

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Breno Pires de Andrade Barbosa

**Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos
Homotarsinina e LyeTx I mnΔK Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas
Fosfolipídicas**

Belo Horizonte
2016

UFMG/ICE_x/DQ. 1152^a

D. 637^a

Breno Pires de Andrade Barbosa

**Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos
Homotarsinina e LyeTx I mnΔK Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas
Fosfolipídicas**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Química – Físico-Química

Belo Horizonte

2016

A531e Andrade Barbosa, Breno Pires de.
2016 Estudos por ressonância magnética nuclear das estruturas
D dos peptídeos homotarsinina e LyeTx I mnΔK Ac e do
Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolipídicas
[manuscrito] / Breno Pires de Andrade Barbosa . 2016.
xiv, 72 f. : il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Físico-química - Teses 2. Ressonância magnética
nuclear- Teses 3. Peptídeos - Teses 4. Produtos de ação
antimicrobiana- Teses 5. Peptídeos-Síntese-Teses I.
Resende, Jarbas Magalhães Orientador II. Título.

CDU 043

"Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos Homotarsinina e LyeTx I mn Δ K Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolipídicas"

Breno Pires de Andrade Barbosa


Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador
UFMG



Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG



Profa. Denize Cristina Favaro
UFMG

Belo Horizonte, 31 de maio de 2016.

RESUMO

Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos Homotarsinina e LyeTx I mnΔK Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolipídicas

Os estudos sobre peptídeos antibacterianos tem mostrado um grande potencial dessas espécies em substituir vários antibióticos no combate às superbactérias. Os estudos mostram que esse potencial antibacteriano está intimamente ligado à conformação adotada por esses peptídeos, quando em contato com as membranas fosfolipídicas das bactérias.

Esse trabalho é dividido em três diferentes capítulos. A necessidade de meios biomiméticos orientados magneticamente para estudos de RMN trouxe um novo desafio em relação à orientação de bicelas fosfolipídicas. Isso levou à busca por dados, inexistentes na literatura, da dependência temporal da orientação das bicelas em diferentes campos.

O segundo capítulo mostra estudos da topologia do peptídeo homodimérico homotarsinina, originalmente isolado da secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa tarsius*, quando esse se encontra ligado a meios que visam mimetizar as membranas celulares de bactérias. Esses estudos topológicos, realizados por meio da ressonância magnética nuclear, buscam a determinação da orientação relativa entre as cadeias na estrutura do dímero em ambiente de membrana.

A última parte deste trabalho mostra os resultados obtidos por ressonância magnética nuclear e cálculos computacionais sobre a estruturação do peptídeo antibacteriano LyeTx I mnΔK Ac, que foi obtido por modificações químicas na estrutura primária do peptídeo nativo, LyeTx I, originalmente isolado do veneno do aracnídeo *Lycosa erythrognatha*.

PALAVRAS CHAVE: RMN, Peptídeos Antimicrobianos, Interação peptídeo-membrana, Peptídeos Diméricos, Bicelas Fosfolipídicas

ABSTRACT

Nuclear Magnetic Resonance structural studies of the peptides Homotarsinin and LyeTx I mnΔK Ac and of the Magnetic Alignment of Phospholipid Bicelles

The study of antibacterial peptides has shown a great potential to substitute a great number of different antibiotics in the fight against super bacteria. Several studies show that the antibacterial activity is intrinsically linked to the conformation adopted by these peptides when in contact with bacteria phospholipid membranes.

This work is divided in three different chapters. The necessity of magnetically oriented biomimetic media for this study brought a new challenge in relation to the orientation of bicelles. This led to the search for new data about the time dependence orientation of bicelles exposed to magnetic fields of different magnitudes.

The second chapter covers the topological study of the homodimeric peptide homotarsinin, originally isolated from the skin secretion of the tree frog *Phyllomedusa tarsius*, when bound to media that mimics bacterial cellular membranes. These topological studies were performed in membrane environments by nuclear magnetic resonance and they look to elucidate the relative orientation adopted by the two chains within the homodimer structure.

The last part of this work shows the results obtained by nuclear magnetic resonance and computational calculations about the structure of the antibacterial peptide LyeTx I mnΔK Ac, which was obtained by chemical modifications of the wild type peptide LyeTx I, originally isolated from the venom of the arachnid *Lycosa erythrognatha*.

KEY WORDS: NMR, Antimicrobial peptides, Peptide-Membrane interaction, Dimeric Peptides, Phospholipid Bicelles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-1 - Representação esquemática de meios biomiméticos de membranas. A: Micela. B: Vesícula. C: Bicela. Adaptada de (BECHINGER, RESENDE e AISENBREY, 2011). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).	2
Figura 1-2 - Quadro de exemplos das espécies lipídicas utilizadas como meios biomiméticos	3
Figura 1-3 - Espectros de ^2H a 76,77 MHz após um minuto (azul) e após cem minutos (vermelho) de exposição a $B_0 = 11,75$ Tesla. Solução de bicelas de 14- <i>O</i> -PC e de 6- <i>O</i> -PC ($q = 3$) a 5% m/m em H_2O e D_2O (95:5), $T = 316$ K.....	7
Figura 1-4 - Gráfico da evolução temporal do desdobramento quadrupolar do deutério em diferentes campos magnéticos. Solução de bicelas de 14- <i>O</i> -PC e de 6- <i>O</i> -PC ($q = 3$) a 5% m/m em H_2O e D_2O (95:5), $T = 316$ K.....	7
Figura 1-5 - Seção inicial do gráfico da evolução temporal do desdobramento quadrupolar do deutério em diferentes campos magnéticos. Solução de bicelas de 14- <i>O</i> -PC e de 6- <i>O</i> -PC ($q = 3$) a 5% m/m em H_2O e D_2O (95:5), $T = 316$ K.....	8
Figura 2-1 - Bicamada fosfolipídica. Adaptada de https://pt.wikipedia.org/wiki/Lipossoma ..	12
Figura 2-2 - O mecanismo de ação de peptídeos formadores de barris e de poros toroidais. Figura retirada de Sato e Feix (2006). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).	13
Figura 2-3 - O mecanismo de ação de peptídeos com ação do tipo tapete. Figura retirada de Sato e Feix (2006). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).	14
Figura 2-4 - TUMULTY, James. <i>Phyllomedusa tarsius</i> fotografia retirada de https://jamestumulty.files.wordpress.com/2010/02/img_1666.jpg	15
Figura 2-5 - Quadro com as sequências da cadeia monomérica da homotarsinina (Htr-M) e com o homodímero (Htr).....	15
Figura 2-6 - Exemplos de resinas utilizadas para a SPFS. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000).....	16
Figura 2-7 - Mecanismo de formação do Fmoc-aminoácido ativado. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000).....	17
Figura 2-8 - Mecanismo da reação de acoplamento de Fmoc-aminoácido. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000).....	18
Figura 2-9 - Grupo Fmoc.....	18
Figura 2-10 - Mecanismo da etapa de desproteção. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)...	19

Figura 2-11 - Esquema da SPFS. Adaptada de (WILKEN e KENT, 1998).....	20
Figura 2-12 - Esquema reacional do teste de Kaiser. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000).....	21
Figura 2-13 - Quadro com aminoácidos protegidos	25
Figura 2-14 - Esquema da síntese de cadeias peptídicas pela metodologia Fmoc	26
Figura 2-15 - Marcações isotópicas de ^{13}C e ^{15}N nos peptídeos Htr-M I e II.....	27
Figura 2-16 - Gradiente utilizado para traçar o perfil da Htr-M. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA, enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA.....	28
Figura 2-17 - Gradiente utilizado para a purificação da Htr-M. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA, enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA.....	28
Figura 2-18 - Gradiente utilizado para a purificação da Htr. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA.....	29
Figura 2-19 - Perfil cromatográfico analítico da síntese de Htr-M I obtido com o uso de coluna GRACE C_{18} 5 μm , 4,6mmx250mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-16.	33
Figura 2-20 - Cromatograma da purificação do peptídeo Htr-M I obtido com o uso de coluna WATERS C_{18} 10 μm , 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-17.....	33
Figura 2-21 - Cromatograma da purificação do peptídeo Htr-M II obtido com o uso de coluna WATERS C_{18} 10 μm , 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-17.....	34
Figura 2-22 - Espectro de massas (MALDI) da amostra purificada da síntese da Htr-M I de em condições semi-preparativas.....	34
Figura 2-23 - Espectro de massas (MALDI) da amostra purificada da síntese da Htr-M II de em condições semi-preparativas.....	35
Figura 2-24 - Cromatograma de purificação da Htr I obtido com o uso de coluna WATERS C_{18} 10 μm , 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-18.	35
Figura 2-25 - Cromatograma da purificação da Htr II obtido com o uso de coluna WATERS C_{18} 10 μm , 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-18.	36
Figura 2-26 - Seção do mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC <i>sofast</i> a 100 μM da Htr II $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5), 43 °C, 800 MHz mostrando a correlação do resíduo Leu-2.....	37
Figura 2-27 - Seção do mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC <i>sofast</i> a 100 μM da Htr II em solução 2% de bicelas e $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5), 43 °C, 800 MHz mostrando a correlação do	

resíduo Leu-2 em solução, à esquerda, e interagindo com a bicela fosfolipídica, à direita.	37
Figura 2-28 - Estrutura em super-hélice da Htr em solução aquosa. Figura retirada de (VERLY, 2010).	38
Figura 2-29 - Estrutura tridimensional da cadeia monomérica da Htr em solução micelar de DPC- <i>d</i> ₃₈ . Figura retirada de (VERLY, 2010).	40
Figura 2-30 - Sequência de pulso para o experimento CP REDOR utilizada	41
Figura 2-31 - Espectro de ¹³ C da Htr-I em vesículas (POPC:POPG 3:1), na proporção lipídeo: peptídeo 17:1, a 4 °C e MAS a 7kHz, obtido a partir do experimento CPREDOR em 175 MHz.	42
Figura 2-32 - Otimização do número de pulsos de refocalização do experimento CPREDOR a partir de espectros de ¹³ C da Htr-I em vesículas (POPC:POPG 3:1), na proporção lipídeo: peptídeo 17:1, a 4 °C e MAS a 7kHz, em 175 MHz	43
Figura 3-1 - <i>Lycosa erythrognatha</i> , fotografia retirada de http://npabombeiro.blogspot.com.br/2015/07/conheca-aranha-de-grama-lycosa.html ...	45
Figura 3-2 - Quadro com as sequências de resíduos de aminoácidos de LyeTx I e LyeTx I mnΔK Ac	46
Figura 3-3 - Representação das correlações típicas de estruturas do tipo α-hélice	47
Figura 3-4 - Seção do mapa de contornos ¹ H- ¹³ C HSQC referente a algumas correlações CαHα para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20mmol.L ⁻¹).	50
Figura 3-5 - Seção mapa de contornos ¹ H- ¹⁵ N HMQC <i>sofast</i> referente a algumas correlações para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20mmol.L ⁻¹).	51
Figura 3-6 - Seção mapa de contornos NOESY mostrando correlações do tipo H _N H _N para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L ⁻¹).	52
Figura 3-7 - Seção mapa de contornos NOESY mostrando, principalmente, correlações do tipo H _α H _N (i, i+4) para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L ⁻¹).	53
Figura 3-8 - Seção mapa de contornos TOCSY mostrando, principalmente, correlações do tipo H _α H _N para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L ⁻¹).	54

- Figura 3-9 - Correlações de *NOE* características de estrutura secundária obtidas a partir da análise do mapa de contornos NOESY do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-*d*₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). As linhas finas correspondem a restrições de distância fracas (entre 5,0 e 1,8 Å), as linhas com larguras intermediárias a restrições de distância médias (entre 3,4 e 1,8 Å) e as linhas grossas a restrições de distância fortes (entre 2,8 e 1,8 Å),55
- Figura 3-10 - Resultados obtidos pelo *software* TALOS+ para o peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-*d*₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). Os resíduos marcados em verde indicam boa qualidade das restrições de ângulo diedro obtidas e a não existência de ambiguidade de deslocamentos químicos para todos os resíduos entre o Trp-2 e a Lys-15. Na parte superior a curva em verde conecta os valores de RCI – S² para os resíduos e na parte inferior são apresentados os valores de CSI para os resíduos de aminoácidos em vermelho.56
- Figura 3-11 - Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-*d*₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). "Regiões mais favoráveis" em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" em bege e "regiões proibidas" em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI, RULLMANN, *et al.*, 1996)57
- Figura 3-12 - Resultados obtidos para a LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-*d*₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). As cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos estão representadas em azul e as dos resíduos hidrofílicos estão representadas em verdes. (A) Conjunto das dez estruturas de menor energia evidenciando a face de caráter mais hidrofóbico. A fração C-terminal aponta para a parte inferior da Figura. (B) Estrutura de menor energia do peptídeo sendo evidenciada no sentido N-terminal para o sentido C-terminal. Nessa representação percebe-se que a cadeia lateral da Ile-1 faz parte da face de caráter mais hidrofílico. (C) Estrutura de menor energia do peptídeo sendo evidenciada no sentido C-terminal para o sentido N-terminal. Nessa representação percebe-se que a cadeia lateral do resíduo de Asn-13 se encontra na face de caráter mais hidrofóbico do peptídeo.....59
- Figura 3-13 - (A) Estrutura de menor energia do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-*d*₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). (B) Estrutura de menor energia do peptídeo LyeTx I a 2,0 mmol.L⁻¹ em solução micelar de DPC-*d*₃₈ 400

mmol.L ⁻¹ e pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L ⁻¹). Os resíduos hidrofílicos estão representados em verde e os hidrofóbicos em azul (VERLY, 2010).	60
Figura 4-1 - Quadro com as informações da síntese do peptídeo Htr-M I	65
Figura 4-2 - Quadro com as informações da síntese do peptídeo Htr-M II.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 9,4 Tesla.....	5
Tabela 1-2 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 11,75 Tesla.....	6
Tabela 1-3 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 18,8 Tesla.....	6
Tabela 1-4 - Tabela com os valores das constantes para a previsão do desdobramento quadrupolar de deutério obtidos para solução de bicelas de 14- <i>O</i> -PC e de 6- <i>O</i> -PC ($q = 3$) a 5% m/m em H ₂ O e D ₂ O (95:5), T = 316 K.....	9
Tabela 3-1 - Tabela sumariando a estatística do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L ⁻¹ em TFE- <i>d</i> ₂ :H ₂ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L ⁻¹). ^a Resultados obtidos com o <i>software</i> MOLMOL. ^b Resultados obtidos com o <i>software</i> TALOS+.	58
Tabela 4-1 - Tabela dos valores de desdobramento quadrupolar de deutério em função do tempo para solução de bicelas de 14- <i>O</i> -PC e de 6- <i>O</i> -PC ($q = 3$) a 5% m/m em H ₂ O e D ₂ O (95:5) em diferentes campos a 316 K.....	61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

14- <i>O</i> -PC	1,2-di- <i>O</i> -tetradecil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
1D	unidimensional
2D	bidimensional
3D	tridimensional
6- <i>O</i> -PC	1,2-di- <i>O</i> -hexil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
AcCN	Acetonitrila, nome usual para etanonitrila
ADP	Base de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
BOC	
CD	Dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CLAE	Cromatografia de alta eficiência
CSI	Índice de deslocamento químico, do inglês <i>chemical shift index</i>
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DLS	Espalhamento de luz dinâmico, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida, nome usual da <i>N,N</i> -dimetilmetanoamida
EDT	Etanoditiol, nome usual de etano-1,2-ditiol
FID	Decaimento de indução livre, do inglês <i>Free Induction Decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMQC	Correlação heteronuclear de múltiplo quantum, do inglês <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazola
HR-MAS	Giro no ângulo mágico com alta resolução, do inglês <i>high resolution magic angle spinning</i>
HSQC	Correlação heteronuclear de simples quantum, do inglês <i>heteronuclear single quantum correlation</i>
Htr	homotarsinina
Htr-M	Cadeia monomérica da homotarsinina
IPA	Álcool isopropílico, nome usual propan-2-ol
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica, do inglês <i>isothermal titration calorimetry</i>

MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matrix, do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
NOE	Efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	Espectroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
Ph	Grupo fenila
PIPE	4-metilpiperidina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
RCI	Índice de estruturação aleatória, do inglês <i>random coil index</i>
RDC	Acoplamento dipolar residual, do inglês <i>residual dipolar coupling</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz quadrada do desvio padrão da média, do inglês, <i>root médium square deviation</i>
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Tri-isopropilsilano
TOCSY	Espectroscopia de correlação total, do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>
Tris.HCl	Cloridrato de 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma, direta, ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desse trabalho.

Ao professor doutor Jarbas Magalhães Resende, pelo companheirismo na empreitada, pela confiança, pela orientação científica sempre necessária e importante, pelo carinho e pelos puxões de orelha, estes mais do que necessários.

À professora doutora Dorila Piló-Veloso, pelo carinho, pelas conversas extra acadêmicas em sua sala e especialmente por suas palavras reconfortantes. Terei sempre orgulho em dizer que fui seu aluno.

Ao professor doutor Rodrigo Moreira Verly, pelas conversas e conselhos científicos sempre bem vindos e muitas vezes mais do que necessário.

Aos companheiros e amigos do LASEP, Carlos Filipe, Karla Gusmão, Marco Wust, Virgílio dos Santos e Lídia Barbosa. Vocês foram essenciais na construção desse trabalho.

Aos companheiros de curso, em especial Rafael César por nossas horas de estudo, de conversa, de viagens, de conselhos, serão sempre lembradas com carinho e Ívina de Paula por nossos desabafos, nossas confissões e por você ter sido uma professora maravilhosa e uma companheira de jornada profissional tão importante para o meu crescimento.

Aos meu amigos do Colégio Bernoulli, especialmente Mariana Assíria pelo companheirismo nas aulas e no mestrado. Míriam Miranda e Fabiano Vaz, vocês sempre serão meus mestres em química, não importa o que digam. Tatiana Munayer, Júnio dos Santos, Tatiana Carvalho e Adriano Guimarães pelo apoio sempre.

À Janaína Rabelo, por nossas conversas nos horários de almoço, por nosso senso de humor idêntico, e pelo nosso companheirismo sempre, seja ele na presença ou na ausência do Rodrigo Ferreira. Vocês são exemplos pra mim.

