido pela modificação, sugere-se ainda outros testes de atividade antibacteriano, já que a maior anfipaticidade pode ser importante no mecanismo de interação de peptídeos antibacterianos.

A)

Cryptococcus neoformans H99 3



B)

Candida albicans ATCC 10231 3

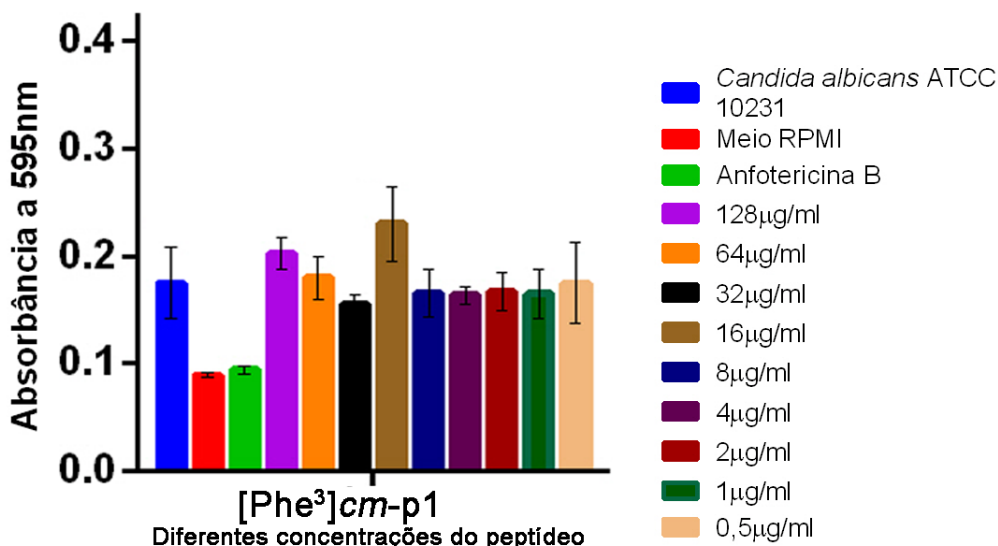


Figura 4.56 Avaliação da atividade antifúngica do peptídeo *[Phe³]Cm-p1* para a) *Cryptococcus neoformans* e B) *Candida Albicans*.

Apesar dos resultados de atividade não serem satisfatórios, os estudos conformacionais se mostraram bastante interessantes, como mostram os dados de DC (Figura 4.57). Na presença de micelas de SDS-d₂₅, o peptídeo se estrutura em α -hélice, como indicado pela máxima na região positiva próxima a 190 nm, correspondente a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, seguida dos mínimos com valores negativos em 207 nm e em 225 nm, correspondentes às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, respectivamente. Para o peptídeo com a modificação sequencial na posição 3 é observado uma estruturação em α -hélice de 53,63%. Esse valor é maior do que o observado para o peptídeo nativo. Sendo assim, sugere-se que a adição de um resíduo de amino ácido hidrofóbico provavelmente está favorecendo a interação peptídeo-SDS, aumentando, por conseguinte, a estruturação do mesmo.

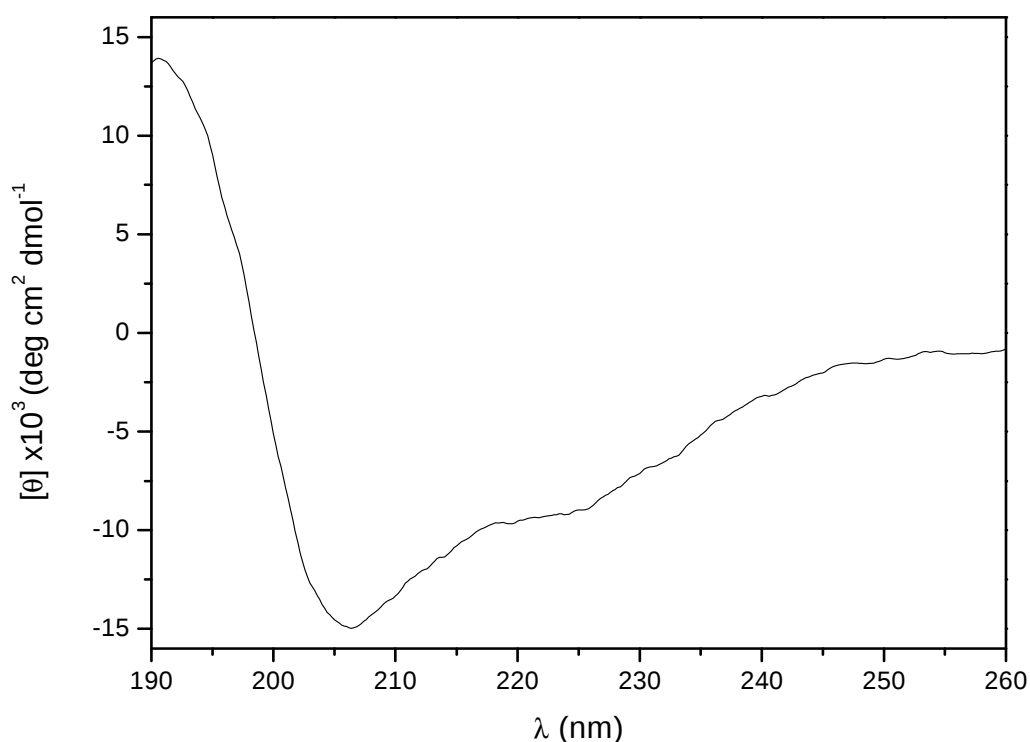


Figura 4.57 Espectro de DC, sendo $[\theta]_{\text{molar}}$ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) em função de λ (nm). Solução com 56,7 μM do peptídeo *[Phe3]Cm-p1*, 32 mM de micelas de SDS, pH 4,3 e 25 °C.

Os valores de deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N , atribuídos para o peptídeo *[Phe3]Cm-p1*, estão apresentados no Anexo 7.

A predição da estrutura secundária, utilizando a metodologia de Wishart (CSI) para peptídeos, calculado pelo programa NMRView, foi realizado considerando o pH e

temperatura da amostra. O conjunto de informações de deslocamentos químicos de H_α , H_N , C_α e C_β indicaram uma estruturação provável em hélice do resíduo Arg-2 ao Glu-9, como indicado pelas barras vermelhas na Figura 4.58 (David S. Wishart & Nip, 1998).

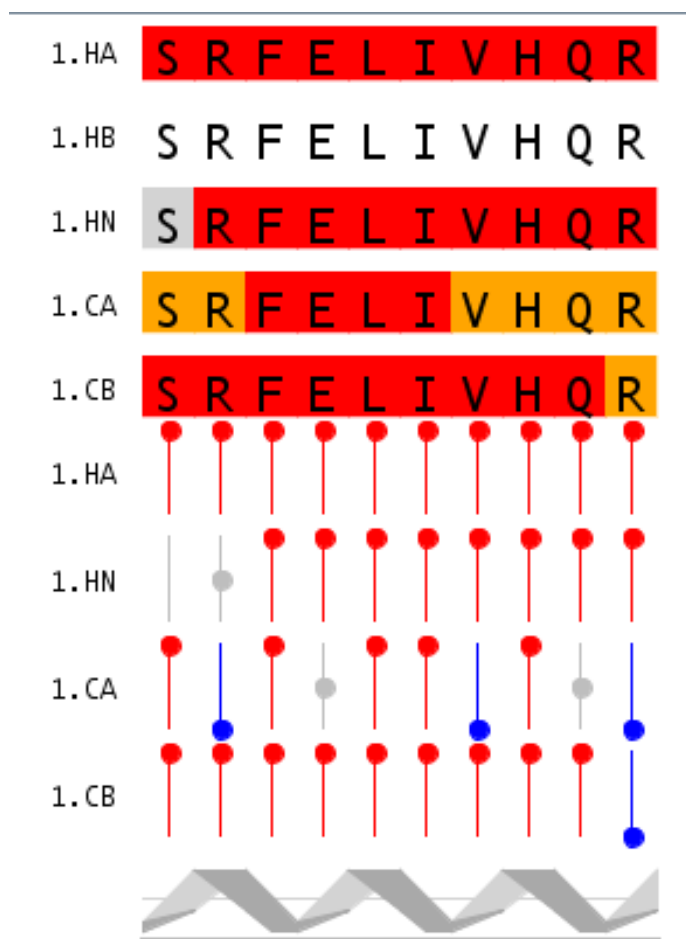


Figura 4.58 Gráfico de CSI para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Diferença entre os deslocamentos químicos experimentais e os valores padrões não estruturados pelo programa NMRView. As barras em azul indicam estruturação em conformação β e as barras em vermelho em α -hélice. As caixas alaranjadas mostram as estimativas de estruturação randômica e em cinza valores não informados ou iguais a zero.

Os ângulos diedros foram preditos a partir dos valores de deslocamentos químicos de H_α , C_α e C_β , utilizando o programa TALOS+. Todas as predições de ângulos ϕ e ψ foram classificadas como boas e consistentes (como indicado pela cor verde), elas indicaram uma estruturação em α -hélice em toda extensão do peptídeo. O Anexo 8 apresenta uma tabela com a predição dos ângulos diedros gerados pelo programa TALOS+ para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. As predições dos ângulos ϕ e ψ para

todos os resíduos indicaram uma estruturação em α -hélice do resíduo Arg-2 ao de His-8.

O diagrama de Ramachandran gerado pelo o programa TALOS+, para esses ângulos preditos, mostrou uma estruturação em α -hélice nas regiões mais favoráveis (Anexo 9), indicando uma boa predição. O diagrama de Ramachandran para as predições ϕ e ψ para cada resíduo de aminoácido concordou com estrutura secundária predita pelo programa TALOS+, conforme os resultados também esperados pelas predições do CSI.

Os valores do Índice de desvio do parâmetro de ordem (Figura 4.59.b) $RCI-S^2 > 0,5$ (Shen et al., 2009) indicam a ausência de resíduos dinâmicos, concordando com a ausência de predições em azul na Figura 4.59.a. Por fim, as barras na Figura 4.59.c refletem a probabilidade atribuída pela previsão de uma estruturação em α -hélice para do resíduo Arg-2 ao His-8, como indicado pelas barras vermelhas em -1.

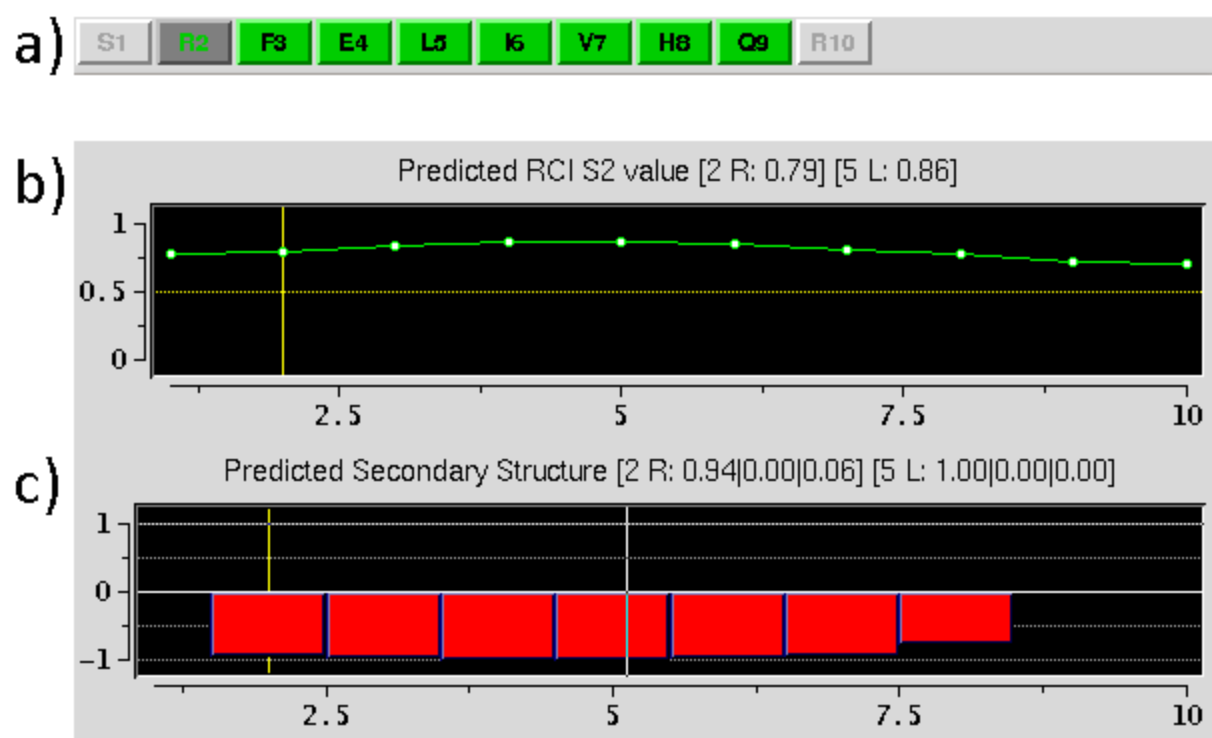


Figura 4.59 Interface gráfica do programa TALOS+. A) Sequência do peptídeo [Phe3]Cm-p1 com predição da exatidão, em cinza resíduos não preditos, em verde previsões consistentes e em amarelo previsão ambígua b) Índice de desvio do parâmetro de ordem $RCI-S^2$ em função da posição dos resíduos na sequência primária c) Previsão da estrutura secundária.