Às Lucíolas, Amanda Azevedo, Camila Morais, Camila Reis, Maraíza Labanca, Alice Bedê, Tiago Pissolati. Vocês são as pessoas que mais contribuíram e contribuem para o meu crescimento. E por isso serei eternamente grato.

Aos professores Fábio Almeida, Ana Paula Valente, do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear da UFRJ, pelo apoio para a realização desse trabalho.

Aos amigos da UFRJ, Mariana Quezado, Gilson dos Santos e Anderson Pinheiro, pelas longas noites de experimentos no CNRMN, pelas inúmeras ajudas fornecidas, e pela companhia nos quase intermináveis cursos de RMN.

Aos meus grandes amigos há tantos anos, Gustavo Baldin, Mário Aguilar, Renata Lodi, Carolina Lodi, Stefano Semionato, Sarah Mello, Guilherme Drumond, Eduardo Lages, Rainer Couto e Luiz Nogueira. Vocês são a família que eu escolhi pra ter.

À minha família. À minha mãe, Cláudia, pelo afeto, pelo amor, pela compreensão e principalmente pelo apoio. Às minhas avós, Regina e Vera, tão diferentes, tão incomuns, cada uma a sua maneira, e tão amorosas e carinhosas sempre. Aos meus irmãos, Larissa, Daniel e Elisa, vocês são a minha maior alegria, meu maior sorriso, meu maior orgulho.

À equipe do LAREMAR pelo apoio e conversas científicas sempre construtivas.

À professora Mônica Santos do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear pela colaboração indispensável na realização dos experimentos de RMN de estado sólido.

À professora Maria Elena Lima do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e ao seu aluno Joaquim Teixeira de Avelar Júnior cessão do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac para os estudos estruturais, assim como pela realização dos testes biológicos em colaboração com o nosso grupo.

Aos companheiros do programa de pós-graduação em química da UFMG e às secretarias da pós-graduação, sempre tão presentes e solícitas.

Ao departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais e ao CNRMN pela cessão das instalações para que a minha pesquisa pudesse se concretizar.

Por fim aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq, FAPEMIG e CAPES, responsáveis pelo financiamento dos inúmeros projetos de pesquisa nos quais estou envolvido.

Sumário

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	III
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	IX
AGRADECIMENTOS.....	XI
SUMÁRIO.....	XIII
CAPÍTULO 1 ESTUDO DA EVOLUÇÃO TEMPORAL DA ORIENTAÇÃO DE BICELAS	
FOSFOLIPÍDICAS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 Meios biomiméticos.....	1
1.1.2 Acoplamentos dipolares.....	3
1.1.3 Desdobramento quadrupolar	4
1.2 OBJETIVOS	4
1.3 METODOLOGIA.....	4
1.3.1 Preparo da solução de bicelas.....	4
1.3.2 Experimentos de RMN de deutério	5
1.4 RESULTADOS	6
1.5 CONCLUSÕES	9
CAPÍTULO 2 ESTUDO DA TOPOLOGIA DO PEPTÍDEO HOMODIMÉRICO HOMOTARSININA 10	
2.1 INTRODUÇÃO	10
2.1.1 Peptídeos antimicrobianos	10
2.1.2 Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos	11
2.1.3 Peptídeo antimicrobiano Homotarsinina	14
2.1.4 Síntese de peptídeos em fase sólida.....	16
2.1.5 RMN do estado sólido.....	21
2.2 OBJETIVOS	22
2.3 METODOLOGIA.....	22
2.3.1 Síntese da Htr-M.....	22
2.3.2 Purificação da Htr-M.....	27
2.3.3 Síntese da Htr.....	29
2.3.4 Purificação da Htr	29
2.3.5 Preparo das bicelas.....	30

2.3.6 Preparo das vesículas.....	30
2.3.7 Experimentos de RMN em solução	31
2.3.8 Experimentos de RMN do estado sólido	32
2.4 RESULTADOS	32
2.4.1 Síntese dos peptídeos Htr-M I e Htr-M II.....	32
2.4.2 Purificação dos peptídeos Htr-M I e Htr-M II.....	33
2.4.3 Síntese e purificação da Htr I e Htr II.....	35
2.4.5 Experimentos de RMN em solução com a Htr.....	36
2.4.6 Experimentos de RMN do estado sólido	40
2.5 CONCLUSÃO	43
CAPÍTULO 3 ESTUDO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LYETX I MNΔK AC	45
3.1 INTRODUÇÃO	45
3.1.1 Peptídeo antimicrobiano LyeTx mnΔK Ac.....	45
3.1.2 Assinalamento sequencial de ressonâncias de peptídeos por RMN em solução.....	46
3.2 OBJETIVOS	48
3.3 METODOLOGIA.....	48
3.3.1 Preparo da amostra de LyeTx I mn ΔK Ac.....	48
3.3.2 Experimentos de RMN em solução com o peptídeo LyeTx I mnΔK Ac.....	48
3.4 RESULTADOS	49
3.5 CONCLUSÕES	60
CAPÍTULO 4 ANEXOS.....	61
ANEXO A.....	61
ANEXO B.....	64
ANEXO C.....	67
CAPÍTULO 5 BIBLIOGRAFIA.....	69

Capítulo 1 Estudo da evolução temporal da orientação de bicelas fosfolipídicas

1.1 Introdução

1.1.1 Meios biomiméticos

A interação entre moléculas de diferentes naturezas, como peptídeos, proteínas, antibióticos e outras, e organismos vivos, em especial as células desses organismos, é de grande relevância para o avanço de diversas áreas da ciência. Essa interação pode ser estudada por diversas técnicas, entre elas estão, por exemplo, o dicróismo circular (CD), a ressonância magnética nuclear (RMN) e a calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

Como a utilização de células reais poderia tornar as análises mais complexas e laboriosas, faz-se necessária a utilização de meios que mimetizem, da melhor forma possível, as células alvo. Para isso condições como composição química dos lipídeos, pH e temperatura devem ser escolhidas de maneira bem criteriosa.

Devido à natureza anfipática dos lipídeos escolhidos para a formação dos meios biomiméticos, existe uma variedade de estruturas formadas. Moléculas do tipo detergente, como dodecil sulfato de sódio (SDS) e dodecil fosfocolina (DPC) (Figura 1-2), possuem um formato cônico, isso é, a seção transversal da parte lipofílica é menor do que a da parte hidrofílica, desse modo, quando em solução aquosa, essas espécies tendem a formar micelas (Figura 1-1 A).

Fosfolipídeos, como 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) (Figura 1-2), tendem a formar vesículas (Figura 1-1 B) quando em meio aquoso, isso se dá pois, diferentemente do SDS e da DPC, essas estruturas possuem um formato cilíndrico (larguras similares da cabeça de fósforo hidrofílica e da cauda apolar), devido à existência de duas cadeias hidrocarbônicas longas, o que leva à formação de estruturas de bicamadas, como vesículas.

Quando fosfolipídeos com cadeias hidrofóbicas de tamanhos significativamente diferentes, como a 1,2-di-*O*-tetradecil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (14-*O*-PC), com quatorze átomos de carbono na cadeia hidrofóbica, e a 1,2-di-*O*-hexil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (6-

O-PC), com seis átomos de carbono na cadeia hidrofóbica (Figura 1-2) são misturados em solução aquosa, formam-se estruturas chamadas bicelas (Figura 1-1 C).

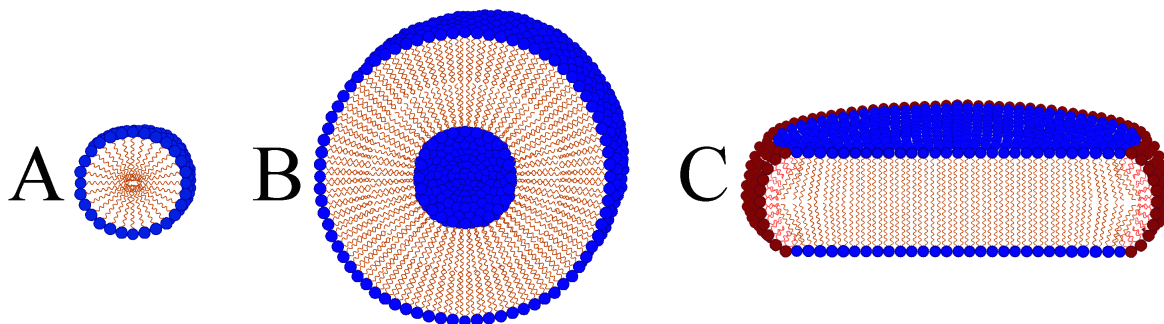


Figura 1-1 - Representação esquemática de meios biomiméticos de membranas. A: Micela. B: Vesícula. C: Bicela. Adaptada de (BECHINGER, RESENDE e AISENBREY, 2011). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).

As diferenças entre as seções lipofílicas e lipofóbicas, assim como as razões entre as cadeias hidrocarbônicas é de extrema importância para a estrutura dos meios (Figura 1-2). O tempo de vida desses meios biomiméticos em solução aquosa é pequeno, devido a possíveis reações de oxidação e hidrólise, que podem ocorrer nas carbonilas. Vesículas possuem, por exemplo, tempo médio de vida de dois dias em soluções aquosas, devido à reatividade da carbonila de éster. Para aumentar esse tempo, podem-se utilizar fosfolipídeos modificados, de modo que, ao invés de possuírem grupos funcionais de ésteres em suas cadeias, possuam o grupo funcional de éteres, sendo, nesse caso, o tempo de vida em soluções aquosas de duas semanas. (OPELLA e DE ANGELIS, 2007).

Lipídeo	Fórmula estrutural
1,2-di- <i>O</i> -tetradecil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (14- <i>O</i> -PC)	
1,2-di- <i>O</i> -hexil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina (6- <i>O</i> -PC)	
1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC)	
1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG)	

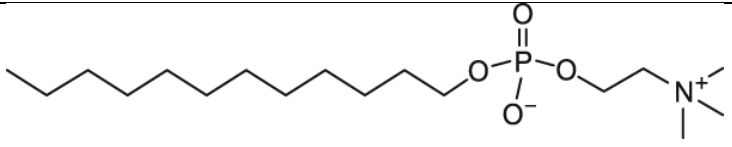
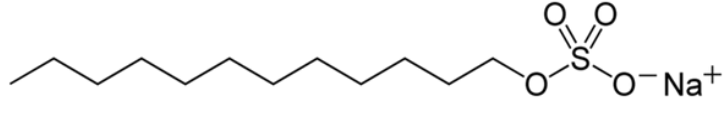
Dodecilsulfocolina(DPC)	
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	

Figura 1-2 - Quadro de exemplos das espécies lipídicas utilizadas como meios biomiméticos

A estrutura das bicelas depende ainda da proporção entre os lipídeos de cadeia longa e os de cadeia curta, proporção essa chamada de razão q . Quanto maior for essa razão, maior será o diâmetro da bicela, já que os lipídeos de cadeias longas formam uma estrutura semelhante a uma bicamada lipídica (Figura 1-1 C), enquanto os lipídeos de cadeias curtas se ligam nas bordas dessa bicamada, de modo a evitar o contato entre a parte lipofílica dos lipídeos e a água, o que estabiliza a estrutura em meio aquoso (BECHINGER, RESENDE e AISENBREY, 2011).

1.1.2 Acoplamentos dipolares

Os acoplamentos dipolares são uma fonte muito importante de informações estruturais obtidas pela RMN em meios parcialmente anisotrópicos. Em soluções líquidas isotrópicas todas as orientações moleculares são igualmente prováveis, isso faz com que a média dos tensores de interações dipolo-dipolo e quadrupolo se anulem. No entanto, em 1982, Bothner-By e colaboradores demonstraram ser possível a realização de medidas de acoplamentos dipolares residuais (*Residual Dipolar Coupling*, RDC), caso a molécula a ser analisada possuísse uma considerável susceptibilidade magnética e se orientasse, mesmo que parcialmente, em solução (CAVANAGH, FAIRBROTHER, *et al.*, 2007).

Uma grande evolução na medida dos RDCs veio com a introdução de meios anisotrópicos, de modo que, mesmo que a molécula não se orientasse espontaneamente em campos magnéticos, devido à anisotropia do meio, seria criada uma orientação preferencial da molécula em relação ao campo magnético, o que possibilitaria a medida dos RDCs. Uma maneira de se obter essa anisotropia é a utilização de soluções aquosas diluídas de bicelas fosfolipídicas, com uma razão q entre lipídeos de cadeia longa e lipídeos de cadeias curtas maior que 2,5. Nessas condições, as bicelas se orientam quando imersas em campos magnéticos superiores a 9,4 T. Caso a razão q seja menor do que 2,5 as bicelas formadas são

chamadas isotrópicas e não se orientam quando imersas em campos magnético (OPELLA e DE ANGELIS, 2007).

1.1.3 Desdobramento quadrupolar

Para medir o grau de orientação das bicelas, e, conseqüentemente, o grau de anisotropia do meio, costuma-se utilizar a RMN de ^2H . Isso ocorre, pois o núcleo de deutério tem $I = 1$, ou seja, é um núcleo que possui um quadrupolo magnético. Núcleos com momento quadrupolar possuem um tipo específico de interação, conhecida como acoplamento quadrupolar (Equação 1-1).

$$\Delta\nu = \frac{3e^2qQ}{2h} \cdot S_{\text{sistema}} \cdot \left\langle \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{2} \right\rangle \quad \text{Equação 1-1}$$

O desdobramento quadrupolar, $\Delta\nu$, é função do primeiro termo, $(3e^2qQ/2h)$, que é a constante quadrupolar do núcleo, um fator S_{sistema} dependente do sistema em questão, e uma média temporal do ângulo θ , delimitado pelo tensor de ^2H e o campo magnético externo. Em sistemas isotrópicos a média temporal é zero e o desdobramento quadrupolar conseqüentemente também é zero. No entanto, em meios anisotrópicos há uma orientação preferencial das moléculas, de modo que essa média temporal do ângulo difere de zero, aparecendo um desdobramento do sinal do deutério (SANDERS , HARE, *et al.*, 1994).

1.2 Objetivos

O objetivo desse capítulo é estudar a cinética da orientação de bicelas fosfolipídicas anisotrópicas, a partir do desdobramento quadrupolar do deutério, quando as respectivas soluções aquosas são expostas a campos magnéticos com diferentes magnitudes.

1.3 Metodologia

1.3.1 Preparo da solução de bicelas

A solução de bicelas para as análises por RMN em solução foram preparadas segundo a metodologia descrita por Opella e De Angelis, 2007. Prepararam-se 2,0 mL de uma solução 20% m/V de bicelas.

Inicialmente foram pesados 328,1 mg de 14-*O*-PC e 71,5 mg de 6-*O*-PC em eppendorfs separados. O lipídeo de menor cadeia, 6-*O*-PC, foi solubilizado em 200,0 μ L de água ultra purificada. Essa solução foi transferida para o eppendorf contendo o lipídeo de cadeia maior, assim como mais 200,0 μ L de água ultra purificada, utilizados para a lavagem do primeiro eppendorf.

Para a solubilização completa dos lipídeos foi necessária a repetição de uma sequência de operações:

- 1) Congelamento da amostra em gelo
- 2) Aquecimento em banho maria
- 3) Sonicação
- 4) Centrifugação a 5000g por 1 minuto

Água ultra purificada era adicionada de tempos em tempos, até se atingir o volume de 2,0 mL. O tempo de preparo da solução foi de aproximadamente 8 horas.

1.3.2 Experimentos de RMN de deutério

Para a determinação da evolução temporal do alinhamento das bicelas em solução, foram realizados experimentos de RMN de deutério. As amostras foram preparadas, diluindo-se a solução estoque de bicelas de 20% m/V, com $q = 3$, para soluções 5% m/V. O solvente utilizado era uma mistura de H₂O e D₂O 95:5. Esses experimentos foram realizados a 43°C, em espectrômetros AVANCE-III 400, 500 e 800 (operando respectivamente a 400,182 MHz, 500,132 MHz e 800,404 MHz para ¹H) Seus parâmetros estão sumariados em Tabela 1-1, Tabela 1-2 e Tabela 1-3.

O desdobramento quadrupolar do deutério foi então medido e os valores encontrados foram plotados em um gráfico em função do tempo, para demonstrar a dependência com o campo magnético no tempo de alinhamento.

Tabela 1-1 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 9,4 Tesla

Parâmetro	Valor
d1 (Tempo entre o término de um experimento e início do outro)	5 s
ns (Número de <i>scans</i>)	2
ds (Número de <i>dummy scans</i>)	1
sw (Janela espectral)	9.9991 ppm
TD (número de pontos de coleta do FID)	15970
Temperatura	316 K

Tabela 1-2 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 11,75 Tesla

Parâmetro	Valor
d1 (Tempo entre o término de um experimento e início do outro)	5 s
ns (Número de <i>scans</i>)	2
ds (Número de <i>dummy scans</i>)	1
sw (Janela espectral)	10.001 ppm
TD (número de pontos de coleta do FID)	19962
Temperatura	316 K

Tabela 1-3 - Parâmetros dos experimentos de deutério no espectrômetro de 18,8 Tesla

Parâmetro	Valor
d1 (Tempo entre o término de um experimento e início do outro)	5 s
ns (Número de <i>scans</i>)	2
ds (Número de <i>dummy scans</i>)	1
sw (Janela espectral)	10.0003 ppm
TD (número de pontos de coleta do FID)	31946
Temperatura	316 K

1.4 Resultados

Para a determinação de valores de RDC é necessário um meio parcialmente anisotrópico e, quando se utilizam bicelas, é necessário um tempo mínimo para que elas se orientem, quando expostas a um campo magnético (Figura 1-3). No entanto, esse tempo não está descrito na literatura, de modo que foram feitos experimentos com o objetivo de se obter o tempo de orientação de soluções de bicelas na presença de campos magnéticos com diferentes magnitudes

Os valores dos desdobramentos quadrupolares de deutério, associados às ressonâncias de ^2H das moléculas de HOD e de D_2O ligadas às bicelas, foram então medidos em diferentes campos magnéticos e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4-1 no ANEXO A..