As restrições utilizadas nos cálculos estruturais, para o peptídeo [Phe³]Cm-p1, foram analisadas pelo programa QUEEN (Nabuurs et al., 2003), através dos gráficos de I_{uni} e I_{med} . As atribuições que apresentavam concomitantemente alta unicidade e alta informação média foram analisadas e removidas dos cálculos estruturais, a fim de remover possíveis erros de atribuição, de tal modo que as restrições utilizadas no cálculo final das estruturas apresentassem baixa unicidade (I_{uni}). A Figura 4.60 mostra o gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Os valores de $I_{uni} < 1$ indicam que as restrições utilizadas apresentam uma boa confiabilidade.

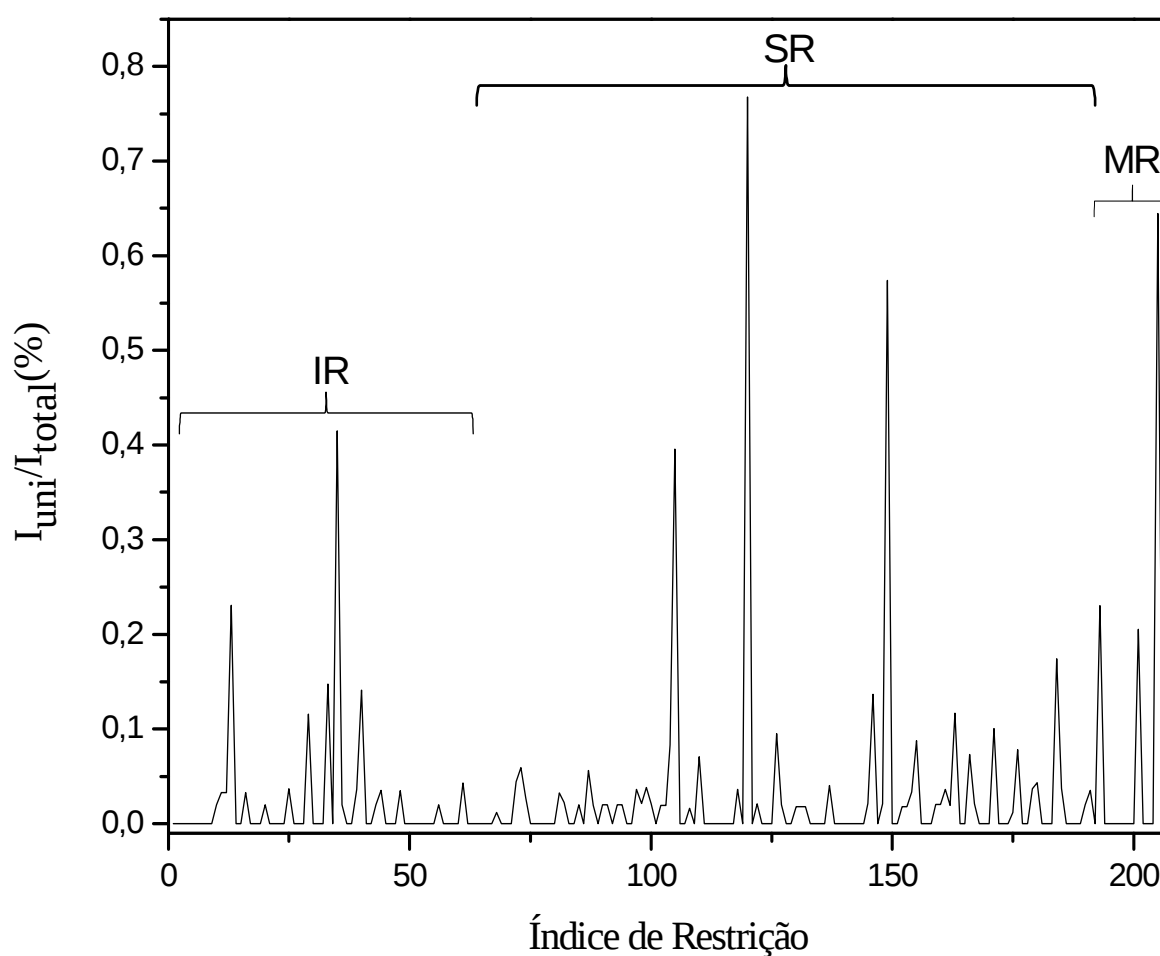


Figura 4.60. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação única (I_{uni}) pelo índice de restrição para o peptídeo [Phe³]Cm-p1 a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C. A classificação no gráfico indica restrições de médio alcance (MR), sequenciais (SR) e intra residuais (IR).

A Figura 4.61 de I_{uni} versus I_{med} mostra que as restrições apresentam baixos valores de unicidade ($I_{uni} < 1$) devido às restrições serem atribuídas dos dois lados da diagonal e altos valores de informação média (I_{med} até próximo de 12), devido às restrições utilizadas apresentarem forte impacto sobre a estrutura. Em geral a maioria das informações observadas de I_{med} apresentavam baixa unicidade e as restrições que apresentavam maiores informações únicas continha baixa informação média. A única restrição com maior valor de I_{uni} e I_{med} foi a restrição $8H_{\beta}$ - $5H_{\alpha}$, porém esta restrição estava dentro da faixa permitida de I_{uni} .

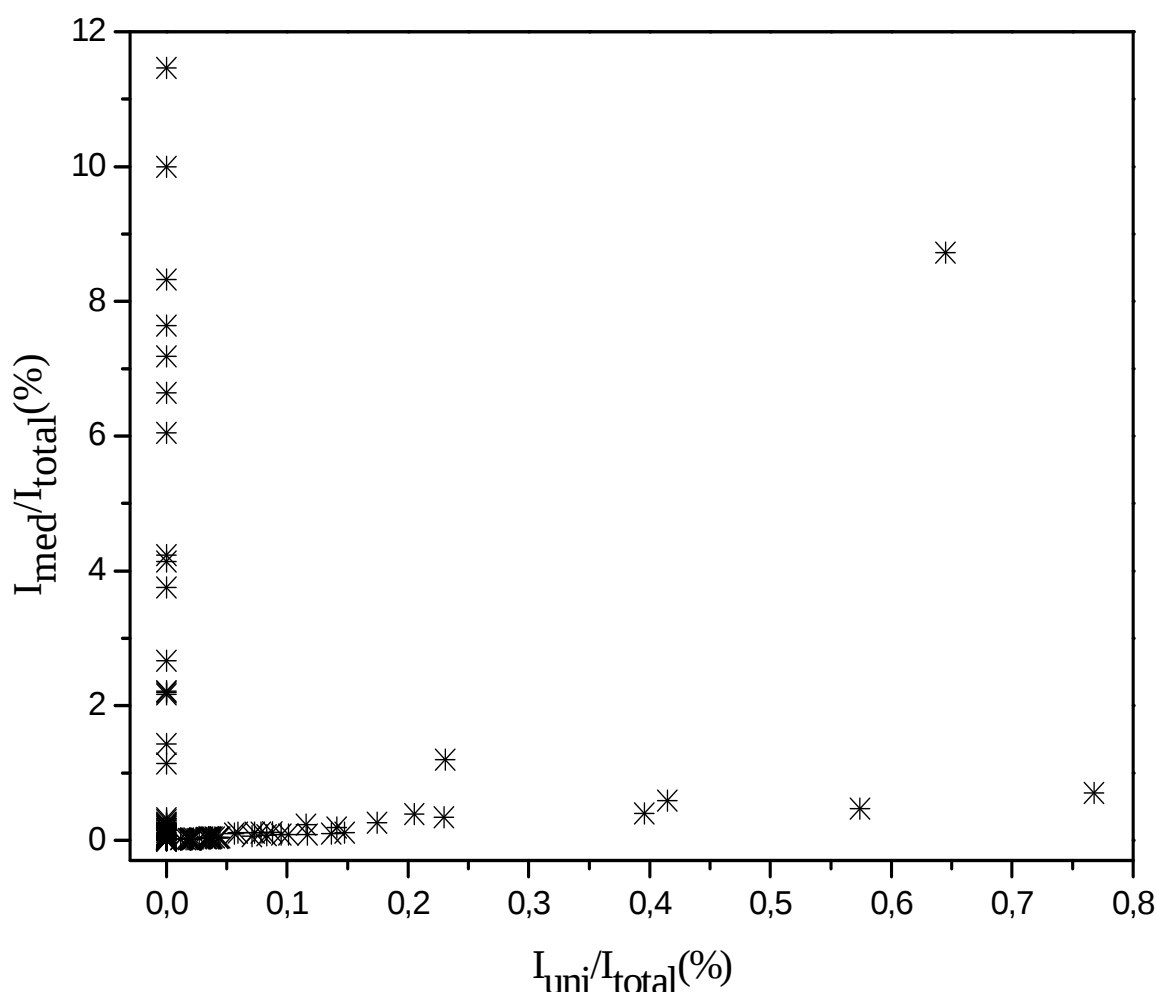


Figura 4.61. Análise das restrições de distâncias. Gráfico de informação média (I_{med}) versus informação única (I_{uni}) para o peptídeo [Phe3]*Cm*-p1 a 1 mM, em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

Um conjunto de 222 restrições de distância foi utilizado nos cálculos estruturais do peptídeo [Phe3]*Cm*-p1 (Tabela 4.9), resultando em uma média final de 22 restrições

por resíduo. Essa média restrições por resíduo indica a alta qualidade do conjunto de restrições experimentais utilizadas.

Tabela 4.9 Análise estatística das restrições utilizadas no cálculo estrutural para o peptídeo [Phe³]Cm-p1.

Restrições utilizadas	
Total de restrições de distância	222
Intra residuais	130
Sequenciais	61
Média distância ($1 < i-j < 5$)	15
Restrições de ângulos diedros	16

Algumas das restrições utilizadas podem ser visualizadas no painel de NOE (Figura 4.62). Ele mostra as atribuições com NOEs confirmados dos dois lados da diagonal, inter residuais do tipo $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, além de restrições d_{NN} $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ sequenciais. Desta forma, o aspecto do painel de NOEs, os dados de CSI e a informação média indicam boa estruturação do peptídeo em α -hélice na presença de micelas de SDS- d_{25} .