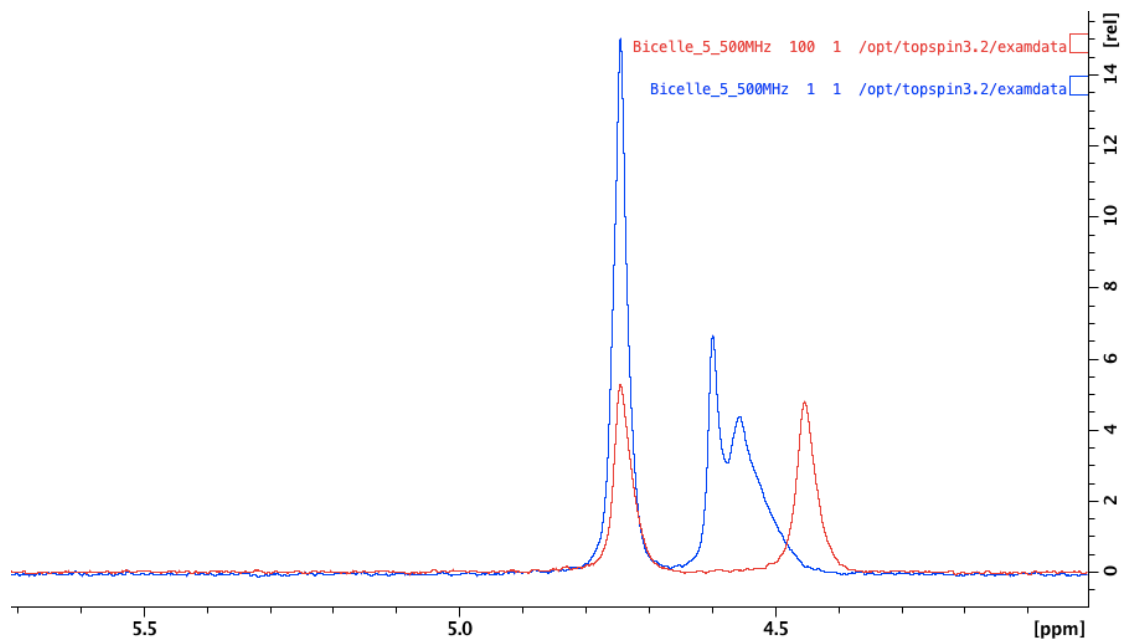


Figura 1-3 - Espectros de ^2H a 76,77 MHz após um minuto (azul) e após cem minutos (vermelho) de exposição a $B_0=11,75$ Tesla. Solução de bicelas de 14-*O*-PC e de 6-*O*-PC ($q = 3$) a 5% m/m em H_2O e D_2O (95:5), $T = 316$ K.

A partir desses valores, um gráfico da evolução temporal dos valores do desdobramento de ^2H em função do tempo foi construído para os diferentes campos magnéticos.

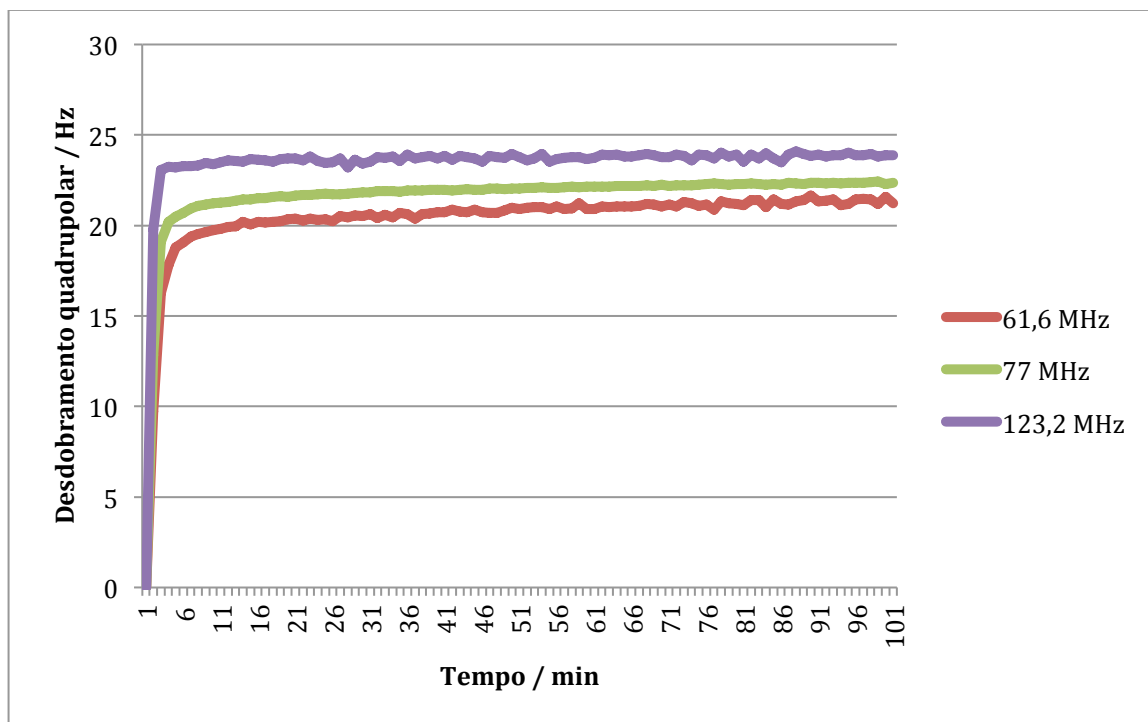


Figura 1-4 - Gráfico da evolução temporal do desdobramento quadrupolar do deutério em diferentes campos magnéticos. Solução de bicelas de 14-*O*-PC e de 6-*O*-PC ($q = 3$) a 5% m/m em H_2O e D_2O (95:5), $T = 316$ K.

Pela análise do gráfico, percebe-se que, quanto maior o campo magnético, mais rápida é a orientação das bicelas, tendo em vista que, em 5 minutos de experimento, os valores do desdobramento para o magneto de 18,8 Tesla já se encontravam próximos do valor máximo

encontrado, ao passo que, para o magneto de 9,4 Tesla, o tempo necessário para que isso ocorresse foi de aproximadamente 50 minutos. Além disso, percebe-se que quanto maior o campo magnético no qual o sistema está imerso, maior o valor do desdobramento quadrupolar máximo (Figura 1-5).

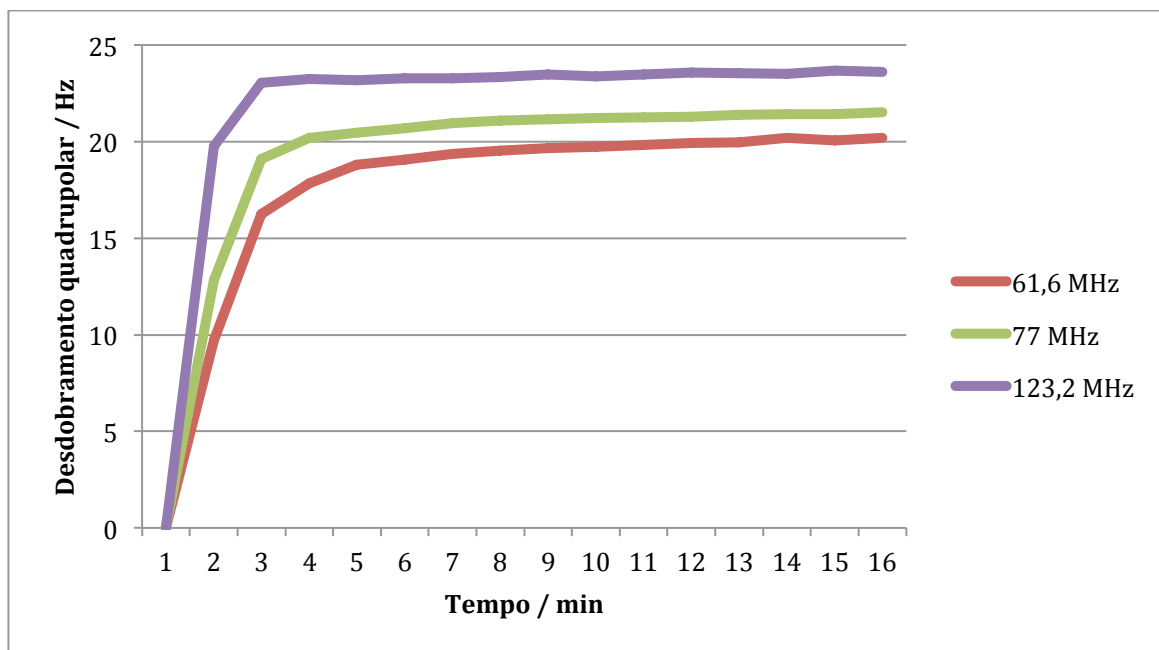


Figura 1-5 - Seção inicial do gráfico da evolução temporal do desdobramento quadrupolar do deutério em diferentes campos magnéticos. Solução de bicelas de 14-O-PC e de 6-O-PC ($q = 3$) a 5% m/m em H₂O e D₂O (95:5), T = 316 K

Esses dados foram analisados na tentativa de se equacionar o valor do desdobramento quadrupolar para o sistema em estudo, em função do tempo e do campo aplicado. Para isso foram realizados ajustes das curvas, seguindo-se uma função tentativa e em seguida parametrizou-se a função obtida.

A função obtida dessa maneira foi:

$$\Delta\nu = \frac{aB + c}{t^{dB+e}} + fB + g \quad \text{Equação 1-2}$$

Em que $\Delta\nu$ é o desdobramento quadrupolar, B é o valor de B_0 em MHz e t é o tempo em segundos. Os valores dos parâmetros a, c, d, e, f e g estão apresentados na Tabela 1-4 .

Esses resultados são relevantes pois, demonstram a necessidade do conhecimento do sistema em estudo, para que sejam feitas medidas de RDCs. Esse tipo de racionalização possibilita a otimização do tempo de espectrômetro necessário para a realização das medidas em sistemas bicelares, o que é de extrema importância, ao se considerar o custo extremamente oneroso dos equipamentos de RMN de alto campo, bem como da sua manutenção.

Tabela 1-4 - Tabela com os valores das constantes para a previsão do desdobramento quadrupolar de deutério obtidos para solução de bicelas de 14-*O*-PC e de 6-*O*-PC ($q = 3$) a 5% m/m em H₂O e D₂O (95:5), T = 316 K

Parâmetro	Valor
<i>a</i>	-19,206 s
<i>c</i>	693,178
<i>d</i>	0,009 s
<i>e</i>	0,393
<i>f</i>	0,039
<i>g</i>	18,992 Hz

Alguns estudos na literatura relatam tempos de espera de 10 horas, para se alcançar o alinhamento magnético das bicelas, previamente à realização dos estudos nos sistemas magneticamente alinhados (GOTO, SKRYNNIKOV, *et al.*, 2001). Como essas medidas haviam sido realizadas a 11,75 e 14,10 Tesla, os resultados acima descritos sugerem que as medidas poderiam ser iniciadas 15 minutos após a exposição da amostra ao B_0 . Até o ponto que sabemos, este é o primeiro trabalho que objetiva parametrizar uma equação que relacione a dependência temporal do alinhamento de bicelas para diferentes campos magnéticos.

A fim de se obter um maior detalhamento sobre o comportamento de soluções aquosas de bicelas magneticamente orientadas, nosso grupo de pesquisas visa realizar estudos posteriores, empregando-se medidas de $\Delta\nu$ ²H para diferentes concentrações de lipídeos, fatores q e valores de temperaturas.

1.5 Conclusões

As informações parametrizadas obtidas sobre a evolução temporal da orientação de bicelas anisotrópicas em diferentes campos magnéticos a partir da análise do desdobramento quadrupolar do deutério são, até onde sabemos, inéditas na literatura. Esses resultados são importantes devido à possibilidade de otimização do tempo de uso de espectrômetros de ressonância magnética nuclear, além da minimização do tempo de experimentos com amostras, que podem ser, dependendo da composição lipídica, passíveis de degradação.

Capítulo 2 Estudo da topologia do peptídeo homodimérico homotarsinina

2.1 Introdução

2.1.1 Peptídeos antimicrobianos

Vários estudos nos últimos anos tiveram como foco o isolamento, a purificação e a caracterização de moléculas sintetizadas por organismos vivos, que são utilizadas em seus sistemas imunológicos. Dentro desse grupo de moléculas, podem-se encontrar alcaloides (DALY, 1995) (PREUSSER, HABERMEHL, *et al.*, 1975), alguns derivados de esteroides (KABARA e VRABLE, 1977) (MOORE, WERHLI, *et al.*, 1993) e peptídeos (BOMAN, 1991) (BEVINS e ZASLOFF, 1990) (LEHRER, GANZ e SEISTED, 1991). Entre essas várias classes de moléculas, os peptídeos mostraram-se extremamente abrangentes, já que inúmeros seres vivos possuem peptídeos com atividades imunológicas. De acordo com o APD (*Antimicrobial Peptide Database*) existem atualmente 2636 peptídeos catalogados com atividade antimicrobiana sendo 262 do reino Bacteria, 4 do reino Archezoa, 7 do reino Protozoa, 13 do reino Fungi, 323 do reino Plantae e 1987 do reino Animalia (The Antimicrobial Peptide Database, 2015). Esses peptídeos isolados e catalogados no APD possuem as mais distintas atuações, podendo servir como bacteriostáticos, antivirais (incluindo o vírus do HIV), antifúngicos, anticancerígenos, antioxidantes, espermicidas, curativos e até mesmo inibidores de protease.

Desses peptídeos isolados de animais, os estudos do nosso grupo de pesquisa se focam, principalmente, naqueles que apresentam atividade antimicrobiana, tendo-se interesse especial por peptídeos extraídos de seres vivos da ordem Anura. Esse interesse é oriundo da grande variedade de espécies e peptídeos, assim como do grande número de trabalhos mostrando a versatilidade das funções e a significativa atividade dessa classe de peptídeos (XU e LAI, 2015). A facilidade da extração desses peptídeos, por serem de origem cutânea, também os torna bastante interessantes, uma vez que a extração é facilitada, quando comparada com peptídeos extraídos de venenos de cobras e aracnídeos. Além disso, anfíbios habitam locais úmidos, com inúmeros patógenos. Os anfíbios possuem um sistema imunológico mediado por células não muito efetivo, de modo que os PAMs (Peptídeos Antimicrobianos) precisam funcionar como uma primeira linha de defesa desses organismos contra esses patógenos de maneira bastante efetiva.

A utilização desses PAMs como antibacterianos possui grande apelo social e sanitário, pois o desenvolvimento de superbactérias, devido à utilização incorreta ou exagerada de antibióticos, é uma preocupação atual da medicina, principalmente a medicina hospitalar (ARIAS e MURRAY, 2009). Essa vantagem dos peptídeos sobre os antibióticos convencionais se dá pela diferença no modo de atuação de ambos. Enquanto os antibióticos necessitam de receptores específicos nas bactérias para atuarem, os PAMs normalmente atuam desestabilizando a membrana celular das bactérias, geralmente não precisando de proteínas específicas para se ligarem (OREN e SHAI, 1998), embora algumas descobertas sugerem que pelo menos alguns desses compostos se associam a alvos internos após cruzarem a superfície da membrana (SUGAWARA, RESENDE, *et al.*, 2010)

O estudo da interação desses peptídeos com membranas é realizado por diferentes técnicas, como espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD), DLS (espalhamento de luz dinâmico) e ITC (calorimetria de titulação isotérmica), utilizando-se meios biomiméticos de membranas celulares. Esses meios biomiméticos variam, podendo ser utilizadas, dentre outros, micelas detergentes, vesículas fosfolipídicas ou até mesmo bicelas fosfolipídicas. Soluções aquosas contendo bicelas fosfolipídicas grandes são um meio biomimético de extrema importância, pois, quando inseridas em um campo magnético maior do que 9,4 Tesla (equivalente a um espectrômetro de 400 MHz para o ^1H), elas podem se orientar em relação ao campo magnético, formando uma fase de cristal líquido. A orientação das bicelas pode ocorrer com o alinhamento do eixo principal paralelo ao campo magnético, ou ainda, quando na presença de íons de lantanídeos, com o eixo principal alinhado perpendicularmente ao campo (DE ANGELIS e OPELLA, 2007).

As técnicas de RMN utilizadas para os estudos estruturais e conformacionais de peptídeos e proteínas podem ser 1D (unidimensionais), 2D (bidimensionais) ou até mesmo multidimensionais (três ou mais dimensões). Além disso, para uma determinação estrutural mais precisa, costuma-se utilizar, além da RMN em solução, a RMN do estado sólido.

2.1.2 Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos possuem uma grande vantagem sobre os antibióticos devido ao seu diferente mecanismo de ação. Antibióticos necessitam de receptores específicos para se ligarem nas bactérias e, conseqüentemente, agirem sobre elas. Independente de seu mecanismo de ação, um receptor específico é necessário. Isso faz com

que as bactérias tenham a possibilidade da criação de mecanismos de resistência a esses antibióticos, o que por sua vez pode gerar bactérias super-resistentes. Os peptídeos antimicrobianos possuem mecanismos de ação que normalmente não necessitam de receptores específicos. Esses peptídeos normalmente interagem com a membrana celular dos micro-organismos e não com as proteínas específicas que existem na superfície das membranas (SATO e FEIX, 2006).

A maior parte dos peptídeos antimicrobianos possuem sequências catiônicas e estruturas anfipáticas sendo que a maioria possuem também motivos estruturais de α -hélices, apesar de já terem sido catalogados peptídeos antimicrobianos também em conformações β (MANDARD, SADANO, *et al.*, 1998) e alguns que não apresentam conformação preferencial bem definida (EPAND e VOGEL, 1999). Esses peptídeos são, geralmente, pequenos, contendo entre 12 e 50 resíduos de aminoácidos, e sua característica catiônica é devida à grande quantidade de resíduos de lisina, histidina e arginina normalmente presentes na sequência (HANCOCK e SCOTT, 2000).