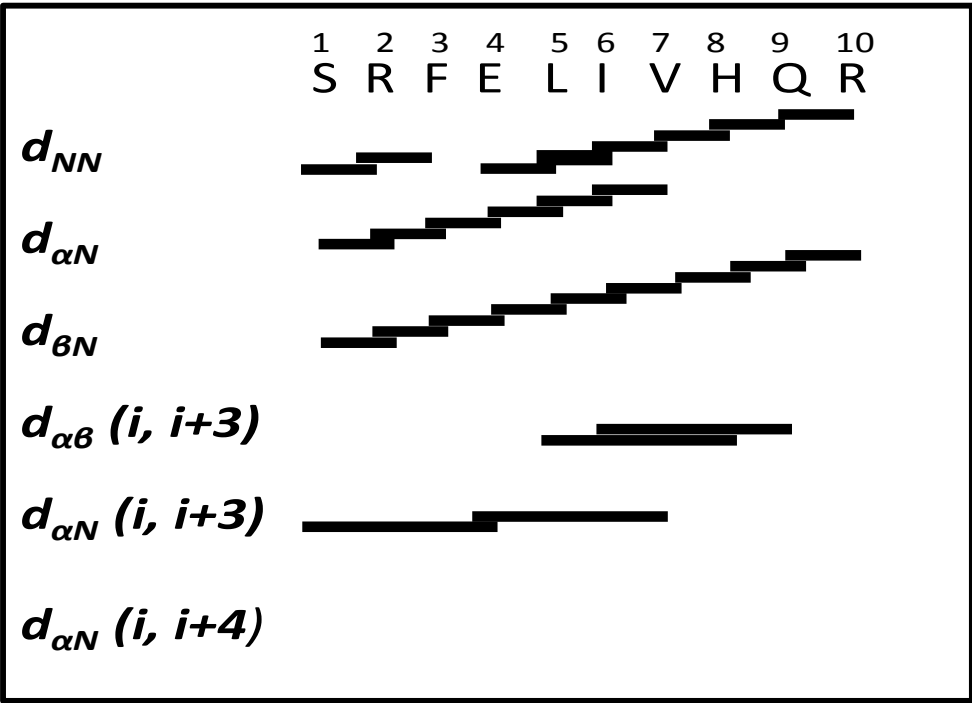


Figura 4.62. Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo [Phe³]Cm-p1 a 1 mM em solução micelar de SDS- d_{25} . As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ estão representadas no diagrama. As espessuras das linhas variam de acordo com as intensidades dos sinais: fraca, média e forte.

As vinte estruturas de menor energia (de um total de 200 estruturas calculadas) foram refinadas, dos quais as dez estruturas mais estáveis foram escolhidas para representarem a família de estruturas do peptídeo [Phe³]Cm-p1.

Os valores de RMSD, foram calculados através do programa MOLMOL (Koradi et al., 1996), onde os dez confórmeros de menor energia foram sobrepostos (Figura 4.63) e obtidos os valores de RMSD (desvio médio quadrático) pelo alinhamento dos átomos da estrutura de menor energia e das demais estruturas (Tabela 4.10).

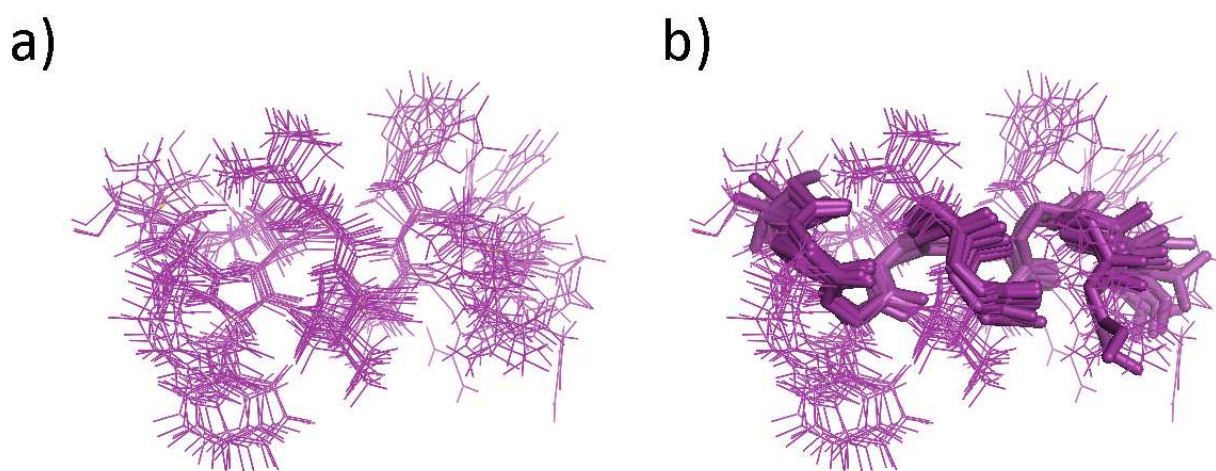


Figura 4.63. Conjunto das dez estruturas de menor energia do peptídeo [Phe³]Cm-p1 em solução micelar de SDS-*d*₂₅ A) Sobreposição das estruturas mais estáveis B) Com a cadeia principal em destaque.

Tabela 4.10. Estatística das vinte estruturas de menor energia para o peptídeo [Phe³]Cm-p1, quanto à geometria das estruturas obtidas.

RMSD – Todos os resíduos ^a	Å
Cadeia principal	0,92 ± 0,36
Cadeia principal e átomos pesados	1,70 ± 0,53
RMSD – Segmento helicoidal ^b	
Cadeia principal	0,54 ± 0,26
Cadeia principal e átomos pesados	1,20 ± 0,31

a-Dados obtidos através do programa MOLMOL; b-Resíduo 2 ao 9

O valor de RMSD equivalente a $0,92 \pm 0,36$ Å, obtido pelo alinhamento de todos os átomos, evidenciou que as estruturas exibem uma boa geometria, indicando uma

razoável flexibilidade conformacional. Tal valor reflete a dinâmica interna da molécula e as incertezas que derivam de conversão experimental dos dados e processos computacionais. Assim, observaram-se uma consistência e compatibilidade das restrições utilizadas no cálculo estrutural.

Na Figura 4.64.b, observa-se que o esqueleto peptídico está enrolado com o sentido para a direita, com suas cadeias laterais projetadas para fora do região helicoidal, sendo cada passo da hélice constituído por cerca de 3,6 resíduos de aminoácidos. O peptídeo [Phe3]Cm-p1 apresentou-se estruturado em hélice, abrangendo a região entre os resíduos de Arg-2 à Glu-9.

O peptídeo [Phe3]Cm-p1 possui três resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg-2, His-8 e Arg-10) e um resíduo de aminoácido com carga negativa (Glu-4). A estrutura refinada em água de menor energia está apresentada na Figura 4.64, com os resíduos de aminoácidos catiônicos destacados em rosa e aniônico em amarelo. Propõe-se que as regiões carregadas positivamente do peptídeo ligam-se aos grupos cabeça com carga negativa das membranas bacterianas (VanCompernelle et al., 2005), ou do meio mimético e que o resíduo de Phe-3 insere-se no interior da micela, favorecendo uma maior estabilidade estrutural, tal como evidenciado pela maior estruturação do peptídeo observada após a inserção de um resíduo hidrofóbico na sequência, no lugar do resíduo de Ser-3.

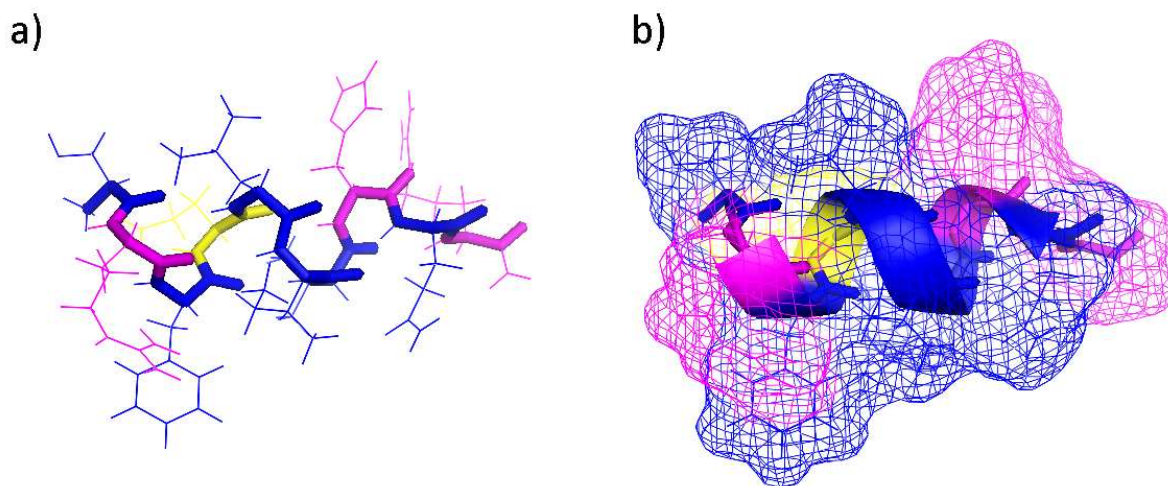
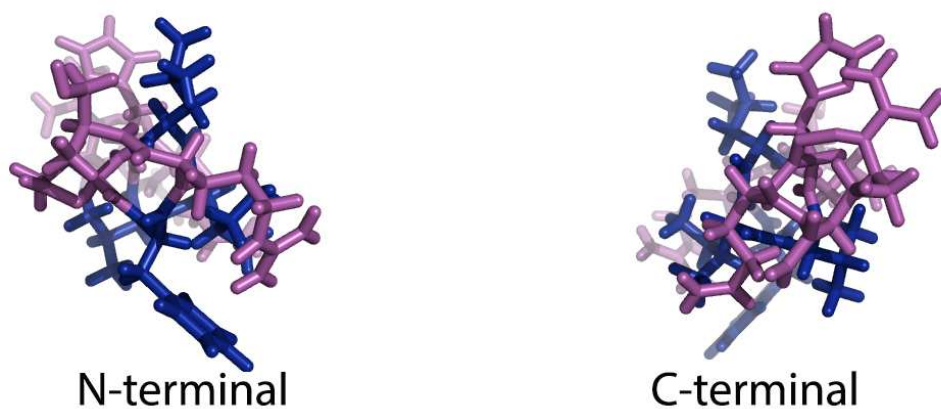


Figura 4.64. Estrutura de menor energia para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅ e pH 4,3. A) Estrutura de menor energia com os resíduos catiônicos destacados em rosa e o aniônico em amarelo. B) Visualização em superfícies.

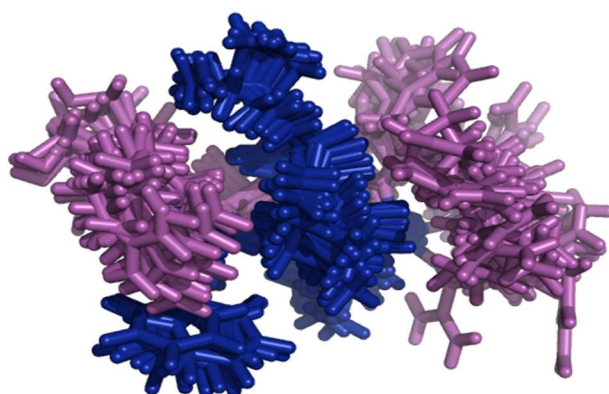
Existe uma característica comum a grande parte dos PAMs helicoidais, de se estruturarem com faces hidrofóbicas e hidrofílicas, caracterizando-se assim uma molécula anfipática. Observa-se que a modificação no peptídeo *Cm-p1* do resíduo Ser-3 por Phe-3 levou ao aumento da anfipaticidade da molécula, de tal forma que o resíduo de fenilalanina se posicionou na face hidrofóbica do peptídeo, face provável de interação peptídeo-membrana (Figura 4.65.b), no caso em estudo.

A)

vista frontal



B)



C)

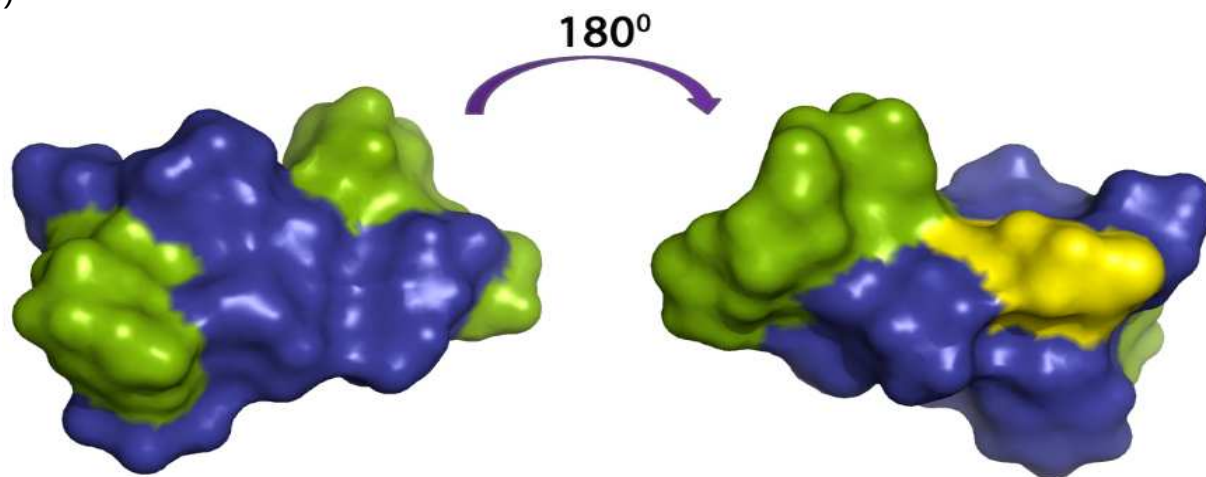


Figura 4.65. Conjunto das dez estruturas de menor energia para o peptídeo [Phe3]Cm-p1 em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} . A) Vista frontal *N*-terminal (esquerda) e *C*-terminal (direita), em azul resíduos hidrofóbicos e polares em rosa. B) Sobreposição das dez estruturas mais estáveis, com resíduos polares em rosa e hidrofóbicos em azul. C) Estrutura de menor energia com visualização em superfícies, sendo os resíduos catiônicos destacados em verde e aniônico em amarelo.

São abaixo apresentados, a estrutura de menor energia, Figura 4.66, os resíduos de aminoácidos destacados conforme suas características hidrofóbicas, catiônicas e aniônica, bem como suas posições na cadeia. Os estudos de dicroísmo circular indicaram que o peptídeo [Phe³]Cm-p1 possuía estrutura definida em α -hélice na presença de micelas de SDS. As estruturas obtidas por RMN confirmam essa observação, além de mostrarem a posição de cada resíduo de aminoácido na estrutura terciária.

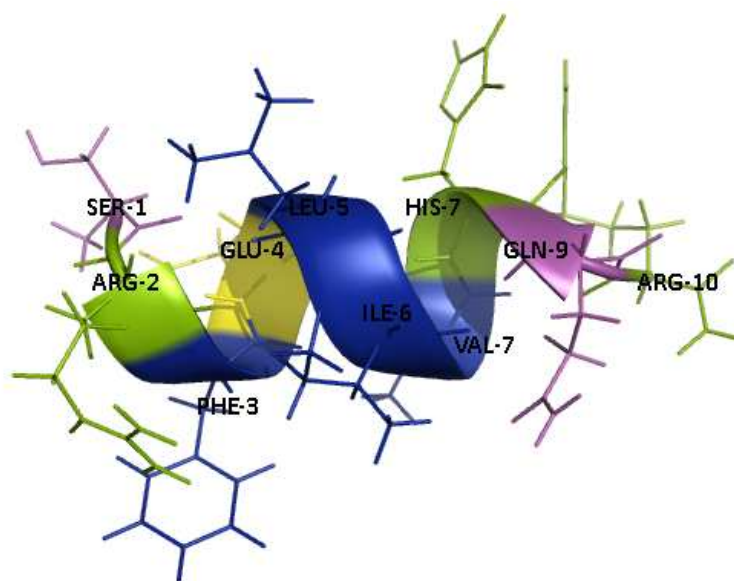


Figura 4.66 Estrutura de menor energia do peptídeo [Phe³]Cm-p1 em SDS-*d*₂₅, pH 4,3, a 25 °C. Os resíduos hidrofóbicos estão destacados em azul, os hidrofílicos em rosa, catiônicos em verde e aniônico em amarelo.

O diagrama de Ramachandram para as estruturas apresentadas confirma a boa qualidade das estruturas obtidas para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Observa-se que 100% dos resíduos de aminoácidos estão localizados na região de ângulos diedros ϕ e ψ mais favoráveis. Os resíduos de aminoácidos estão localizados na região negativa de ϕ e ψ , característica de α -hélice, como mostra a Figura 4.67.

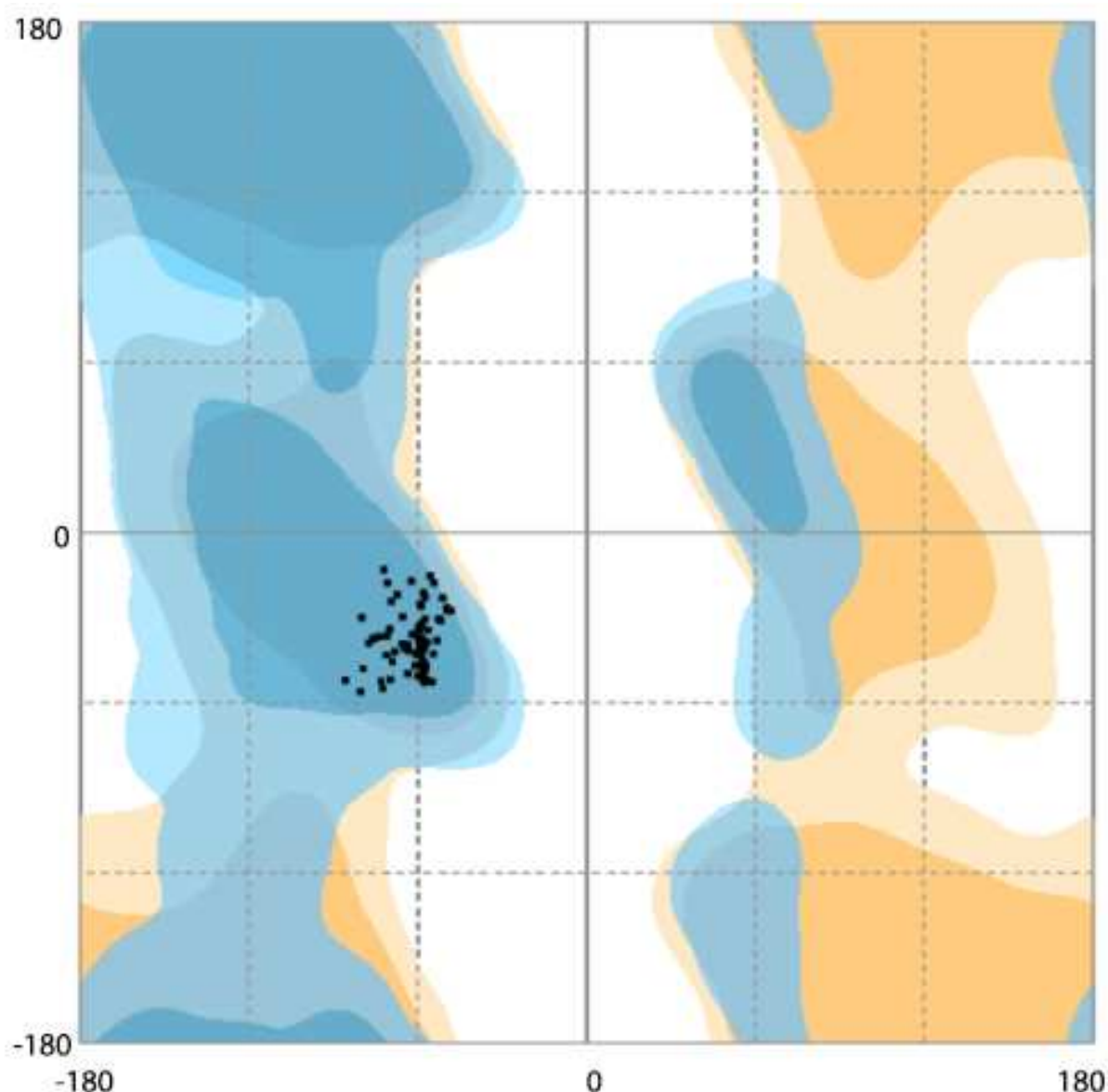


Figura 4.67. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. As áreas em azul escuro indicam conformações sem impedimento estérico e são chamadas de regiões favorecidas; as áreas em azul claro, conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e as áreas em branco correspondem a regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Dados obtidos com o uso do *Ramachandran Plot* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Foram realizados experimento de DOSY, com o intuito de verificar a diferença de interação do peptídeo Cm-p1 e [Phe³]Cm-p1 (Figura 4.68) com as micelas de detergentes. Para tanto, os valores de coeficiente de difusão foram obtidos da região de metila (0,5-1 ppm), para os três sinais mais intensos e o desvio padrão foi calculado.

O aumento da anfipaticidade favoreceu uma maior estruturação ao peptídeo [Phe³]Cm-p1 (Figura 4.66, pág. 126) comparado ao Cm-p1 (Figura 4.53, pág. 108),

bem como um menor coeficiente de difusão para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Tal fato indica que a modificação do resíduo Ser-3 por Phe-3 favoreceu uma maior interação peptídeo-micela, mostrando que a hidrofobicidade do peptídeo desempenha um papel crucial no governo de sua interação com as micelas de SDS-*d*₂₅, como observado também por Deaton *et al.* (Deaton *et al.*, 2001).

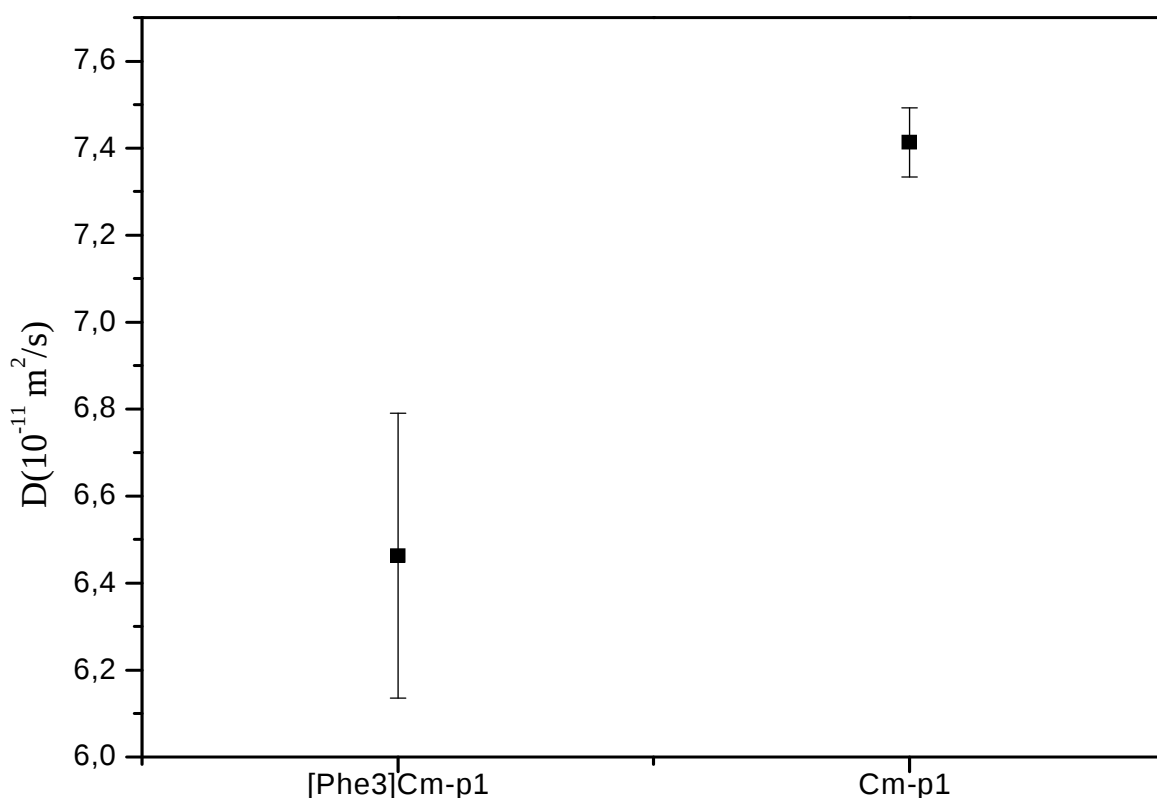


Figura 4.68 Gráfico com valores de coeficiente de difusão ordenada para o peptídeo Cm-p1 e [Phe³]Cm-p1 em SDS-*d*₂₅, pH 4,3 e 25 °C. As barras na figura correspondem ao erro da medida.