Estudos realizados demonstraram que a citotoxicidade desses peptídeos é devida a modificações na estrutura da membrana e conseqüente extravasamento de parte da fração aquosa intracelular para o meio externo. Como esses peptídeos normalmente não necessitam de receptores, os mecanismos de ação propostos envolvem a interação desses com a membrana celular, de modo a facilitar esse extravasamento de fluidos (EPAND e VOGEL, 1999). Devido a isso, a alta ocorrência de moléculas com natureza anfipática pode ser facilmente explicada.

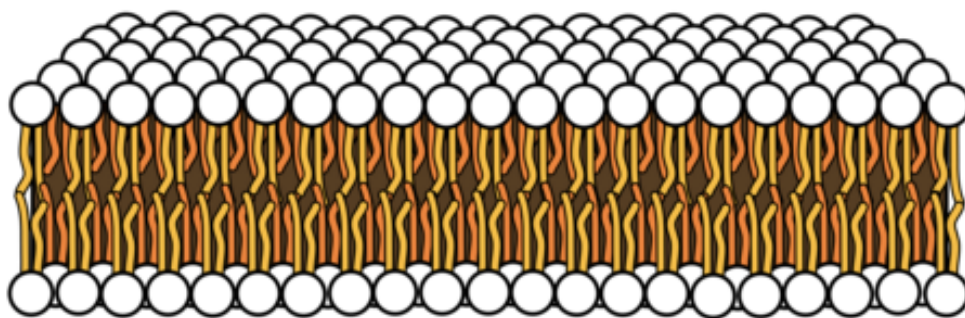


Figura 2-1 - Bicamada fosfolipídica. Adaptada de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Lipossoma>

As membranas celulares são formadas principalmente por bicamadas lipídicas (Figura 2-1). Os fosfolipídeos que compõem essas estruturas são moléculas naturalmente anfipáticas, sendo que os grupos fosfato das cabeças fosfolipídicas são polares e as cadeias derivadas de ácidos carboxílicos graxos possuem características apolares. Desse modo, a parte polar dos fosfolipídeos atrai os peptídeos devido à presença de resíduos de

aminoácidos com cadeias laterais polares e resíduos carregados positivamente, o que leva à formação de interações eletrostáticas favoráveis. Pode ainda ocorrer a acomodação dos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais apolares no interior da bicamada lipídica, o que promove a perturbação de seu empacotamento. Essa desorganização pode tensionar a bicamada e o excesso de peptídeos em uma mesma membrana celular acaba por possibilitar o vazamento de material intracelular, o que pode vir a causar a morte da célula (SATO e FEIX, 2006).

A maneira como essa desorganização favorece o extravasamento de líquidos necessários para a manutenção da vida celular ainda não é completamente elucidada, de modo que existem alguns mecanismos específicos propostos.

Duas das maneiras de desestabilização de membranas passam pela formação de canais, sendo um dos modelos o de barril de aduelas (*barrel-stave*) e outro o toroidal. Em um primeiro instante, em pequenas concentrações, os peptídeos começam a se acumular na superfície da membrana, ou logo abaixo da interface com a fase aquosa (Figura 2-2 A). Quando a concentração de peptídeos aumenta há uma maior desestabilização do empacotamento da membrana, afinando-a (Figura 2-2 B). Após essa etapa os peptídeos podem formar poros na forma de aglomerados, que é o modelo barril de aduelas (Figura 2-2 C) ou podem formar poros, alinhando-se paralelamente aos fosfolípídeos e dissolvendo-se parcialmente neles, o que configura o modelo de poros toroidais (Figura 2-2 D) (SATO e FEIX, 2006).

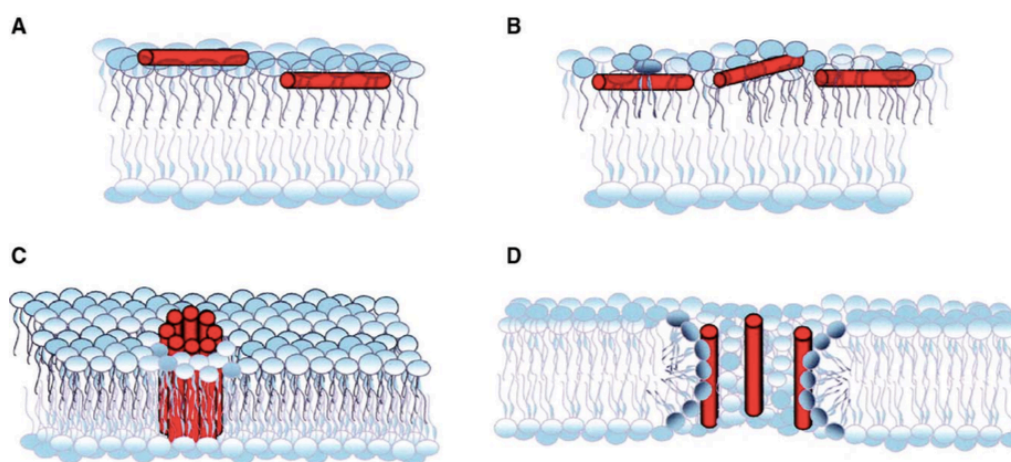


Figura 2-2 - O mecanismo de ação de peptídeos formadores de barris e de poros toroidais. Figura retirada de Sato e Feix (2006). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).

Uma outra maneira pela qual os PAMs podem atuar desestabilizando as membranas celulares é o modelo tipo detergente ou tapete (*detergente-like "carpet"*). Nesse modelo os peptídeos começam ligando-se e reorientando-se perpendicularmente às cadeias carbônicas dos fosfolípídeos (Figura 2-3 A e B), assim como no modelo de formação de poros. No

entanto com o aumento da concentração de peptídeos, essas moléculas podem acabar por cobrir, isto é, encarpetar a membrana fosfolipídica (Figura 2-3 C). Após essa etapa os peptídeos desfazem completamente a membrana, de uma maneira semelhante à que moléculas de detergente o fazem (Figura 2-3 D).

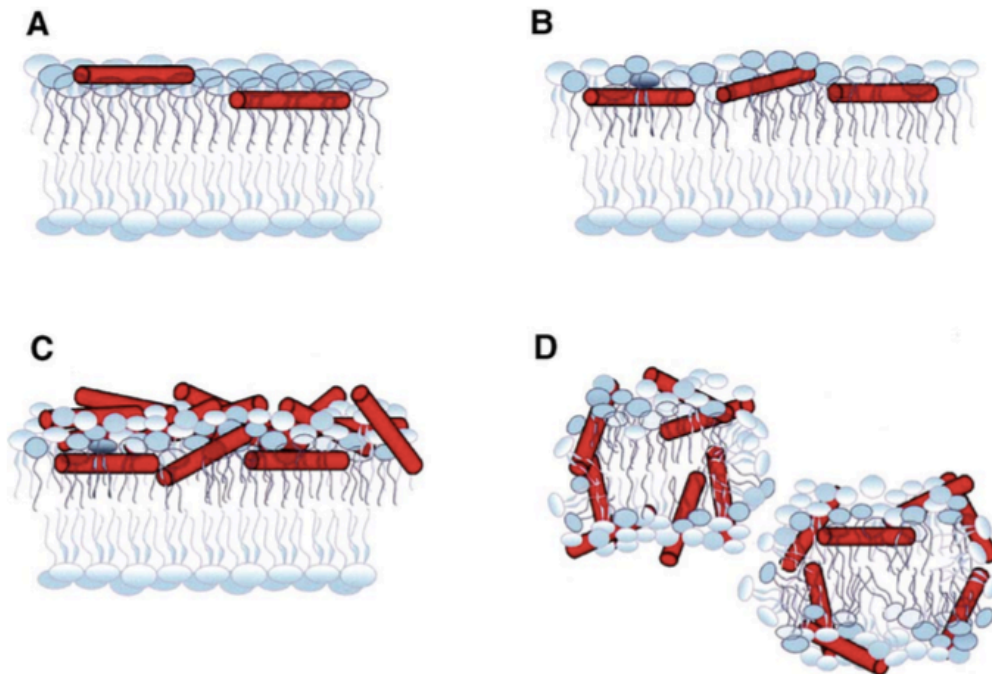


Figura 2-3 - O mecanismo de ação de peptídeos com ação do tipo tapete. Figura retirada de Sato e Feix (2006). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).

Apesar das diferenças inerentes entre os dois tipos de mecanismo, ambos possuem semelhanças, principalmente nos estágios iniciais. Alguns autores consideram a formação de poros toroidais como um estágio intermediário para a completa destruição da membrana. Isso é corroborado pelo fato de que, como a maior parte dos PAMs possuem características anfipáticas, esses podem atuar com o mecanismo do tipo detergente, desde que se encontrem em concentrações elevadas (SATO e FEIX, 2006), embora cadeias peptídicas relativamente grandes contendo uma carga positiva total considerável têm se mostrado capazes de perturbar a estabilidade de membranas de forma significativa, mesmo a baixas concentrações (VERLY, MORAES, *et al.*, 2009).

2.1.3 Peptídeo antimicrobiano Homotarsinina

O peptídeo homotarsinina é um peptídeo homodimérico extraído da secreção cutânea do anuro *Phyllomedusa tarsius* (Figura 2-4). Essa espécie de rã arborícola pertencente à família Hylidae. Até o presente momento sua presença foi reportada em regiões brasileiras, peruanas, equatorianas, e venezuelanas (PRATES, 1999). No entanto, devido a semelhanças

climáticas imagina-se que essa espécie também pode ser encontrada na Bolívia e na Guiana (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES, 2004). Essa espécie foi descrita pela primeira vez em 1868 e possui hábitos noturnos, podendo ser encontrada em regiões de baixa altitude, sejam tropicais, subtropicais ou pântanos de águas intermitentes.



Figura 2-4 - TUMULTY, James. *Phyllomedusa tarsius* fotografia retirada de https://jamestumulty.files.wordpress.com/2010/02/img_1666.jpg

A homotarsinina é composta por duas cadeias de 24 resíduos de aminoácidos cada, unidas por uma ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína (vigésimo terceiro resíduo). A cadeia monomérica da homotarsinina (Htr-M) pode ser obtida por síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) e o homodímero (Htr) (Figura 2-5), por reação de oxidação, que leva à formação da ligação dissulfeto. (VERLY, 2010).

Peptídeo	Sequência
Htr-M	NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂
Htr	NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR- NH ₂ NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR- NH ₂

Figura 2-5 - Quadro com as sequências da cadeia monomérica da homotarsinina (Htr-M) e com o homodímero (Htr)

O interesse no estudo estrutural desse peptídeo por nosso grupo se deve a resultados de sua atividade antimicrobiana, bem como à sua natureza homodimérica. A atividade pronunciadamente superior do homodímero em todos os casos, quando comparada à atividade da cadeia monomérica, foi um grande motivador para os estudos estruturais .

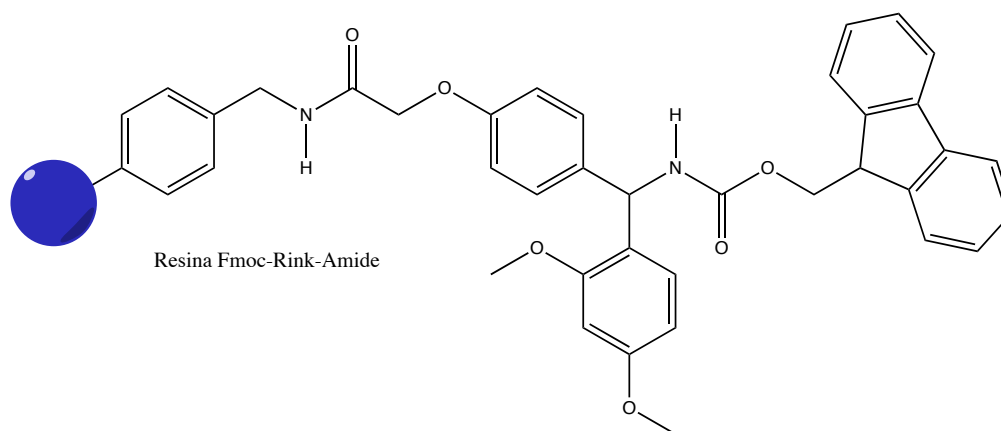
A porção C-terminal desse homodímero é naturalmente amidada, e isso se mostrou importante para a estruturação tanto da cadeia isolada quando do homodímero devido à presença de NOEs que incluem os nitrogênios da amidação terminal (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016) (VERLY, 2010). Todavia, na presença de micelas detergentes, não são observadas correlações de NOE intercadeias, de forma que, para a determinação da orientação relativa entre as duas cadeias quando o peptídeo interage com meios

biomiméticos, é proposta a realização de medidas de acoplamento dipolar entre núcleos das diferentes cadeias. Esses acoplamentos dipolares podem ser determinados por meio de técnicas de RMN.

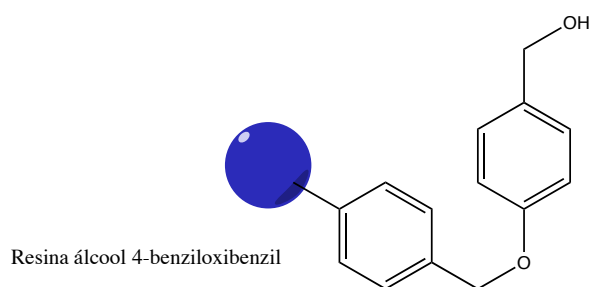
2.1.4 Síntese de peptídeos em fase sólida

A necessidade de grandes quantidades de peptídeos para a realização de análises diversas faz com que a extração deles, diretamente dos seres vivos, se torne inviável para a realização de experimentos. Desse modo, é necessária a obtenção desses por síntese em laboratórios. Devido à natureza da síntese, que demanda diversas etapas de acoplamentos, a principal técnica para a obtenção desses compostos é a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

Essa estratégia de síntese é realizada em um suporte polimérico, no qual os resíduos de aminoácidos são acoplados um a um, em sequência. O tipo de suporte a ser utilizado, depende da natureza do peptídeo alvo. Grande parte dos peptídeos antimicrobianos naturais possuem a porção C-terminal naturalmente amidada, de modo que é necessária a utilização de uma resina nitrogenada, para obtenção da sequência de interesse (Figura 2-6).



Exemplo de resina utilizada para peptídeos amidados na porção C-terminal



Exemplo de resina utilizada para peptídeos carboxilados na porção C-terminal

Figura 2-6 - Exemplos de resinas utilizadas para a SPFS. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)

A síntese de peptídeos possui alguns problemas intrínsecos, que são facilmente contornados pela estratégia Fmoc de SPFS. O primeiro deles é a formação da ligação peptídica, ou amídica. Isso ocorre pois, ácidos carboxílicos são pouco reativos, já que o grupo OH é um péssimo grupo abandonador, o que faz com que a reação demande ativadores da carboxila, como *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazola (HOBt).

Essas substâncias serão responsáveis por modificar o grupo funcional do Fmoc-aminoácido de ácido carboxílico para éster ativado, aumentando sua reatividade (Figura 2-7).

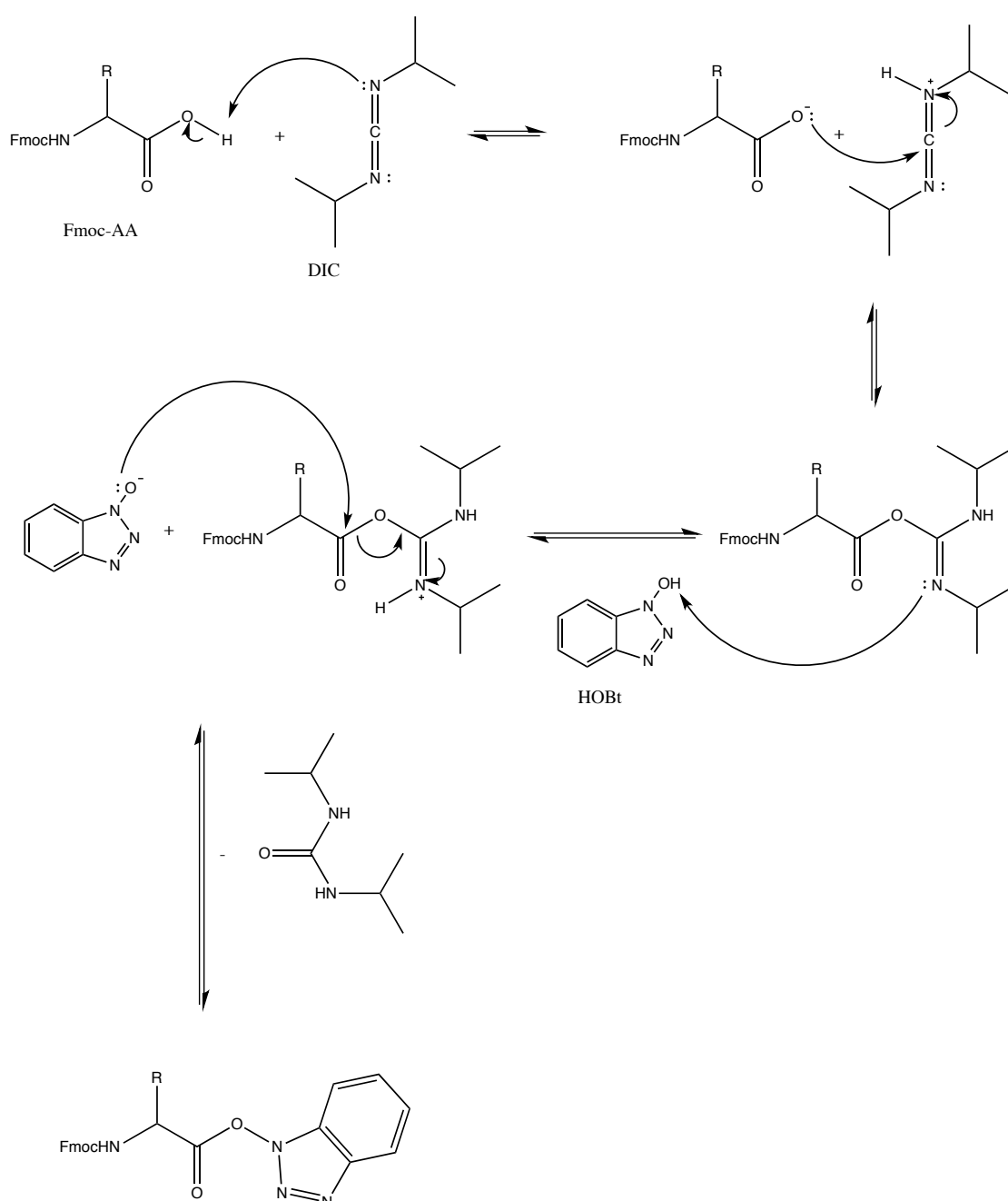


Figura 2-7 - Mecanismo de formação do Fmoc-aminoácido ativado. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)