O entendimento da estrutura terciária de peptídeos e proteínas é muito importante, pois tal informação pode direcionar pesquisadores no desenho de novos protótipos com sua eficácia otimizada, a partir de modificações planejadas, preservando ou aumentando suas propriedades farmacológicas. Neste estudo, observou-se que tal modificação estrutural aumentou a estruturação do peptídeo, porém não aumentou sua atividade antifúngica, indicando que sua função biológica não está diretamente ligada as características anfipáticas da molécula, mas pode estar ligada as outras interações como: conformação, carga, hidrofobicidade e ângulo polar. Neste caso, sugere-se que sejam realizados outros testes de atividades, com o intuito de verificar se a modificação

influenciou na atividade antibacteriana, já que o peptídeo *Cm-p1* apresentava atividade antifúngica apenas.

5. Conclusões

Para o peptídeo clavanina A, as análises de DC mostraram que, em condições de pH entre 5 e 7, o peptídeo apresenta-se com maior estruturação em hélice e, quando elevado a altas temperaturas, ele se desestruturou. Já o peptídeo *Cm-p1* mostrou-se muito específico, se estruturando apenas na presença de micelas de SDS e em meio ácido.

Ressalta-se que a função e propriedade estrutural dos peptídeos mostraram-se ser compostas por um conjunto de várias condições, incluindo solvente e o meio mimético, pH e concentração. Os peptídeos estudados adotaram estrutura secundária apenas após a interação com um meio específico favorável, assim como os peptídeos lineares cecropina, isolada de mariposa (Sato & Feix, 2006) e o peptídeo magainina, isolado de anfíbios (B Bechinger, Zasloff, & Opella, 1993; Gesell et al., 1997), que adotam uma organização de estrutura secundária em α -hélice somente com a interação com um meio específico.

Os estudos estruturais realizados através da espectroscopia de RMN forneceram os detalhes moleculares da estrutura terciária dos peptídeos em estudo. O peptídeo clavanina A se estruturou em α -hélice pouco anfipática entre os resíduos Phe-2 e Val-22, como esperado pelas previsões do CSI e TALOS+. Os resultados obtidos para o peptídeo clavanina A através dos experimentos de DOSY mostraram que a estruturação do peptídeo não está ligada à interação peptídeo-peptídeo, mas apenas à peptídeo-micela.

O peptídeo *Cm-p1* se estruturou em α -hélice pouco anfipática na presença de micelas de SDS- d_{25} entre os resíduos Arg-2 e Ile-6. A baixa hidrofobicidade apresentada pelo peptídeo *Cm-p1* provavelmente influencia diretamente em sua baixa atividade hemolítica. Já o peptídeo [Phe3]*Cm-p1* se estruturou em α -hélice pouco anfipática na presença de micelas de SDS- d_{25} entre os resíduos Arg-2 e Gln-9. O resíduo hidrofóbico adicionado favoreceu uma maior interação peptídeo-micela além de aumentar o grau de estruturação. Os experimento de DOSY, realizado para o peptídeo *Cm-p1* e [Phe3]*Cm-p1*, mostraram que a substituição do resíduo de Ser-3 por Phe-3 favoreceu uma maior interação peptídeo-micela, evidenciando que a hidrofobicidade do peptídeo desempenha um papel importante em sua interação. Contudo, essa maior interação do peptídeo [Phe3]*Cm-p1* com a micela não conduziu a

uma maior atividade antifúngica, indicando que sua função não está ligada ao maior grau de estruturação.

A validação das estruturas forneceu uma indicação da confiabilidade do modelo. Para ambos os peptídeos, a família de estruturas mais estáveis, refinadas em água, mostraram-se com boas geometria e qualidade conformacional. Essa avaliação se mostrou de grande importância para aferir a confiabilidade dos modelos obtidos.

6. Referências

- Agerso, H., Koechling, W., Knutsson, M., Hjortkjaer, R., & Karlsson, M. O. (2003). The dosing solution influence on the pharmacokinetics of degarelix, a new GnRH0 antagonist, after s.c. administration to beagle dogs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(3), 335–340.
- Ahern, T. J., & Klibanov, A. M. (1988). *Methods of Biochemical Analysis*. (D. Glick, Ed.) (Vol. 33). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037–50.
- Alves, E. S. F., Junior, E. C., Cilli, E. M., Castro, M. S., Fontes, W., de Magalhaes, M. T. Q., ... de Oliveira, A. L. (2015). Micelle Bound Structure and Model Membrane Interaction Studies of the Peptide Hylin a1 from the Arboreal South American Frog *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein and Peptide Letters*, 22(8), 719–26.
- Ammannagari, N., Javvaji, C., Danhaivijitr, P., & George, S. (2016). Dramatic PSA Increase With Tumor Shrinkage After Initiating Degarelix in Advanced Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 14(1), e123–e125.
- Amylin, E. L. (2013). Challenges in the large scale production of peptides. *Speciality Chemicals Magazine*, d(May), 26–28.
- Andre, E., & Dimarcq, J. L. (2004). Cationic antimicrobial peptides : update of clinical development. *Journal of Internal Medicine*, 255, 519–520.
- Aniansson, E. A. G., Wall, S. N., Almgren, M., Hoffmann, H., & Ulbricht, W. (1976). Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation of micellar solution of ionic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*, 80(9), 905–922.
- Aoki, W., Kuroda, K., & Ueda, M. (2012). Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), 365–370.
- Apponyi, M. a, Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Maselli, V. M., Bowie, J. H., Tyler, M. J., ... Llewellyn, L. E. (2004). Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*, 25(6), 1035–54.
- Aring, A. L. A. N. J. W. (2003). Natural Peptide Antibiotics from Tunicates : Structures , Functions and Potential Uses. *Integr Comp Biol.*, 43, 313–322.
- Babakhani, A., Gorfe, A. a, Kim, J. E., & McCammon, J. A. (2008). Thermodynamics of peptide insertion and aggregation in a lipid bilayer. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 112(34), 10528–34.

- Bach, A. C., Selsted, M. E., & Pardi, A. (1987). Two-dimensional NMR studies of the antimicrobial peptide NP-5. *Biochemistry*, 26(14), 4389–4397.
- Barker, J. L. (1991). Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88(May), 3792–3796.
- Bechinger, B. (1999). The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 157–83.
- Bechinger, B., & Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1529–1539.
- Bechinger, B., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1993). Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2(12), 2077–84.
- Berjanskii, M. V., & Wishart, D. S. (2007). The RCI server : rapid and accurate calculation of protein flexibility using chemical shifts, 35, 531–537.
- Boland, M. P., & Separovic, F. (2006). Membrane interactions of antimicrobial peptides from Australian tree frogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1178–83.
- Boman, H. G., & Hultmark, D. (1987). Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol*, 41, 103–126.
- Brogden, K. a. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–50.
- Brünger, a T., Krukowski, a, & Erickson, J. W. (1990). Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallographica. Section A, Foundations of Crystallography*, 46 (Pt 7), 585–93.
- Buysschaert, M., D’Hooge, D., & Preumont, V. (2015). ROOTS: A multicenter study in Belgium to evaluate the effectiveness and safety of liraglutide (Victoza(R)) in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr*, 9(3), 139–142.
- Carpenter, C. F., & Chambers, H. F. (2004). Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(7), 994–1000.
- Chan, D. I., Prenner, E. J., & Vogel, H. J. (2006). Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1184–1202.

- Chen, Y.-H., Yang, J. T., & Chau, K. H. (1974). Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*, 13(16), 3350–3359.
- Chi, Y.-H., Kumar, T. K. S., Kathir, K. M., Lin, D.-H., Zhu, G., Chiu, I.-M., & Yu, C. (2002). Investigation of the structural stability of the human acidic fibroblast growth factor by hydrogen-deuterium exchange. *Biochemistry*, 41(51), 15350–9.
- Choonara, B. F., Choonara, Y. E., Kumar, P., Bijukumar, D., Toit, L. C., & Pillay, V. (2014). A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1269–1282.
- Clark, T. D., Bartolotti, L., & Hicks, R. P. (2013). The application of DOSY NMR and molecular dynamics simulations to explore the mechanism(s) of micelle binding of antimicrobial peptides containing unnatural amino acids. *Biopolymers*, 99(8), 548–61.
- Clore, G. M., Martin, S. R., & Gronenborn, A. M. (1986). Solution structure of human growth hormone releasing factor. *Journal of Molecular Biology*, 191(3), 553–561.
- Clore, G. M., Nilges, M., Sukumaran, D. K., Brungerl, A. T., Karplus, M., & Gronenborn, M. (1986). The three-dimensional structure of cxi-purothionin in solution: and restrained molecular dynamics, 5(10), 2729–2735.
- Cooper, E. L., & Yao, D. (2012). Diving for drugs : tunicate anticancer compounds. *Drug Discovery Today*, 17(11-12), 636–648.
- Courtenay Lewis, J. (1973). On the Einstein-Stokes diffusion coefficient for Brownian motion in two dimensions. *Physics Letters A*, 44(4), 245–246.
- Dathe, M., Schümann, M., Wieprecht, T., Winkler, a, Beyermann, M., Krause, E., ... Bienert, M. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry*, 35(38), 12612–22.
- Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462(1-2), 71–87.
- Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., ... Bienert, M. (1997). Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters*, 403(2), 208–212.
- Davis, A. L., Keeler, J., Laue, E. D., & Moskau, D. (1992). Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 98(1), 207–216.

- Deaton, K. R., Feyen, E. a., Nkulabi, H. J., & Morris, K. F. (2001). Pulsed-field gradient NMR study of sodium dodecyl sulfate micelle-peptide association. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39(5), 276–282.
- Debono, M., & Gordee, R. S. (1994). Antibiotics That Inhibit Fungal Cell Wall Development. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 471–497.
- DeFronzo, R. a, Ratner, R. E., Han, J., Kim, D. D., Fineman, M. S., & Baron, A. D. (2005). Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(5), 1092–100.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. (1995). NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(3), 277–93.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. San Carlos, CA, USA.
- Donnez, J., Vilos, G., Gannon, M. J., Stampe-Sorensen, S., Klinte, I., & Miller, R. M. (1997). Goserelin acetate (Zoladex) plus endometrial ablation for dysfunctional uterine bleeding: a large randomized, double-blind study. *Fertility and Sterility*, 68(1), 29–36.
- Doreleijers, J. F., Rullmann, J. a, & Kaptein, R. (1998). Quality assessment of NMR structures: a statistical survey. *Journal of Molecular Biology*, 281(1), 149–64.
- Faccone, D., Veliz, O., Corso, A., Noguera, M., Martínez, M., Payes, C., ... Cesar, P. (2014). Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 71, 31–35.
- Flávia, J. (2014). *Estratégias bionanotecnológicas para produção e liberação controlada de peptídeos antimicrobianos*. Universidade de Brasília.
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics : current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20(1), 122–128.
- Fox, M. a, Thwaite, J. E., Ulaeto, D. O., Atkins, T. P., & Atkins, H. S. (2012). Design and characterization of novel hybrid antimicrobial peptides based on cecropin A, LL-37 and magainin II. *Peptides*, 33(2), 197–205.
- Furman, B. L. (2012). The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon*, 59(4), 464–471.
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Vitiello, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2013). Peptide-lipid interactions: experiments and applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18758–89.