Após a ativação do Fmoc-aminoácido, promove-se a reação de acoplamento com o próximo resíduo a ser incorporado na peptidilresina (Figura 2-8)

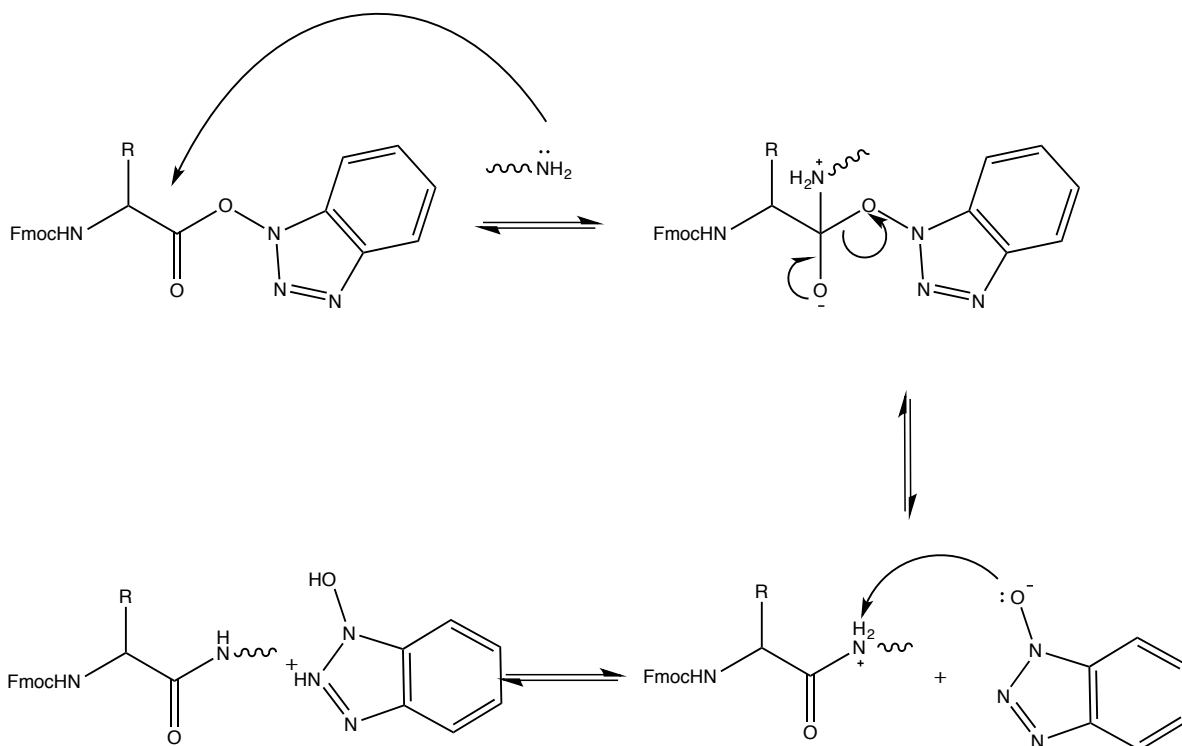


Figura 2-8 - Mecanismo da reação de acoplamento de Fmoc-aminoácido. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)

Cada resíduo de aminoácido deve ser incorporado na sequência peptídica em uma etapa de reação, sendo formada apenas uma ligação peptídica por vez. Neste contexto, tem-se o segundo problema, que consiste em evitar a reação entre dois resíduos de aminoácidos, bem como a adição de inúmeros resíduos de aminoácidos à sequência, em uma única etapa de reação, via formação de várias ligações amídicas. Para contornar esse problema, utilizam-se derivados de aminoácidos com o grupo amino protegido. Essa proteção ocorre por um grupo chamado Fmoc, 9-fluorenilmetoxycarbonila (Figura 2-9)

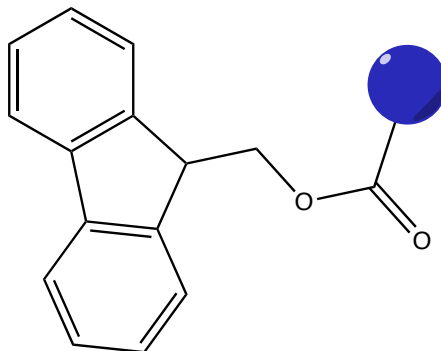
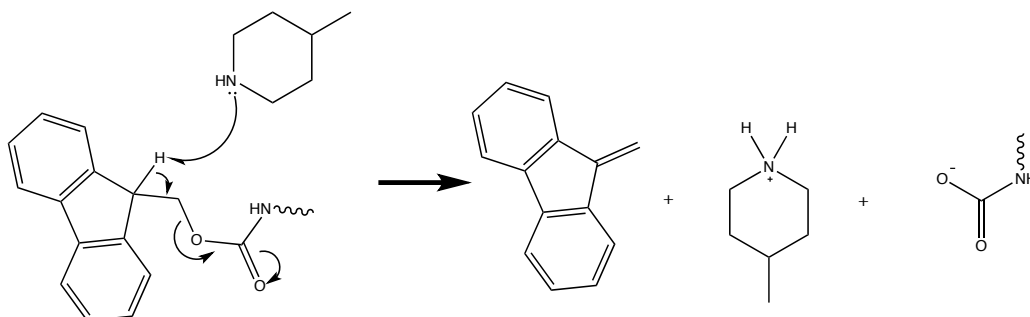


Figura 2-9 - Grupo Fmoc

Desse modo, entre um acoplamento e outro, a cadeia peptídica, que está acoplada à resina (peptidil-resina), deve ser desprotegida, para possibilitar a reação de reacoplamento do

Fmoc-resíduo de aminoácido. Essa reação de desproteção é realizada em meio básico, sendo a metilpiperidina uma base bastante empregada (Figura 2-10).

Primeira etapa:



Segunda etapa:

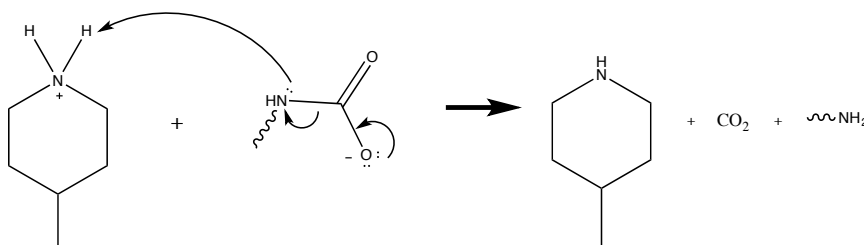


Figura 2-10 - Mecanismo da etapa de desproteção. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)

O terceiro problema é a ocorrência de aminoácidos com cadeias laterais, que contêm grupos nucleofílicos, como no caso da serina e da cisteína. Para evitar que esses grupos reajam durante a síntese, são utilizados os respectivos Fmoc-resíduos de aminoácidos contendo também grupos protetores específicos, como BOC ou OtBu, nas cadeias laterais.

Para se garantir uma alta eficiência em cada etapa de acoplamento, utiliza-se, em geral, um grande excesso de Fmoc-resíduos de aminoácidos ativados e, para se verificar a eficiência de cada etapa, é realizado um teste específico para grupo amino livre a cada etapa de acoplamento e desproteção. Esse teste é chamado teste de Kaiser (KAISER, COLESCOTT, *et al.*, 1970) e se baseia na mudança de cor de uma alíquota da resina, devido à reação de grupos amino com agente revelador específico.

Desse modo, caso o acoplamento tenha ocorrido de forma eficiente, a cadeia peptídica estará com grupo amino protegido na porção *N*-terminal e não há mudança na coloração da resina. Caso o acoplamento não tenha sido eficiente, o grupo amino terminal estará livre e a reação ocorrerá, sendo observada uma coloração azul/violeta na peptidil-resina (Figura 2-12).

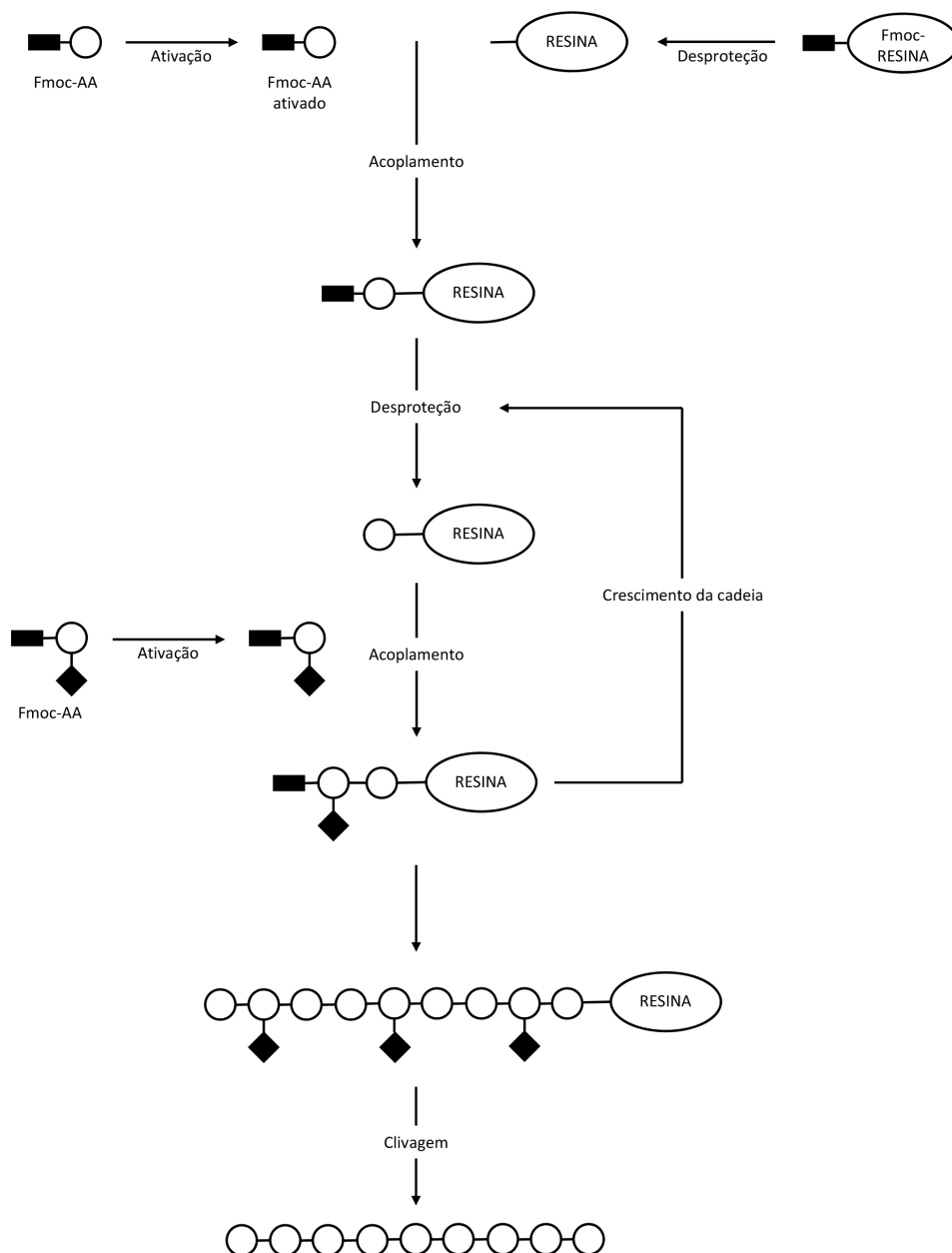


Figura 2-11 - Esquema da SPFS. Adaptada de (WILKEN e KENT, 1998).

No caso de reações de desproteção, a observação da coloração azul/violeta indica a eficiência do processo, ao passo que o não aparecimento indica a necessidade de repetição da etapa de desproteção.

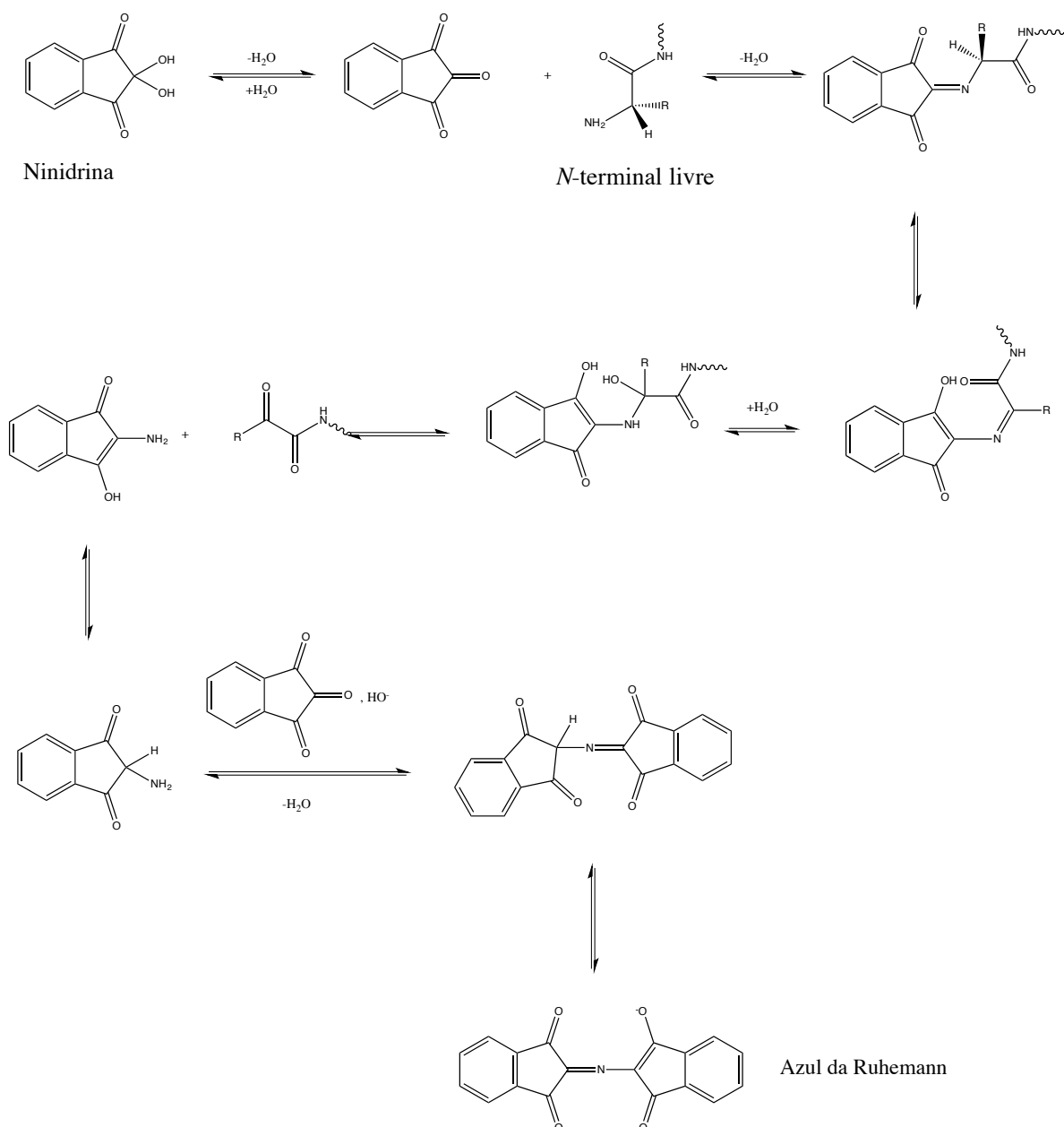


Figura 2-12 - Esquema reacional do teste de Kaiser. Adaptada de (CHAN e WHITE, 2000)

Ao final da síntese do peptídeo, ele é clivado da resina por meio de reação em meio ácido. Nessa etapa as proteções das cadeias laterais também são removidas. Após todas essas etapas (Figura 2-11) o peptídeo é então precipitado, liofilizado e purificado por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência).

2.1.5 RMN do estado sólido

Apesar da possibilidade de determinação dos acoplamentos dipolares em solução, por meio das medidas de RDCs, a necessidade da anisotropia do meio provoca uma dificuldade nessa medida. A utilização de bicelas para tornar o meio anisotrópico acaba por criar uma

fase de cristal líquido. Nessa fase, o meio se torna extremamente viscoso e essa viscosidade acaba por diminuir o tempo da relaxação transversal, já que o tombamento molecular é dificultado. Valores de T_2 curtos estão associados a linhas de ressonância alargadas, de modo que os sinais da RMN podem se misturar com o ruído e, conseqüentemente, não aparecerem no espectro. (DUER, 2004)

Para solucionar esse problema é mais comum a utilização da RMN do estado sólido, para se mensurar esses acoplamentos dipolo-dipolo. Esse acoplamento é originado pela interação do campo magnético de um núcleo com o campo magnético de outro núcleo sendo, portanto, dependente da distância espacial entre esses núcleos. Esse tipo de acoplamento é diferente do acoplamento escalar, que é mediado pelos elétrons e, conseqüentemente, pelas ligações químicas entre os dois núcleos. Desse modo é possível medir a distância entre dois núcleos, que estejam separados por um grande número de ligações químicas, por meio do acoplamento dipolar, desde que esses estejam espacialmente próximos.

O valor do acoplamento dipolar varia com $1/r^3$, em que r é a distância entre os dois núcleos. O aumento da intensidade de sinal dos núcleos então varia rapidamente com a distância, o que, utilizando um padrão de referência, nos dá a distância real entre os dois núcleos. A determinação desse valor para um acoplamento heteronuclear é geralmente realizada por experimentos como SEDOR (*spin-echo double resonance*) ou REDOR (*rotational-echo double resonance*) (DUER, 2004).