- Garnick, M. B. (1986). Leuprolide versus diethylstilbestrol for previously untreated stage D2 prostate cancer. Results of a prospectively randomized trial. *Urology*, 27(1), 21–28.
- Gauglitz, G., & Vo-Dinh, T. (2003). *Handbook of Spectroscopy*. (WILEY-VCH, Ed.). Weinheim.
- Gayen, A., Goswami, S. K., & Mukhopadhyay, C. (2011). NMR evidence of GM1-induced conformational change of Substance P using isotropic bicelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(1), 127–39.
- Gesell, J., Zasloff, M., & Opella, S. J. (1997). Two-dimensional ^1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol / water solution. *Journal of Biomolecular NMR*, 9, 127–135.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Simona, M., Prete, D., Mataloni, A., Mario, M., ... Scalise, G. (2000). Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, 21, 1155–1160.
- Giangaspero, A., Sandri, L., & Tossi, A. (2001). Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(21), 5589–5600.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 135(1), 1–11.
- Hale, J. D. F., & Hancock, R. E. W. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria, 951–959.
- Hancock, R. E., & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82–8.
- Hancock, R. E., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 8856–61.
- Hancock, R. E. W., & Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149.
- Haney, E. F., Hunter, H. N., Matsuzaki, K., & Vogel, H. J. (2009). Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: linking structure to function? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1639–55.
- Harrison, P. L., Abdel-rahman, M. A., Miller, K., & Strong, P. N. (2014). Antimicrobial peptides from scorpion venoms. *Toxicon*, 88, 115–137.

- Hasson, T., Kolitz, S., Towfic, F., Laifenfeld, D., Bakshi, S., Beriozkin, O., ... Grossman, I. (2016). Functional effects of the antigen glatiramer acetate are complex and tightly associated with its composition. *Journal of Neuroimmunology*, 290, 84–95.
- He, Y., & Lazaridis, T. (2013). Activity determinants of helical antimicrobial peptides: a large-scale computational study. *PloS One*, 8(6), e66440.
- Hong, R. W., Shchepetov, M., Weiser, J. N., & Axelsen, P. H. (2003). Transcriptional Profile of the Escherichia coli Response to the Antimicrobial Insect Peptide Cecropin A Transcriptional Profile of the Escherichia coli Response to the Antimicrobial Insect Peptide Cecropin A.
- Hu, Q., van Gaal, E. V. B., Brundel, P., Ippel, H., Hackeng, T., Rijcken, C. J. F., ... Prakash, J. (2015). A novel approach for the intravenous delivery of leuprolide using core-cross-linked polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, 205, 98–108.
- Ibarguren, C., Naranjo, P. M., Stötzel, C., Audisio, M. C., Sham, E. L., Farfán, E. M., & Müller, F. A. (2014). Applied Clay Science Adsorption of nisin on raw montmorillonite. *Applied Clay Science*, 90, 88–95.
- Jarvet, J., Zdunek, J., Damberg, P., & Gräslund, a. (1997). Three-dimensional structure and position of porcine motilin in sodium dodecyl sulfate micelles determined by 1H NMR. *Biochemistry*, 36(26), 8153–63.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006a). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006b). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511.
- Johnson, B. A., & Blevins, R. A. (1994). NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular NMR*, 4(5), 603–14.
- Johnson, K. P., Brooks, B. R., Cohen, J. a, Ford, C. C., Goldstein, J., Lisak, R. P., ... Schiffer, R. B. (1995). Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*, 45(7), 1268–1276.
- Judge, M. L., Duell, R., Burriesci, L., & Moarsi, W. (2009). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Life in the Supralittoral Fringe : Microhabitat Choice , Mobility and Growth in the Tropical Perwinkle Cenchritis (= Tectarius) muricatus (Linneaus , 1758). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369(2), 148–154.
- Kan, E. J. M. Van, Demel, R. A., Bent, A. Van Der, & Kruijff, B. De. (2003). The role of the abundant phenylalanines in the mode of action of the antimicrobial peptide clavanin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1615, 84–92.

- Kang, C., Lee, Y., Han, E., Park, H., Yun, S., & Chan, W. (2015). Effects of temperature and body size on the physiological energetics of the stalked sea squirt *Styela clava*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 462, 105–112.
- Kaspar, A. A., & Reichert, J. M. (2013). Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism, 1751, 119–139.
- Kelly, S. M., & Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), 349–84.
- Kim, S., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides : A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1–9.
- Kleywegt, G. J., & Jones, T. a. (1996). Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure*, 4(12), 1395–400.
- Knudsen, L. B. (2010). Liraglutide: The therapeutic promise from animal models. *International Journal of Clinical Practice*, 64(October), 4–11.
- Komoto, T. T., Bitencourt, T. A., Silva, G., Beleboni, R. O., Marins, M., & Fachin, A. L. (2015). Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–7.
- Kontoyiannis, D. P., & Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, 359(9312), 1135–44.
- Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 51–55.
- Kupče, Ě., & Freeman, R. (2013). Mapping molecular perturbations by a new form of two-dimensional spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 135(8), 2871–4.
- Laskowski, R. a., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291.
- Lauterwein, J., Bösch, C., Brown, L. R., & Wüthrich, K. (1979). Physicochemical studies of the protein-lipid interactions in melittin-containing micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 556(2), 244–264.
- Lee, I. H., Cho, Y., & Lehrer, R. I. (1997). Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infection and Immunity*, 65(7), 2898–2903.

- Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S. ., Cooper, E. L., & Lehrer, R. I. (1997). Clavanins, α -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Letters*, 400(2), 158–162.
- Lehrer, R. I., Lee, I. H., Menzel, L., Waring, A., & Zhao, C. (2001). Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 484, 71–76.
- Levy, S. B. (2001). Antibacterial Household Products : Cause for Concern. *Emerging Infectious Diseases*, 7(3), 512–515.
- Li, F., Li, H., Hu, L., Kwan, M., Chen, G., He, Q. Y., & Sun, H. (2005). Structure, assembly, and topology of the G185R mutant of the fourth transmembrane domain of divalent metal transporter. *Journal of the American Chemical Society*, 127(5), 1414–1423.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–15.
- Lin, R., & Cui, H. (2015). Supramolecular nanostructures as drug carriers. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 7, 75–83.
- Linge, J. P., & Nilges, M. (1999). Influence of non-bonded parameters on the quality of NMR structures: a new force field for NMR structure calculation. *Journal of Biomolecular NMR*, 13(1), 51–9.
- Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., & Lindon, J. C. (1998). Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 132(1), 125–129.
- Löfgren, S. E. (2007). *Atividades antimicrobiana , antiparasitária e hemolítica de peptídeos antimicrobianos isolados de animais aquáticos*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.
- López-Abarrategui, C., Alba, A., Silva, O. N., Reyes-Acosta, O., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., ... Otero-González, A. J. (2012). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*, 94(4), 968–74.
- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., ... Tangy, F. (2005). The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. *Virology*, 334(2), 264–75.
- Lucas, L. H., & Larive, C. K. (2004). Measuring ligand-protein binding using NMR diffusion experiments. *Concepts in Magnetic Resonance*, 20A(1), 24–41.

- Mahalka, A. K., & Kinnunen, P. K. J. (2009). Binding of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides to lipid membranes: lessons from temporins B and L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(8), 1600–9.
- Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R., & Bax, A. (1989). Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *Journal of Magnetic Resonance* (1969), 85(2), 393–399.
- Maurer, R., Gaehwiler, B. H., Buescher, H. H., Hill, R. C., & Roemer, D. (1982). Opiate antagonistic properties of an octapeptide somatostatin analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(15), 4815–4817.
- Menzel, L. P., Hee, I., Sjostrand, B., & Lehrer, R. I. (2002). Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 26, 505–515.
- Mills, R. (1973). Self-diffusion in normal and heavy water in the range 1-45.deg. *Journal of Physical Chemistry*, 77(5), 685–688.
- Moreau, V. H., da Silva, A. C., Siloto, R. M. P., Valente, A. P., Leite, A., & Almeida, F. C. L. (2004). The bZIP region of the plant transcription factor opaque-2 forms stable homodimers in solution and retains its helical structure upon subunit dissociation. *Biochemistry*, 43(16), 4862–8.
- Morris, K. F., & Charles S. Johnson, J. (1992). Diffusion-Ordered Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *American Chemical Society*, 114(8), 3139–3141.
- Murphy, J. B., & Kies, M. W. (1960). Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45(1960), 382–384.
- Nabuurs, S. B., Spronk, C. a E. M., Krieger, E., Maassen, H., Vriend, G., & Vuister, G. W. (2003). Quantitative evaluation of experimental NMR restraints. *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), 12026–34.
- Nabuurs, S. B., Spronk, C. a. E. M., Vriend, G., & Vuister, G. W. (2004). Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation. *Concepts in Magnetic Resonance*, 22A(2), 90–105.
- Nascimento, A. C., Fontes, W., Sebben, A., & Castro, M. (2003). Antimicrobial Peptides from Anurans Skin Secretions. *Protein & Peptide Letters*, 10(3), 227–238.
- Neer, R. M., Arnaud, C. D., Zanchetta, J. R., Prince, R., Gaich, G. A., Reginster, J.-Y., ... Mitlak, B. H. (2001). Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 344(19), 1434–1441.
- NELSON, David L.; COX, M. M. (2011). *Principles of Biochemistry*. (Artmed, Ed.) (Quinta edi.). Porto alegre.

- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 464–72.
- Nicholls, P. (2000). Introduction: the biology of the water molecule. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(7), 987–992.
- Nicolas, P. (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *The FEBS Journal*, 276(22), 6483–96.
- Olmez, E. O., & Akbulut, B. S. (2012). *Protein-Peptide Interactions Revolutionize Drug Development*. (K. Abdelmohsen, Ed.). Rijeka, Croatia: InTech.
- Oremusova, J., & Lengyel, A. (2007). Critical Micelle Concentration of Ionic.
- Oren, Z., & Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47(6), 451–63.
- Orfi, L., Lin, M., & Larive, C. K. (1998). Measurement of SDS Micelle-Peptide Association Using (1)H NMR Chemical Shift Analysis and Pulsed-Field Gradient NMR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 70(7), 1339–45.
- Oyston, P. C. F., Fox, M. a, Richards, S. J., & Clark, G. C. (2009). Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 8), 977–87.
- Papo, N., & Shai, Y. (2003). Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*, 24(11), 1693–703.
- Pathan, F. K., Venkata, D. A., & Panguluri, S. K. (2010). Recent Patents on Antimicrobial Peptides. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 4(1), 10–16.
- Peptide, H. A., Wildman, K. A. H., Lee, D., & Ramamoorthy, A. (2003). Mechanism of Lipid Bilayer Disruption by the, 6545–6558.
- Phillips, D. R., & Scarborough, R. M. (1997). Clinical pharmacology of eptifibatide. *American Journal of Cardiology*, 80(4 A), 11–20.
- Poole, K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 500–508.
- Pukala, T. L., Bowie, J. H., Maselli, V. M., Musgrave, I. F., & Tyler, M. J. (2006). Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural Product Reports*, 23(3), 368–93.
- Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Carver, J. A., & Bowie, J. H. (2004). Investigating the Importance of the Flexible Hinge in Caerin 1 . 1 : Solution Structures and Activity of Two Synthetically Modified Caerin Peptides. *Biochemistry*, 43(4), 937–944.