2.2 Objetivos

O objetivo desse capítulo é determinar a orientação relativa entre as duas cadeias monoméricas do peptídeo antimicrobiano homodimérico homotarsinina, quando ligado a meios biomiméticos de membranas, a partir de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear em solução e em estado sólido.

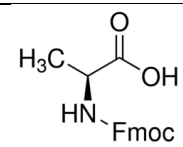
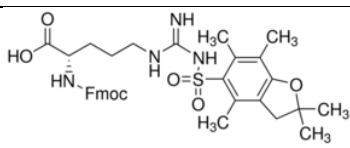
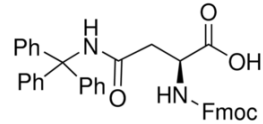
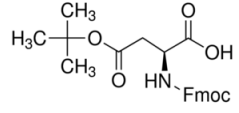
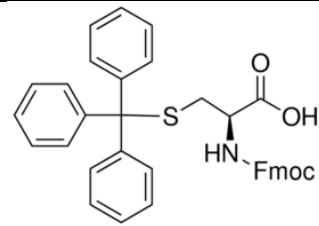
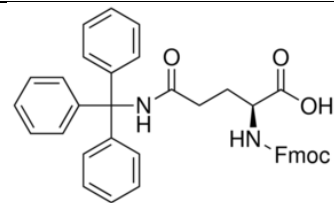
2.3 Metodologia

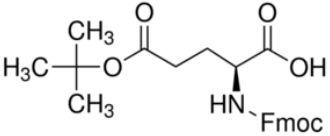
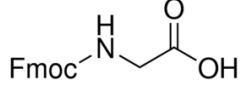
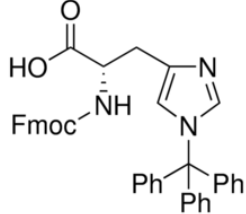
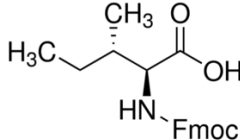
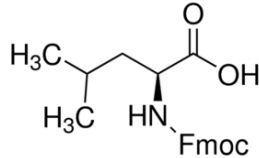
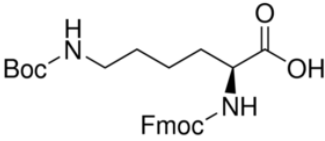
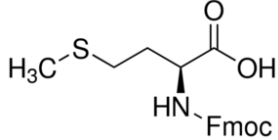
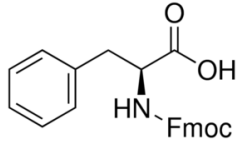
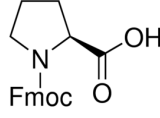
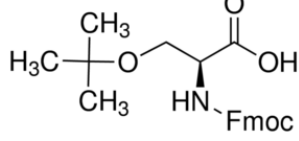
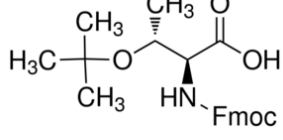
2.3.1 Síntese da Htr-M

O peptídeo homotarsinina é um peptídeo homodimérico, desse modo sua síntese é feita em duas etapas. Primeiramente a cadeia monomérica do peptídeo (Htr-M) foi obtida pela

estratégia Fmoc de SPFS (CHAN e WHITE, 2000) (Figura 2-9). Após a purificação da Htr-M por CLAE, foi feita uma reação para promover a formação da ligação de dissulfeto e, por consequência, a formação do dímero, Htr (GUIMARÃES, 2013).

Como a homotarsinina é um peptídeo amidado em sua porção C-terminal, utilizou-se a resina a Rink-Amide (Iris Biotech, Marktrechwitz, Alemanha) (Figura 2-6). Para seguir a metodologia Fmoc, todos os resíduos de aminoácidos utilizados, marcados (CIL, Andover, MA, EUA) e não marcados (Iris Biotech, Marktrechwitz, Alemanha), devem estar protegidos em seus grupos amino pelo grupo Fmoc, além das proteções em suas cadeias laterais, quando necessárias. Os Fmoc resíduos de aminoácidos utilizados na síntese da Htr-M estão apresentados na Figura 2-13.

Aminoácido a ser acoplado	Derivado de aminoácido utilizado	Estrutura
Alanina	Fmoc-Ala-OH	
Arginina	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	
Asparagina	Fmoc-Asn(Trt)-OH	
Ácido aspártico	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	
Cisteína	Fmoc-Cys(Trt)-OH	
Glutamina	Fmoc-Gln(Trt)-OH	

Ácido glutâmico	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	
Glicina	Fmoc-Gly-OH	
Histidina	Fmoc-His(Trt)-OH	
Isoleucina	Fmoc-Ile-OH	
Leucina	Fmoc-Leu-OH	
Lisina	Fmoc-Lys(Boc)-OH	
Metionina	Fmoc-Met-OH	
Fenilalanina	Fmoc-Phe-OH	
Prolina	Fmoc-Pro-OH	
Serina	Fmoc-Ser(tBu)-OH	
Treonina	Fmoc-Thr(tBu)-OH	

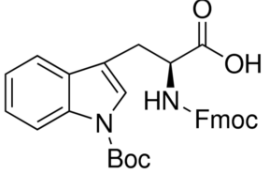
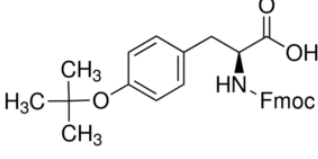
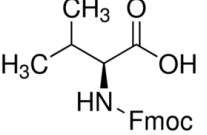
Triptofano	Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Tirosina	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	
Valina	Fmoc-Val-OH	

Figura 2-13 - Quadro com aminoácidos protegidos

A resina utilizada possui um grau de substituição de $0,74 \text{ mmol.g}^{-1}$ e foi pesada, assim como todos os derivados de aminoácidos em uma balança Metler AE 163, com precisão de 0,1 mg. A resina foi então transferida para uma seringa com êmbolo e com filtro, onde a síntese foi realizada.

Após cada etapa, seja de acoplamento ou de desproteção do grupo Fmoc, a peptidil-resina deve ser lavada com *N,N*-dimetilformamida (DMF) e isopropanol (IPA) por três vezes. Após, deve-se ainda lavar a peptidil-resina com diclorometano (DCM) e retirar o excesso de solvente da seringa sob vácuo, para garantir que a resina esteja bastante seca e para que uma pequena quantidade de amostra (alguns grãos de resina) possa ser retirada para a realização do teste de Kaiser.

As desproteções são feitas com solução 20% v/v de 4-metilpiperidina (PIPE) em DMF previamente destilada. Nesse processo o grupo Fmoc é retirado, no entanto, os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos continuam incorporados à peptidil-resina.

Anteriormente às etapas de acoplamento, procede-se a ativação do grupo carboxila dos Fmoc-aminoácidos por reação com DIC e HOBt, obtendo-se o respectivo éster ativado. Essas reações são conduzidas em 5 mL de uma mistura de DMF:DCM (3:1). Essa solução contendo o éster ativo é então succionada pela seringa contendo a peptidil-resina, deixando a reação de acoplamento ocorrer por pelo menos 120 min. Em caso de necessidade de reacoplamentos, esse tempo pode ser alterado.

Para se garantir uma alta eficiência em cada etapa de acoplamento, utiliza-se um excesso de, no mínimo, quatro vezes dos reagentes de ativação e do Fmoc-aminoácido (AA-Fmoc) em relação à funcionalização da resina.

O teste de Kaiser, ou teste da ninhidrina, é realizado com soluções de:

- 1) piridina 2% v/v em solução aquosa de KCN 1 mmol.L⁻¹
- 2) solução aquosa de fenol 80% v/v
- 3) solução etanólica 5% m/v de ninhidrina

Para a realização do teste as soluções são utilizadas na proporção 1:2:1 em volume. Uma pequena quantidade da resina é adicionada a um tubo de ensaio, seguindo-se a adição de gotas das soluções acima referidas e o tubo é aquecido a 100°C por cinco minutos (TROLL e CANNAN, 1953). Caso a resina continue com coloração clara, tem-se um indicativo de que não existem grupos amino livres, ou seja, o acoplamento foi efetivo, ou a desproteção não foi efetiva. O escurecimento da resina no teste de Kaiser é um indicativo de que há grupos amino livres, ou seja, ou a desproteção foi efetiva, ou o acoplamento não foi efetivo.

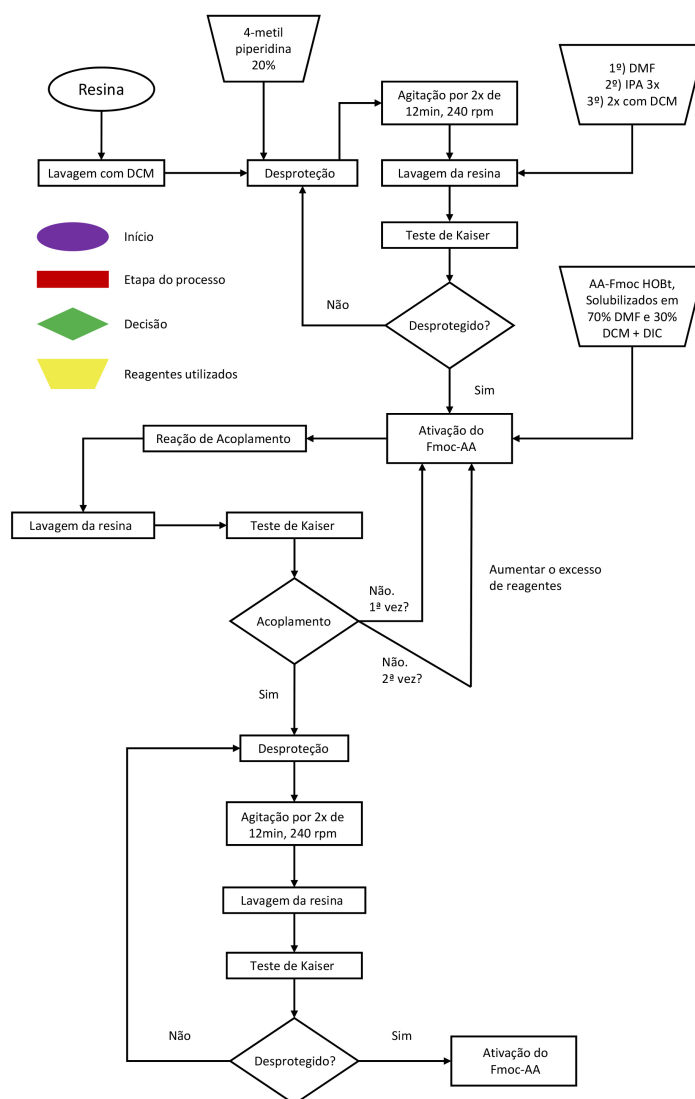


Figura 2-14 - Esquema da síntese de cadeias peptídicas pela metodologia Fmoc

As etapas de desproteção e acoplamento são então repetidas, até que toda a cadeia peptídica tenha sido sintetizada (Figura 2-14).

Foram sintetizadas amostras da Htr-M com diferentes marcações isotópicas em resíduos de leucina e glicina, chamadas Htr-M I e Htr-M II (Figura 2-15)

Htr-M I	N(¹³ C)LVSD II(¹⁵ N)GSK KHMEK (¹⁵ N)LISII KKCR-NH ₂
Htr-M II	N(¹⁵ N)LVSD II(¹³ C)GSK KHMEK (¹³ C)LISII KKCR-NH ₂

Figura 2-15 - Marcações isotópicas de ¹³C e ¹⁵N nos peptídeos Htr-M I e II

Após o término da síntese do peptídeo, é necessário retirá-lo da resina polimérica para liofilização e purificação. A retirada do peptídeo da resina foi realizada com 5 mL de uma mistura de ácido trifluoracético (TFA), água, etilenoditiol (EDT) e tri-isopropilsilano (TIS) na proporção de 94,5:2,5:2,5:1. É necessária a adição de TIS e EDT, pois eles são responsáveis por reagir com os carbocátions liberados durante a desproteção das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Enquanto o EDT captura os carbocátions de resíduos sulfurados, cisteína e metionina, o TIS é responsável pela reação com os carbocátions provenientes dos demais resíduos protegidos em suas cadeias laterais.

A solução para clivagem foi succionada para dentro da seringa, que foi então fechada e vedada com plástico Parafilm[®] e colocada para agitar a 390 rpm por 150 minutos, para se garantir completa separação do peptídeo da resina polimérica.

Após a reação a solução foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e o volume da solução foi reduzido ao máximo por evaporação sobre fluxo contínuo de gás nitrogênio. Para separar o peptídeo da solução, adicionam-se a ela 3 mL de éter di-isopropílico gelado. A mistura então é agitada em vórtex, resfriada e centrifugada a 5000 rpm por 4 minutos em uma centrífuga Eppendorf 5430. O sobrenadante é retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, de maneira a não perturbar o precipitado. Esse procedimento foi repetido quatro vezes, tendo sido o sólido final dissolvido na menor quantidade possível de água e a solução foi então dividida em tubos Falcon tarados, que foram então congelados em nitrogênio líquido e liofilizados em um liofilizador Thermo ModulyoD por 72 horas.

2.3.2 Purificação da Htr-M

Após a liofilização, uma amostra de sólido foi separada para o preparo de 50 µL de solução aquosa de concentração 1 mg/mL. Essa solução foi então filtrada em filtro de 0,22 µm, para então ser injetada em um equipamento de CLAE *ProStar* 210 da marca Varian com detector de UV/Vis por arraste de diodo. Para se determinar o perfil da síntese, uma

amostra de 20,00 μL dessa solução foi injetada e um ensaio em coluna analítica de fase reversa (C18) foi feita durante uma hora. A coluna utilizada é da marca GRACE, possuindo 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e poros de 5 μm . Utilizou-se um gradiente linear dos solventes TFA 0,1% V/V em H_2O e TFA 0,08% V/V em acetonitrila (AcCN) (Figura 2-16).

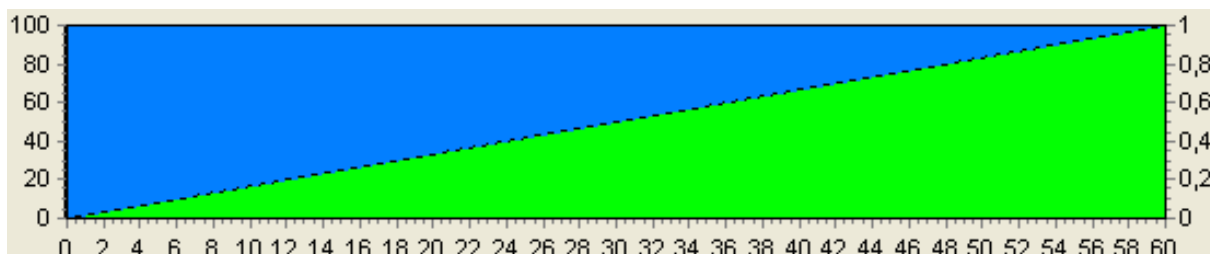


Figura 2-16 - Gradiente utilizado para traçar o perfil da Htr-M. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA, enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA

Como o nosso grupo já trabalha com o peptídeo Htr-M há alguns anos, não foi necessária uma análise por espectroscopia de massas para determinar qual pico correspondia à Htr-M, sendo que, apenas por comparação com outros cromatogramas disponíveis no laboratório foi possível determinar a banda de interesse.

O restante da solução preparada foi injetada então em uma coluna semi-preparativa de fase reversa C18. A coluna semi-preparativa utilizada foi da marca WATERS e possui 300 mm de comprimento, 7,8 mm de diâmetro interno e poros de 10 μm . Para se analisar o perfil nessa nova coluna um novo ensaio de uma hora, com gradiente linear e os mesmos solventes (Figura 2-16), foi realizado. Após se determinar o perfil da síntese nessa coluna, o restante do sólido liofilizado foi dissolvido em água, para formar soluções com concentração de aproximadamente 5 mg/mL. A solução foi então filtrada em filtros com poros de 0,22 μm e injetada na coluna em volumes de 2,00 mL por vez para a purificação (Figura 2-17)

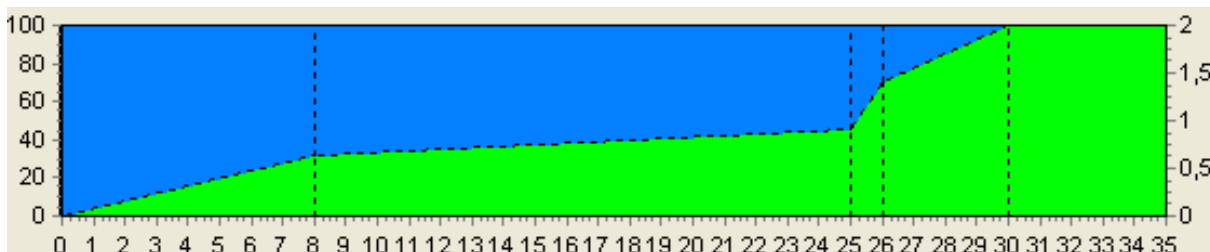


Figura 2-17 - Gradiente utilizado para a purificação da Htr-M. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA, enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA.

O volume correspondente ao pico da Htr-M foi coletado em tubos Falcon de 50 mL e uma alíquota foi retirada para ser analisada por espectroscopia de massas com ionização por *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), para determinação da pureza da amostra.

Após a coleta, o TFA e a AcCN das amostras foram removidos à temperatura ambiente com auxílio de equipamento de rotavapor e o material obtido (solução aquosa do peptídeo) foi então transferido para tubos Falcon, novamente congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 72 horas. As massas obtidas foram determinadas e os rendimentos das sínteses foram calculados.

2.3.3 Síntese da Htr

A reação de dimerização da Htr-M foi conduzida em uma solução 100 mmol.L⁻¹ de cloridrato de 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (Tris.HCl) em 60% em volume de trifluoretanol e 40% em volume em água e com concentração de peptídeo aproximadamente 1 mg/mL.

Uma solução estoque 300 mmol.L⁻¹ de Tris.HCl em água foi preparada pela dissolução do sal em água Milli-Q[®] sobre agitação contínua.

As amostras puras e liofilizadas de Htr-M foram então pesadas e separadas para a dimerização. Para cada miligrama de peptídeo, um mililitro de solução foi preparado, de modo que um terço do volume para o peptídeo fosse da solução estoque de Tris.HCl, 60% de TFE e o restante do volume de água.

A solução com peptídeo foi dividida em béqueres pequenos, de 10 mL, e colocada sob agitação magnética por 48 horas em um ambiente a 20 °C. Após esse período, a solução foi rotoevaporada a temperatura ambiente para a remoção do TFE.

2.3.4 Purificação da Htr

A solução obtida na síntese, após a remoção de TFE (com auxílio de evaporador rotatório), foi injetada em um equipamento de CLAE com uma coluna semi-preparativa de fase reversa. Para a separação da Htr-M, que não havia reagido, foi utilizado um gradiente dos solventes 0,1% TFA em H₂O e 0,08% TFA em AcCN (Figura 2-18).

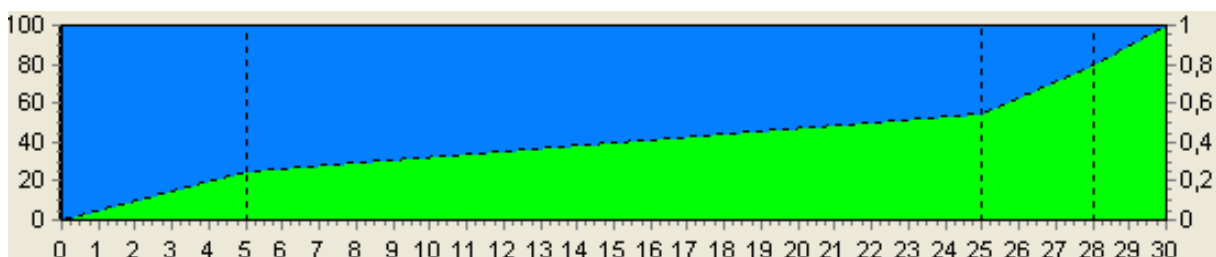


Figura 2-18 - Gradiente utilizado para a purificação da Htr. A cor azul representa a porcentagem da solução de água com TFA enquanto a cor verde a porcentagem da solução de AcCN com TFA.

A banda correspondente à Htr foi coletada e uma alíquota analisada por espectroscopia de massas MALDI. O TFA e a AcCN das amostras foram removidos à temperatura ambiente com auxílio de equipamento de rotavapor e o material obtido (solução aquosa do peptídeo) foi então transferido para tubos Falcon, novamente congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 72 horas.

2.3.5 Preparo das bicelas

As bicelas para as análises por RMN do estado sólido foram preparadas, utilizando-se outra metodologia, a descrita por Xu, Dürr, *et al.*, 2008. Foi preparada uma solução estoque de concentração aproximadamente 45% m/V de bicela para essas análises.

Para se preparar essa solução, pesaram-se 7,98 mg de 6-*O*-PC e 36,59 mg de 14-*O*-PC. Essa material foi dissolvido em 1,0 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi então evaporado em um fluxo de nitrogênio com rotação do eppendorf para a formação de um filme lipídico. Após seco o eppendorf foi colocado em um *SpeedVac* por duas horas para a retirada completa do solvente. Após passado esse tempo, foi adicionado ao eppendorf 50,0 μ L de água ultra purificada. O tubo então foi agitado em um vórtex por 5 minutos, sonicado em um banho de gelo por 30 minutos. Após isso, repetiu-se o ciclo de congelar o eppendorf em nitrogênio líquido e aquecê-lo em banho maria a 50°C por quatro vezes, até que a solução estivesse homogênea (XU, DÜRR, *et al.*, 2008).

2.3.6 Preparo das vesículas

Os lipossomas utilizados para as análises de RMN do estado sólido foram preparados, pesando-se POPC e POPG em uma proporção de 3:1 em mol e então dissolvendo-se esse material em clorofórmio. O clorofórmio foi então evaporado com auxílio de um rotaevaporador à temperatura ambiente, e em velocidade de rotação máxima, para a formação de um filme lipídico homogêneo no frasco.

Ao conteúdo do frasco foi então adicionada água ultra purificada e o material foi transferido para tubos Falcon de 15 mL. O volume de água é adicionado de forma que a concentração lipídica da solução fique a 3 mmol.L⁻¹.

A solução produzida é então congelada em nitrogênio líquido e descongelada a 30°C. Esse ciclo é repetido mais quatro vezes. Esse procedimento é necessário para garantir a formação de vesículas unilamellares.

Após os ciclos de congelamento/descongelamento, a solução a 3 mmol.L^{-1} foi extrusada, utilizando-se um extrusor Avanti com membranas de 100 nm. Esse procedimento é realizado 11 vezes, para garantir maior homogeneidade no tamanho das vesículas.

2.3.7 Experimentos de RMN em solução

Para tentar determinar os valores de RDC da Htr quando ligada à bicela, foi primeiramente realizado um experimento de ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* sem o pulso de desacoplamento, em solução aquosa na ausência de bicelas, para a determinação do valor de $^1J_{\text{HN}}$. Nesse experimento foi utilizada uma concentração de $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Htr II em uma mistura de água e água deuterada 95:5.

Para os experimentos na presença de bicelas, foram preparadas soluções da Htr II a $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de bicelas a uma concentração lipídica inicial de 5% m/V. Preparou-se soluções em concentrações lipídicas menores, até que algum sinal fosse detectado no mapa de contornos HMQC.

Os experimentos realizados seguiam sempre a mesma rotina:

- 1) Experimento simples de deutério
- 2) Calibração do pulso de hidrogênio
- 3) Experimento simples de hidrogênio
- 4) Supressão do sinal da água por pré-saturação
- 5) Supressão do sinal da água por *Watergate*
- 6) Experimento de ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* acoplado

Os experimentos de deutério eram realizados para verificar o alinhamento das bicelas a diferentes concentrações. O experimento de hidrogênio era realizado para a calibração do pulso e para a determinação do valor do deslocamento químico do sinal do hidrogênio da água, sendo esse valor então utilizado para a aplicação do pulso de pré-saturação, sendo utilizado como valor para a frequência do *offset* no experimento.

No experimento da pré-saturação, otimizava-se o valor do *offset* de acordo com o deslocamento químico da água, analisando-se a área do FID. O valor que demonstrasse a supressão mais eficiente era utilizado nos experimentos de *Watergate*.

Os experimentos de ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* foram então realizados com a potência do pulso de desacoplamento igual a zero. Desse modo a magnetização dos núcleos de nitrogênio 15 evoluiu também em $^1J_{\text{HN}}$, de modo que o sinal da correlação aparece como um duplete em F2.

2.3.8 Experimentos de RMN do estado sólido

Os experimentos de RMN de estado sólido foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 700, operando a 700,253 MHz para ^1H e equipado com uma sonda de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS). As análises foram todas feitas em rotores de 3,2 mm de diâmetro.

O primeiro passo a ser realizado foi a calibração do valor do ângulo mágico, utilizando-se um padrão de brometo de potássio. O experimento de calibração do ângulo mágico é feito no canal de carbono, já que a razão magnetogírica do ^{13}C ($6,7283 \times 10^7 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e do ^{79}Br ($6,7228 \times 10^7 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) são semelhantes (PARELLA, 2000).

Segue-se então a uma primeira calibração do o pulso de carbono com um padrão de adamantano. Essa calibração prévia é feita, para se ter uma ideia do valor do pulso, que será utilizado para a detecção do sinal da amostra. Segue-se então a calibração do pulso de ^{13}C , utilizando-se a amostra a ser analisada. Os pulsos foram calibrados com uma sequência de polarização cruzada CPX90.

Duas amostras com proporção de 17:1 de fosfolipídeos:peptídeo de foram preparadas. Em um primeira preparação, adicionou-se todo o peptídeo em uma única etapa na solução contendo as vesículas fosfolipídicas, ao passo que na segunda preparação o peptídeo foi adicionado e sob leve agitação. Após a adição de todo o peptídeo, a solução foi centrifugada a 20000 g por 30 minutos a 4°C, para a precipitação do complexo vesícula-peptídeos. O sólido foi então transferido para o rotor, com o auxílio de uma micropipeta com capilar. Preparou-se uma solução aquosa de bicelas 50%*m/V* e 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Htr, conforme procedimento descrito na seção 2.3.5.

2.4 Resultados

2.4.1 Síntese dos peptídeos Htr-M I e Htr-M II

A síntese do peptídeo Htr-M foi realizada conforme descrito no procedimento 2.3.1. Os quadros das Figura 4-1 e Figura 4-2 no ANEXO B sumarizam as sínteses das duas cadeias monoméricas Htr-M I e Htr-M II.

Após o término das reações de acoplamento e secagem, obtiveram-se 934,30 mg e 1013,40 mg de peptidil resina para a primeira, Htr-M I, e segunda, Htr-M II, sínteses, respectivamente. Após reação de clivagem e elaboração (ver seção 2.3.1, p. 27), obtiveram-

se 136,65 mg e 208,91 mg de peptídeo bruto para a primeira e segunda sínteses, respectivamente.

2.4.2 Purificação dos peptídeos Htr-M I e Htr-M II

Esses peptídeo foram então purificados por CLAE e os cromatogramas obtidos estão apresentados a seguir nas Figura 2-20 e Figura 2-21.

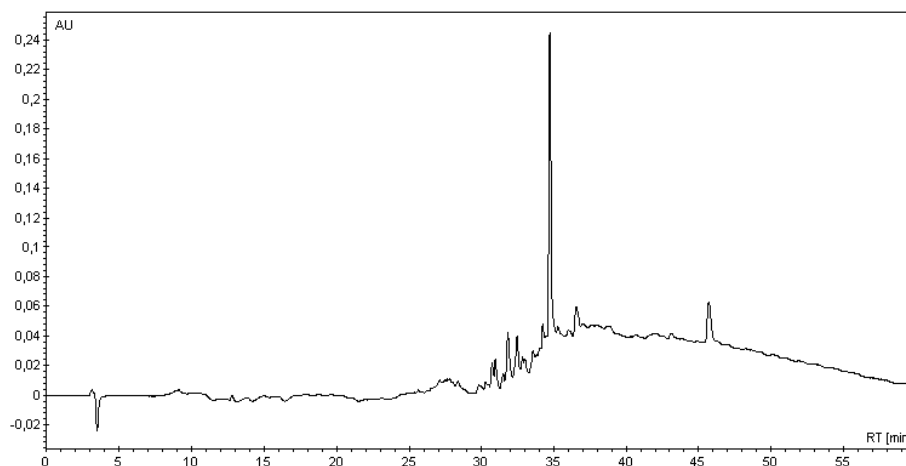


Figura 2-19 - Perfil cromatográfico analítico da síntese de Htr-M I obtido com o uso de coluna GRACE C₁₈ 5 μ m, 4,6mmx250mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-16.

A partir do perfil cromatográfico (Figura 2-19) procedeu-se a purificação em coluna semi-preparativa coletando-se a fração cromatográfica de interesse, no caso o de maior intensidade em tempo de retenção 16,2 minutos.

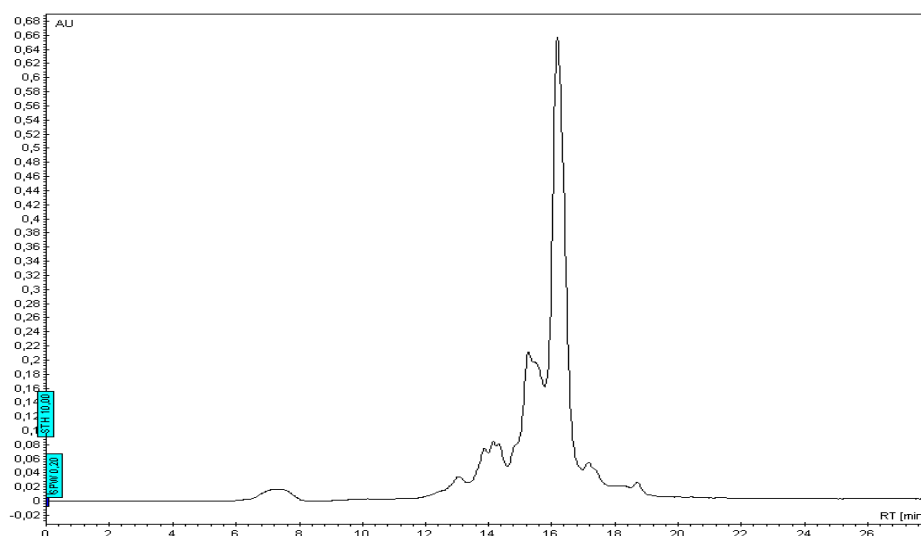


Figura 2-20 - Cromatograma da purificação do peptídeo Htr-M I obtido com o uso de coluna WATERS C₁₈ 10 μ m, 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-17.

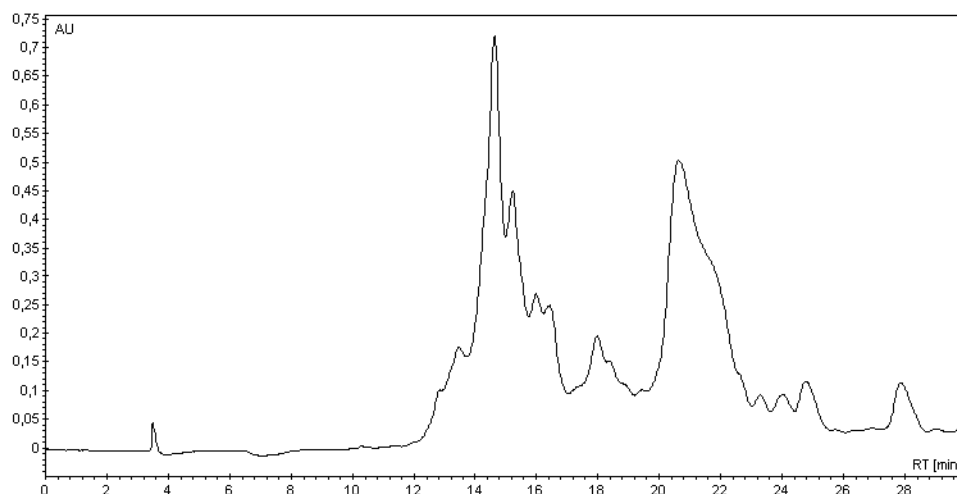


Figura 2-21 - Cromatograma da purificação do peptídeo Htr-M II obtido com o uso de coluna WATERS C₁₈ 10 μ m, 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-17.

Os peptídeos purificados e liofilizados pesaram 21,26 mg para a Htr-M I e 45,93 mg para a Htr-M II. Isso mostra rendimentos de 8,50% e 18,37% para a primeira e segunda sínteses, respectivamente. Apesar dos rendimentos aparentemente baixos, deve-se ressaltar que essas sínteses são compostas por 24 etapas, o que estaria associado a um rendimento médio superior a 90% e 93 % por acoplamento para a primeira e para a segunda síntese, respectivamente.

A pureza das amostras foi avaliada por espectrometria de massas, obtendo-se um espectro para a Htr-M I (Figura 2-22) e outro para a Htr-M II (Figura 2-23).

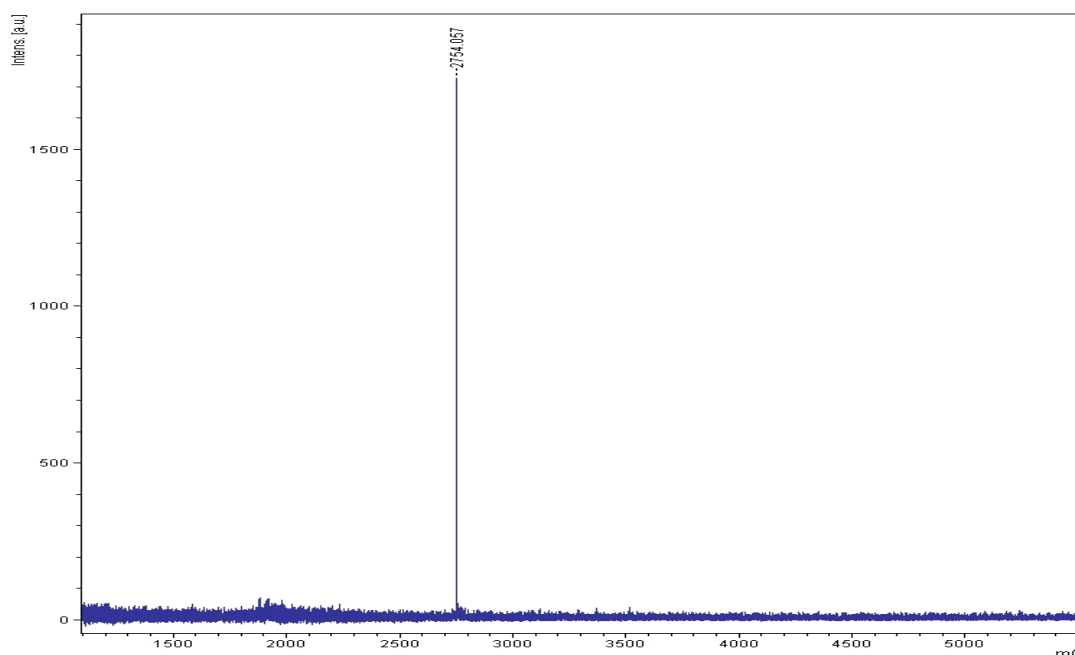


Figura 2-22 - Espectro de massas (MALDI) da amostra purificada da síntese da Htr-M I de em condições semi-preparativas.