- Quattrocchi, E., & Kourlas, H. (2004). Teriparatide: A review. *Clinical Therapeutics*, 26(6), 841–854.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95–99.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536–47.
- Riethmüller-Winzen, H., Prothmann, A., Reissmann, T., Peukert, M., & Engel, J. (2000). Safety aspects of the LHRH antagonist cetrorelix (cetrotide®). *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 70(1), A97.
- Rinaldi, A. C. (2002). Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 799–804.
- Rocha, E., & Panizo, C. (2001). Inhibidores directos de la trombina: su papel en el tratamiento de la trombosis arterial y venosa. *Medicina Clínica*, 116(2), 63–74.
- Sanderson, J. M. (2005). Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(2), 201–12.
- Sato, H., & Feix, J. B. (2006). Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1245–56.
- Saúde, A. C. M. (2012). *O uso da clavanina A nanoestruturada no controle da sepse polimicrobiana*. Universidade Católica de Brasília.
- Schanda, P., & Brutscher, B. (2005). Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *Journal of the American Chemical Society*, 127(22), 8014–5.
- Schiffer, M., & Edmundson, a B. (1967). Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophysical Journal*, 7(2), 121–35.
- Schwieters, C. D., Kuszewski, J. J., Tjandra, N., & Marius Clore, G. (2003). The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *Journal of Magnetic Resonance*, 160(1), 65–73.
- Schwieters, C., Kuszewski, J., & Mariusclore, G. (2006). Using Xplor–NIH for NMR molecular structure determination. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 48(1), 47–62.
- Seo, M.-D., Won, H.-S., Kim, J.-H., Mishig-Ochir, T., & Lee, B.-J. (2012). Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(10), 12276–86.

- Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., & Bax, A. (2009). TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*, 44(4), 213–23.
- Silva, O. N., Alves, E. S. F., de la Fuente-Núñez, C., Ribeiro, S. M., Mandal, S. M., Gaspar, D., ... Franco, O. L. (2016). Structural Studies of a Lipid-Binding Peptide from Tunicate Hemocytes with Anti-Biofilm Activity. *Scientific Reports*, 6(May), 27128.
- Silvestro, L., Weiser, J. N., & Axelsen, P. H. (2000). Antibacterial and Antimembrane Activities of Cecropin A in Escherichia coli These include: Antibacterial and Antimembrane Activities of Cecropin A in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3).
- Snell, N. J. C. (2003). Examining unmet needs in infectious disease. *Drug Discovery Today*, 8(1), 22–30.
- Souza, A. A. De, & Laverde Jr., A. (2002). Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Química Nova*, 25(6a), 1022–1026.
- Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H., Styrvold, O. B., Li, C., & Stensvåg, K. (2011). Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology Advances*, 29(5), 519–530.
- Spronk, C. A. E. M., Linge, J. P., Hilbers, C. W., & Vuister, G. W. (2002). Improving the quality of protein structures derived by NMR spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*, 22(3), 281–9.
- Spronk, C. A. E. M., Nabuurs, S. B., Krieger, E., Vriend, G., & Vuister, G. W. (2004). Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 45(3-4), 315–337.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y., & Woody, R. W. (2001). Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. *Analytical Biochemistry*, 299(2), 271–4.
- Srinivasan, A., Lopez-ribot, J. L., & Ramasubramanian, A. K. (2014). Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 65–71.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., & Bennich, H. (1981). Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect. *The Journal of Immunology*, 16(292), 246–248.
- Suttmann, H., Retz, M., Paulsen, F., Harder, J., Zwergel, U., Kamradt, J., ... Lehmann, J. (2008). Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urology*, 8(1), 5.

- Thennarasu, S., Lee, D.-K., Tan, A., Prasad Kari, U., & Ramamoorthy, A. (2005). Antimicrobial activity and membrane selective interactions of a synthetic lipopeptide MSI-843. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711(1), 49–58.
- Troll, W., & Cannan, R. K. (1953). A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Uhlig, T., Kyprianou, T., Giancarlo, F., Alberto, C., Heiligers, D., Hills, D., ... Verhaert, P. (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EUPROT*, 4, 58–69.
- Usadi, R. S., & Merriam, K. S. (2015). On-label and off-label drug use in the treatment of female infertility. *Fertility and Sterility*, 103(3), 583–594.
- Vaara, M. (1992). Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. *Micobiological Reviews*, 56(3), 395–411.
- Valcarcel, C. a, Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., ... Menestrina, G. (2001). Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytic proteins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal*, 80(6), 2761–74.
- Van Kan, E. J. M., Demel, R. A., Breukink, E., van der Bent, A., & de Kruijff, B. (2002). Clavanin Permeabilizes Target Membranes via Two Distinctly Different pH-Dependent Mechanisms. *Biochemistry*, 41(24), 7529–7539.
- Van Kan, E. J. M., van der Bent, A., Demel, R. A., & de Kruijff, B. (2001). Membrane Activity of the Peptide Antibiotic Clavanin and the Importance of Its Glycine Residues. *Biochemistry*, 40(21), 6398–6405.
- VanCompernelle, S. E., Taylor, R. J., Oswald-Richter, K., Jiang, J., Youree, B. E., Bowie, J. H., ... Unutmaz, D. (2005). Antimicrobial peptides from amphibian skin potentially inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells. *Journal of Virology*, 79(18), 11598–606.
- Veglia, G., & Ramamoorthy, A. (2010). Special issue on “membrane protein dynamics: correlating structure to function”. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(2), 65–7.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, 15(1-2), 40–56.
- Vranken, W. F. (2014). NMR structure validation in relation to dynamics and structure determination. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 82, 27–38.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics*, 8(1), 52–56.

- Wang, T., Zhang, J., Shen, J.-H., Jin, Y., Lee, W.-H., & Zhang, Y. (2005). Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(3), 945–51.
- Wider, G., & Wüthrich, K. (1999). NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. *Current Opinion in Structural Biology*.
- Wishart, D. S., & Nip, A. M. (1998). Protein chemical shift analysis: a practical guide. *Biochemistry and Cell Biology*, 76(2-3), 153–163.
- Wishart, D. S., & Sykes, B. D. (1994). The ¹³C Chemical-Shift Index : A simple method for the identification of protein secondary structure using. *Journal of Biomolecular NMR*, 4, 171–180.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D., & Richards, F. M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31(6), 1647–1651.
- Wood, A. J. J., Lamberts, S. W. J., van der Lely, A.-J., de Herder, W. W., & Hofland, L. J. (1996). Octreotide. *New England Journal of Medicine*, 334(4), 246–254.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. (J. W. e Sons, Ed.). New York.
- Xia, B., Tsui, V., Case, D. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2002). Comparison of protein solution structures refined by molecular dynamics simulation in vacuum, with a generalized Born model, and with explicit water. *Journal of Biomolecular NMR*, 22(4), 317–31.
- Yao, J., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (1997). Chemical shift dispersion and secondary structure prediction in unfolded and partly folded proteins. *FEBS Letters*, 419(2-3), 285–289.
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance, 55(1), 27–55.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(15), 5449–5453.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(2002), 389–395.
- Zelezetsky, I., & Tossi, A. (2006). Alpha-helical antimicrobial peptides--using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758(9), 1436–49.
- Zervou, M., Cournia, Z., Potamitis, C., Patargias, G., Durdagi, S., Grdadolnik, S. G., & Mavromoustakos, T. (2014). Insights into the molecular basis of action of the AT1

antagonist losartan using a combined NMR spectroscopy and computational approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(3), 1031–46.

Zhang, J., Qu, X., Covarrubias, M., & Germann, M. W. (2013). Insight into the modulation of Shaw2 Kv channels by general anesthetics: structural and functional studies of S4-S5 linker and S6 C-terminal peptides in micelles by NMR. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(2), 595–601.

Zick, K. (2009). *Diffusion NMR User Manual*. Germany.

Anexos

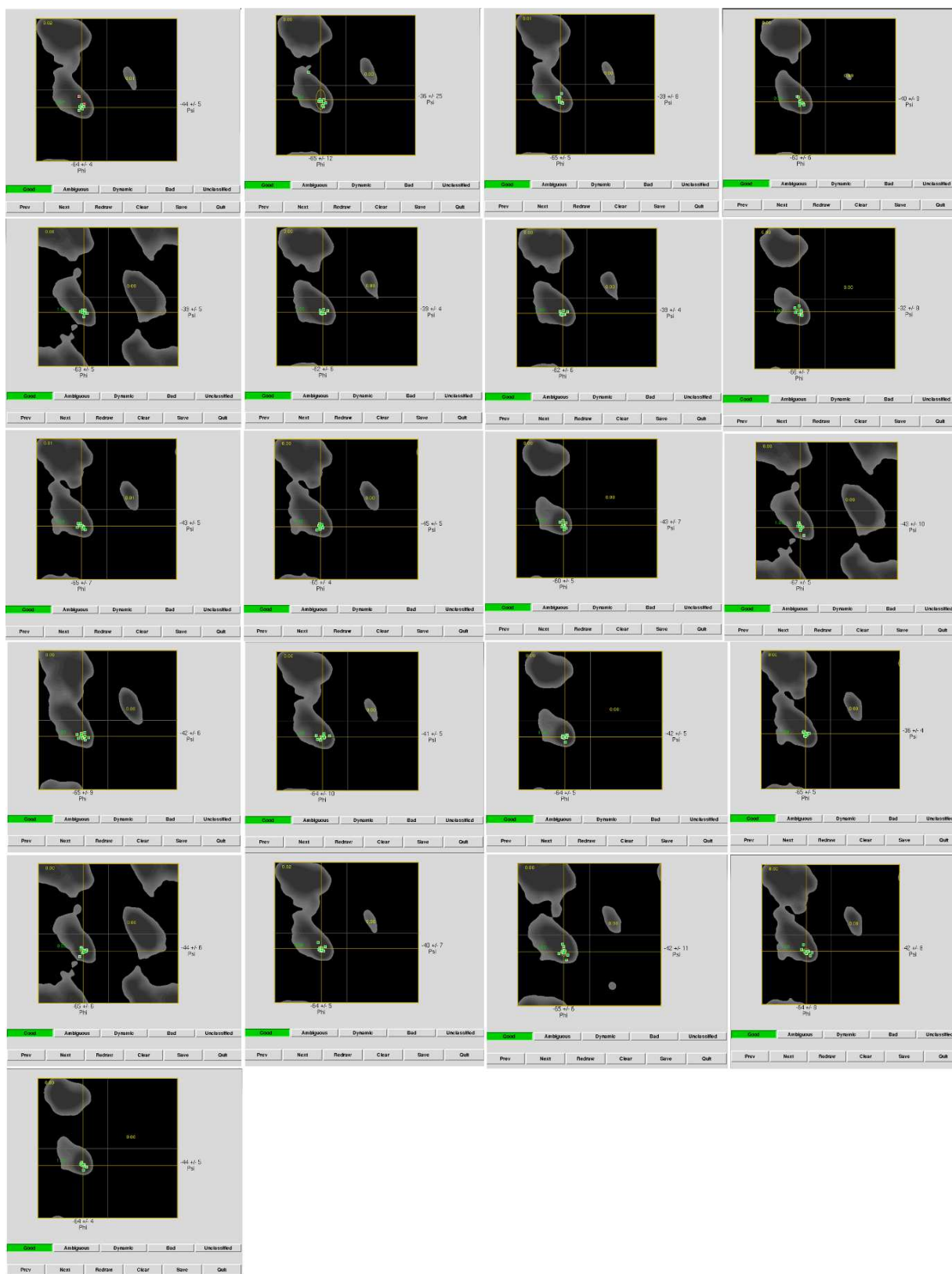
Anexo 1. Tabela de deslocamentos químicos (^1H , ^{13}C , ^{15}N) para o peptídeo clavanina A. Solução de 2 mM do peptídeo em TFE- d_3 : H_2O 35:65 (v/v), 10% D_2O , pH 4,3 e 25 °C A.

a.a	H_N	H_α	$\text{H}_{\beta 1}/\text{H}_{\beta 2}$	H_γ	H_δ	H_ϵ	C_α	C_β	N
1 V	8,63	3,77	2,19	0,86 1,00	-	-	74,84	-	-
2 F	7,3	4,71	3,05 3,32	-	7,3	7,39	58,94	-	120,,27
3 Q	8,74	4,17	1,97 1,99	2,25 2,26	-	7,34 6,79	58,67	-	118,70
4 F	7,47	4,57	3,11 3,12	-	7,24	7,34	58,61	-	121,72
5 L	7,55	4,12	1,64 1,65	1,65	0,92 0,98	-	58,68	-	117,45
6 G	8,08	3,78 3,86	-	-	-	-	60,30	-	110,33
7 K	7,74	4,20	1,97 1,99	1,48	1,65 1,73	2,98 2,99	64,50	-	118,91
8 I	7,71	3,87	2,11	0,93 1,18	0,87	-	64,50	-	119,24
9 I	8,44	3,78	1,96	0,94 1,23	0,89	-	63,50	-	117,49
10 H	8,15	4,42	3,32 3,31	-	7,29	8,53	59,64	29,32	119,25
11 H	8,20	4,55	3,41 3,53	-	7,15	8,48	58,39	41,16	116,84
12 V	8,65	3,83	2,21	0,99 1,10	-	-	73,12	-	118,09
13 G	8,61	3,80 3,89	-	-	-	-	47,99	-	111,40
14 N	8,00	4,57	2,77 2,81	-	6,73 7,45	-	56,46	39,53	118,80
15 F	8,11	4,43	3,10 3,30	-	7,22	7,33	61,36	40,32	118,08
16 V	8,50	3,73	2,12	0,92 1,07	-	-	66,52	-	118,60
17 H	8,28	4,54	3,31 3,32	-	7,32	-	58,52	29,33	117,82
18 G	8,09	3,91	-	-	-	-	47,10	-	112,45
19 F	8,21	4,42	2,91 3,07	-	7,15	7,21	60,45	40,18	118,93
20 S	8,12	4,26	3,91	-	-	-	60,80	67,08	115,74
21 H	8,07	4,67	3,15 3,11	-	7,22	8,52 8,53	57,40	29,51	119,17
22 V	7,81	3,90	1,84	0,60	-	-	66,91	-	118,89
23 F	7,86	4,57	2,99 2,74		7,17	7,25	59,63	40,62	118,08

Anexo 2. Tabela de predição do ângulo diedro gerado pelo programa TALOS+ para o peptídeo clavanina A. Solução de 2 mM do peptídeo em TFE-*d*₃:H₂O 35:65 (v/v), 10% D₂O, pH 4,3 e 25 °C A.

Resíduo	PHI	PSI	Predição	Estrutura 2°
1 V	9999,000	9999,000	Nenhuma	
2 F	-64,054	-39,869	Boa	α-hélice
3 Q	-64,525	-37,542	Boa	α-hélice
4 F	-64,856	-39,346	Boa	α-hélice
5 L	-62,779	-39,971	Boa	α-hélice
6 G	-63,474	-38,775	Boa	α-hélice
7 K	-61,872	-39,385	Boa	α-hélice
8 I	-73,258	-41,419	Boa	α-hélice
9 I	-66,065	-32,263	Boa	α-hélice
10 H	-65,391	-43,301	Boa	α-hélice
11 H	-65,114	-45,068	Boa	α-hélice
12 V	-59,544	-43,502	Boa	α-hélice
13 G	-66,907	-42,479	Boa	α-hélice
14 N	-65,335	-41,721	Boa	α-hélice
15 F	-64,293	-41,038	Boa	α-hélice
16 V	-64,053	-42,472	Boa	α-hélice
17 H	-64,723	-36,122	Boa	α-hélice
18 G	-64,791	-43,817	Boa	α-hélice
19 F	-64,287	-40,485	Boa	α-hélice
20 S	-64,933	-42,358	Boa	α-hélice
21 H	-63,532	-42,402	Boa	α-hélice
22 V	-64,079	-43,871	Boa	α-hélice
23 F	9999,000	9999,000	Nenhuma	

Anexo 3. Interface gráfica do programa TALOS+, diagrama de Ramachandran com dispersão dos ângulos ϕ e ψ . Solução de 2 mM do peptídeo em TFE- d_3 :H₂O 35:65 (v/v), 10% D₂O, pH 4,3 e 25 °C A.



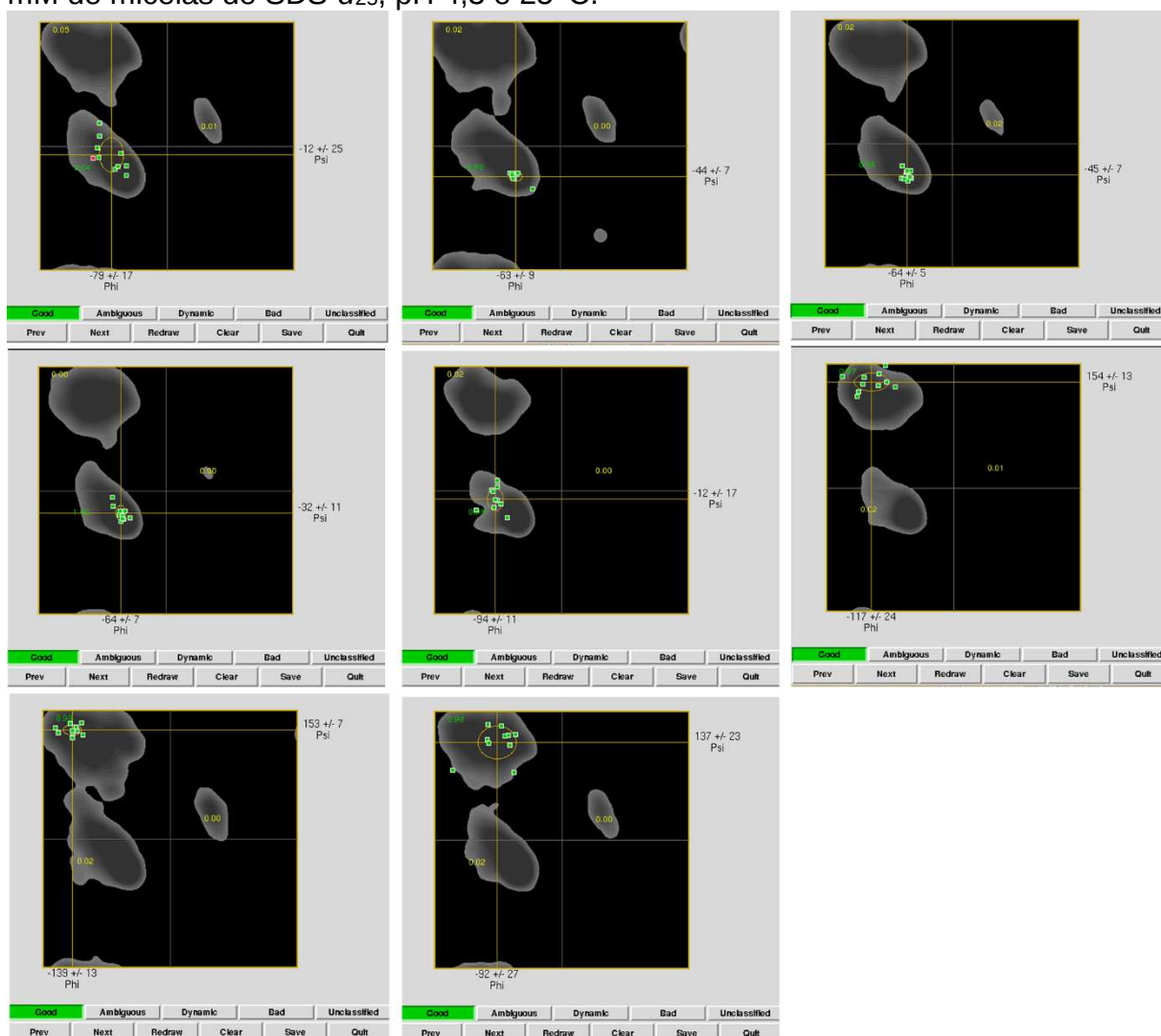
Anexo 4. Tabela de deslocamentos químicos (^1H , ^{13}C , ^{15}N) para o peptídeo *Cm-p1*. Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.

a.a	H _N	H _α	H _{β1} /H _{β2}	H _γ	H _δ	H _ε	C _α	C _β	N
1 S	-	4,27	4,06	-	-	-	57,39	63,23	-
2 R	8,67	4,44	1,88 1,90	1,72	3,2	-	56,80	-	119,80
3 S	8,04	4,35	3,89	-	-	-	56,36	63,59	116,92
4 E	8,04	4,35	2,11 2,03	2,43	-	-	59,29	28,66	119,16
5 L	8,02	4,25	1,69	1,61	0,93 0,86	-	56,37	37,57	119,71
6 I	7,69	4,13	1,91	1,44 1,17	0,85	-	61,35	38,73	117,79
7 V	7,77	4,04	2,07	0,85	-	-	62,63	47,45	119,38
8 H	8,04	4,68	3,21	7,39	7,39	8,66	-	43,59	118,94
9 Q	8,19	4,36	1,99	2,12 2,35	-	7,49 6,78	56,17	29,77	119,17
10 R	8,14	4,27	1,79 1,93	1,67 1,69	3,19	7,11	56,39	28,91	121,24

Anexo 5. Tabela de predição do ângulo diedro gerado pelo programa TALOS+ para o peptídeo *Cm-p1*. Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅, pH 4,3 e 25 °C.

Resíduo	PHI	PSI	Predição	Estrutura
1 S	9999,000		Nenhuma	
2 R	-81,988	-13,232	Boa	
3 S	-63,232	-44,240	Boa	α-hélice
4 E	-64,111	-45,018	Boa	α-hélice
5 L	-63,839	-32,422	Boa	α-hélice
6 I	-94,278	-11,625	Boa	α-hélice
7 V	-117,203	154,025	Boa	β-folha
8 H	-139,341	152,770	Boa	β-folha
9 Q	-90,989	137,069	Boa	β-folha
10 R	9999,000	9999,000	Nenhuma	

Anexo 6. Interface gráfica do programa TALOS+, diagrama de Ramachandran com dispersão dos ângulos ϕ e ψ . Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C.



Anexo 7. Tabela de deslocamentos químicos (^1H , ^{13}C , ^{15}N) para o peptídeo $[\text{Phe}^3]\text{Cm-p1}$. Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS- d_{25} , pH 4,3 e 25 °C

a.a	H_N	H_α	$\text{H}_{\beta 1}/\text{H}_{\beta 2}$	H_γ	H_δ	H_ϵ	C_α	C_β	C_δ	C_γ
1 S	7,63	4,14	3,97	—	—	—	62,54	63,37	—	—
2 R	8,52	4,19	1,97 1,81	1,52 1,47	3,13	7,12	56,62	30,53	43,59	
3 P	7,92	4,34	3,09 3,05	—	7,32	7,69	59,96	39,13	—	—
4 E	8,04	3,78	2,07	2,48 2,36	—	—	58,78	29,19	—	32,98
5 L	7,69	4,11	1,81 1,71	—	0,86 0,91	—	57,91	41,86	23,91 24,69	—
6 I	7,55	3,83	1,93	1,64 1,24	0,87	—	64,34	38,15	—	—
7 V	7,75	3,95	1,90	0,89 0,82	—	—	63,39	31,35	—	22,00 21,30
8 H	7,99	4,53	3,30 3,25	—	7,35	8,63	57,26	28,33	—	—
9 Q	8,07	4,23	2,16 2,07	2,44	—	—	57,30	28,41	—	33,21
10 R	7,84	4,2	1,92 1,85	1,71	3,17	7,19	56,28	36,14	43,25	27,22

Anexo 8. Tabela de predição do ângulo diedro gerado pelo programa TALOS+ para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅, pH 4,3 e 25 °C

Resíduo	PHI	PSI	Predição	Estrutura
1 S	9999,000		Nenhuma	
2 R	-64.679	-35.051	Boa	α-hélice
3 S	-64.391	-36.684	Boa	α-hélice
4 E	-65.776	-38.570	Boa	α-hélice
5 L	-63.350	-40.353	Boa	α-hélice
6 I	-73.099	-43.809	Boa	α-hélice
7 V	-66.805	-34.178	Boa	α-hélice
8 H	-65.173	-31.995	Boa	α-hélice
9 Q	-67.113	-31.797	Boa	
10 R	9999,000	9999,000	Nenhuma	

Anexo 9. Interface gráfica do programa TALOS+, diagrama de Ramachandran com dispersão dos ângulos ϕ e ψ para o peptídeo [Phe³]Cm-p1. Solução de 1 mM do peptídeo em solução micelar de 100 mM de micelas de SDS-*d*₂₅, pH 4,3 e 25 °C