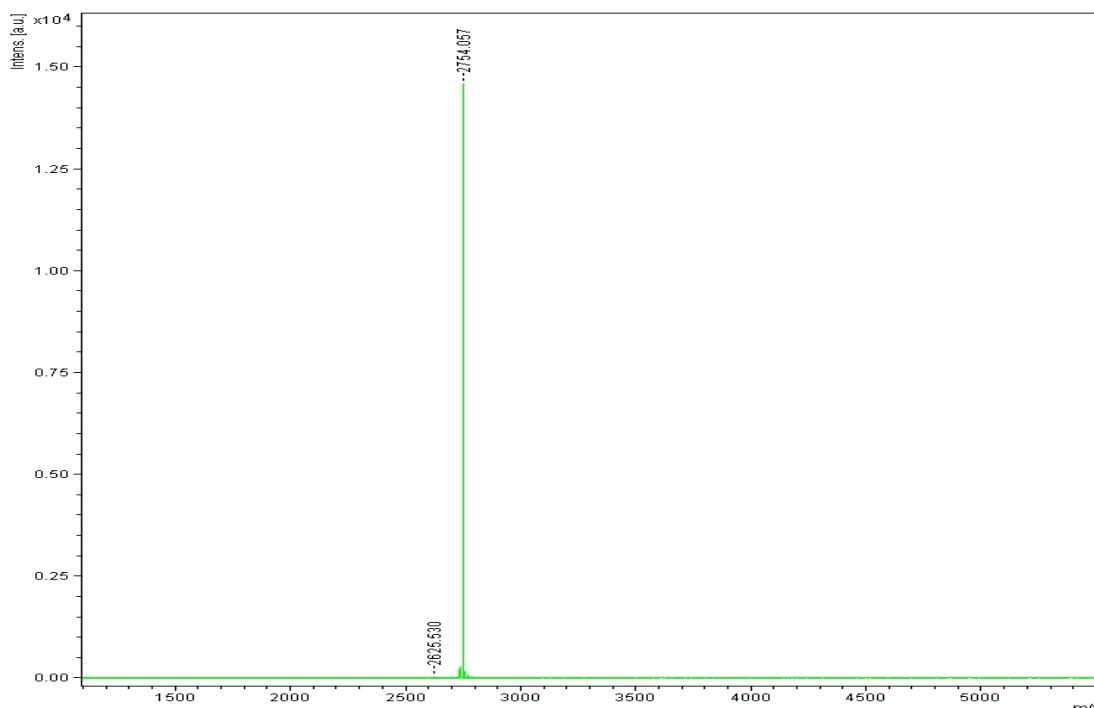


Figura 2-23 - Espectro de massas (MALDI) da amostra purificada da síntese da Htr-M II de em condições semi-preparativas..

As amostras purificadas das cadeias monoméricas foram então liofilizadas e submetidas a reações de dimerização conforme seção 2.3.3 (p. 29).

2.4.3 Síntese e purificação da Htr I e Htr II

Após as reações de dimerização os produtos foram submetidos a análise por CLAE. Os cromatogramas obtidos nas etapas de purificação das amostras de homodímero obtidas são estão apresentados a seguir nas Figuras 2-24 e 2-25.

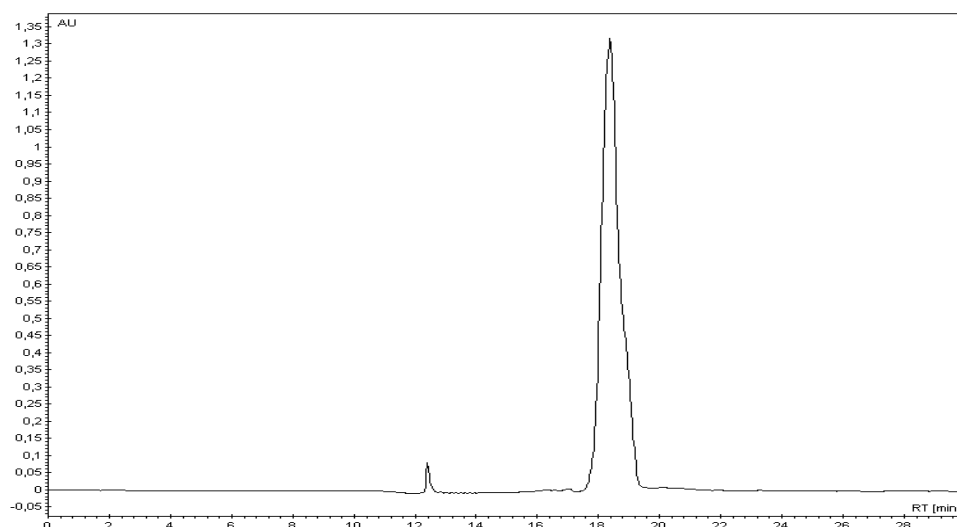


Figura 2-24 - Cromatograma de purificação da Htr I obtido com o uso de coluna WATERS C₁₈ 10µm, 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-18.

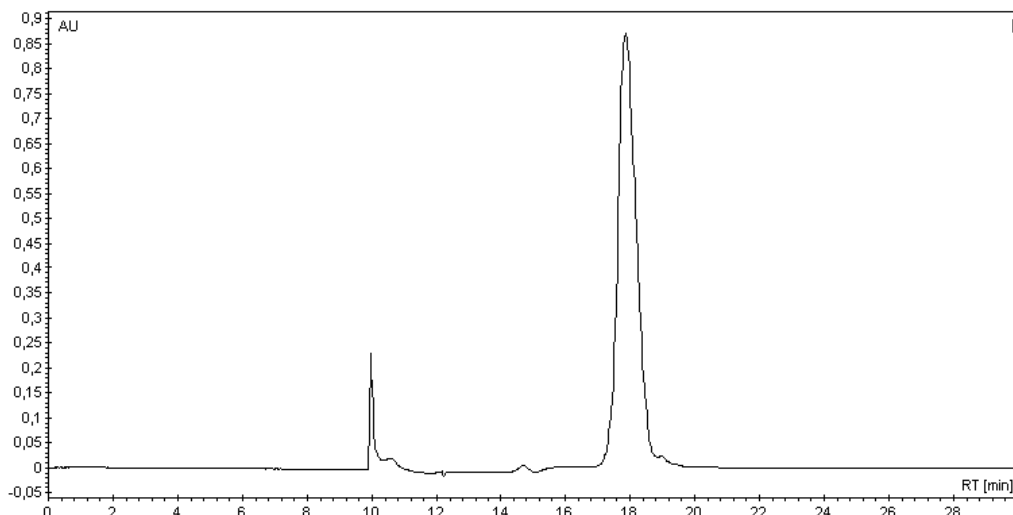


Figura 2-25 - Cromatograma da purificação da Htr II obtido com o uso de coluna WATERS C₁₈ 10µm, 7,8mmx300mm utilizando o gradiente conforme Figura 2-18.

Após a purificação e evaporação do TFA e da AcCN as amostras foram liofilizadas por 72 horas e pesadas, obtendo-se 19,63 mg para a Htr I e 40,77 mg para a Htr II, indicando rendimentos para a reação de dimerização de 92,33% para a Htr I e 88,77% para a Htr II. Esses rendimentos estão de acordo com resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa (GUIMARÃES, 2013).

2.4.5 Experimentos de RMN em solução com a Htr

Para se determinar um acoplamento residual dipolar, é necessário que se tenha o valor do acoplamento escalar em um meio isotrópico, para que esse seja comparado com o desdobramento do sinal em um meio anisotrópico. A seguir são apresentados expansões dos mapas de contornos ¹H-¹⁵N HMQC *sofast* para amostras da Htr II em solução aquosa e em solução aquosa na presença de bicelas alinhadas magneticamente (Figura 2-26, e Figura 2-27 respectivamente).

Os resultados obtidos em solução aquosa de Htr II mostraram um valor de ¹J_{HN} de 94,5 Hz, sendo as ressonâncias de ¹H e ¹⁵N detectadas em 8,65 e 124,04 ppm, respectivamente (Figura 2-26). O valor do acoplamento escalar obtido é da ordem média dos valores ¹J_{HN} para ligações peptídicas.

Para se obter informações sobre os valores de RDC do peptídeo na presença de bicelas, é necessário modular as características do meio, a fim de se garantir a propriedades anisotrópicas para a solução, que possibilitem a detecção de sinais de ressonância por metodologias de RMN em solução, uma vez que meios fortemente anisotrópicos demandariam a utilização de técnicas da RMN do estado sólido. Para tal, foram realizados

diversos experimentos, com variadas concentrações de lipídeos e de peptídeo, com o objetivo de se detectar as ressonâncias do peptídeo ligado a bicelas. O melhor resultado foi alcançado para uma solução contendo o peptídeo a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, na presença de bicelas para uma concentração de lipídeos de 2% m/V (fator $q = 3$), sendo o resultado apresentado na Figura 2-27.

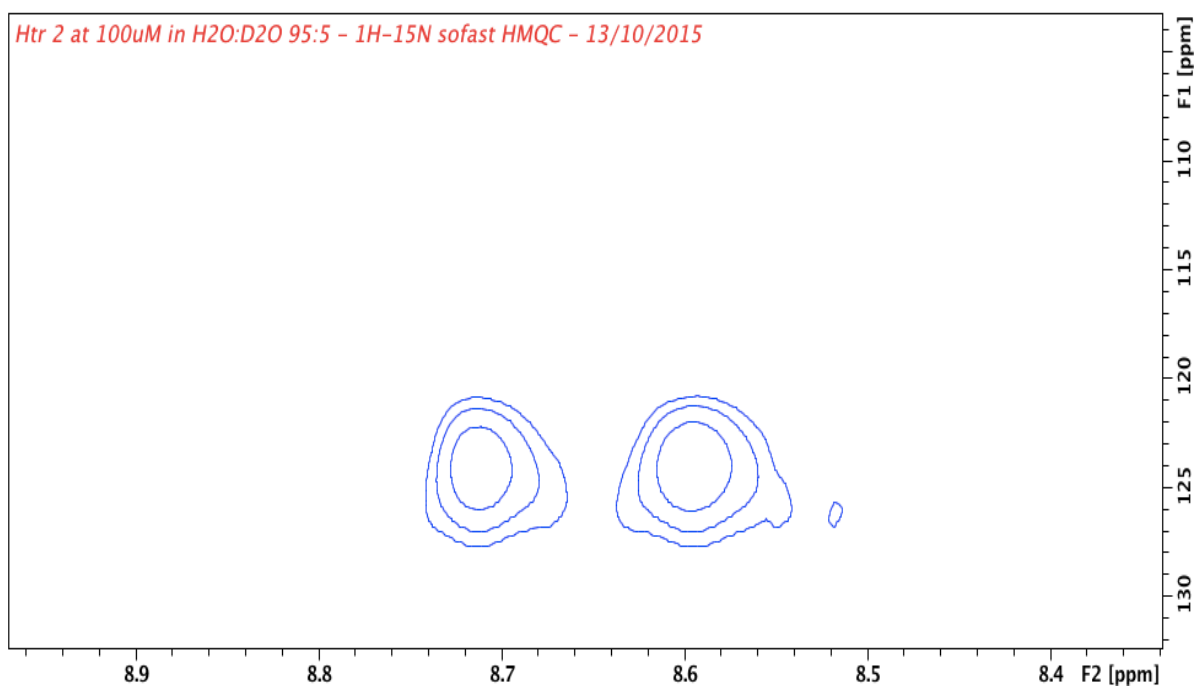


Figura 2-26 - Seção do mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* a $100 \mu\text{M}$ da Htr II $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5), 43°C , 800 MHz mostrando a correlação do resíduo Leu-2.

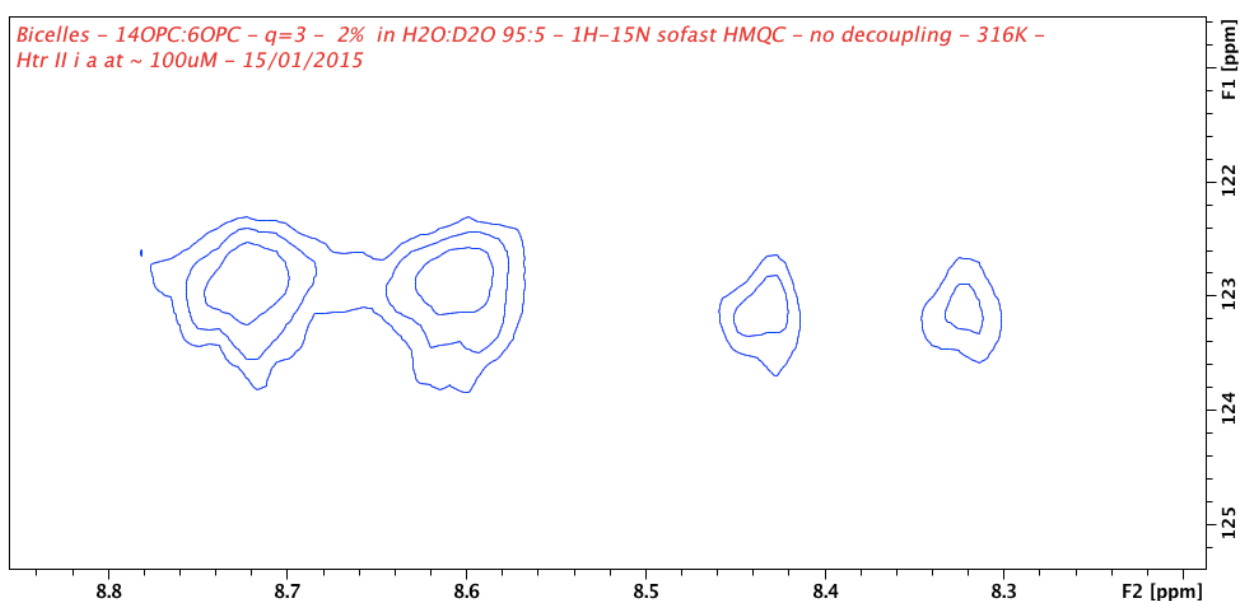


Figura 2-27 - Seção do mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* a $100 \mu\text{M}$ da Htr II em solução 2% de bicelas e $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (95:5), 43°C , 800 MHz mostrando a correlação do resíduo Leu-2 em solução, à esquerda, e interagindo com a bicela fosfolipídica, à direita.

Dois dupletos são observados no mapa de contornos obtido para a amostra contendo o peptídeo na presença de bicelas alinhadas magneticamente. Um deles está associado à Htr II livre, ou seja, um duplete com desdobramento de 94,4 Hz (da mesma ordem que o $^1J_{HN}$ medido na solução aquosa) e com frequências de ressonância de 1H e ^{15}N equivalentes às observadas para a amostra do peptídeo em solução aquosa. Entretanto, é observado um segundo sinal de ressonância, com desdobramento de 88,7 Hz e com deslocamento químico de 1H de 8,38 ppm, ou seja, com um valor consideravelmente diferente do observado para o peptídeo em solução aquosa, indicando que esse sinal é referente às ressonâncias dos átomos de 1H e ^{15}N detectadas para o peptídeo ligado à bicela.

A observação de uma única ressonância para a Htr ligada a bicelas fornece uma informação valiosa sobre a interação do homodímero com o meio biomimético, no sentido de indicar que ambas as cadeias se encontram em um mesmo ambiente químico, quando associadas à membrana.

Estudos prévios de RMN em solução realizados por nosso grupo de pesquisa para a Htr mostraram que, em meio aquoso, o homodímero apresenta uma conformação de super-hélice, na qual as duas hélices que compõe o dímero interagem entre si, entretanto elas se encontram em ambientes químicos distintos (Figura 2-28) (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016). Isso é confirmado pois, mais de 24 sistemas de spins são observados para o peptídeo em meio aquoso, sendo diversas interações intercadeias observadas no respectivo mapa de contornos NOESY.

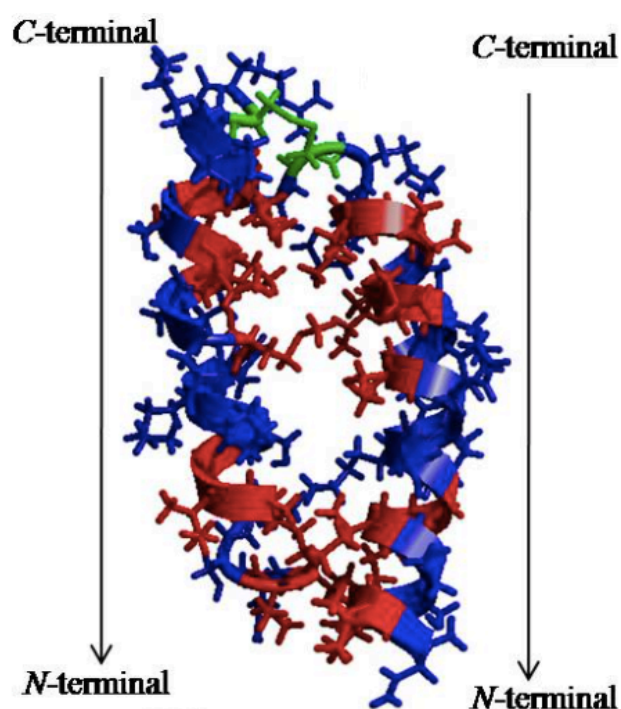


Figura 2-28 - Estrutura em super-hélice da Htr em solução aquosa. Figura retirada de (VERLY, 2010).

O resultado obtido neste trabalho sugere então que a Htr sofre um rearranjo conformacional ao se ligar à membrana, uma vez que as duas cadeias peptídicas se apresentam em ambientes químicos equivalentes após associação com a bicamada. Esta observação está em acordo com resultado prévio obtido pelo nosso grupo de pesquisa, uma vez que, na presença de micelas de DPC- d_{38} , apenas 24 sistemas de spins são observados para a Htr nos experimentos de RMN em solução, sugerindo a existência de um rearranjo conformacional do dímero ao se ligar à membrana, produzindo uma estrutura na qual as duas cadeias peptídicas se encontram em um ambiente químico equivalente (VERLY, 2010). Rearranjo conformacional bem significativo já foi observado para o peptídeo heterodimérico distinctina, quando esse se liga a modelos de membrana. Uma estrutura globular, constituída por um feixe de quatro hélices (dímero de dímero) estabilizado por interações hidrofóbicas intercadeias em meio aquoso, dá lugar a uma conformação aberta, quando o peptídeo se liga a membranas, sendo as interações hidrofóbicas peptídeo-peptídeo substituídas por interações hidrofóbicas peptídeo-lipídeos (RESENDE, MORAES, *et al.*, 2009)

Ressalta-se ainda uma diferença em relação aos desdobramentos dos sinais do peptídeo não ligado (94,5 Hz) com relação ao do peptídeo associado à bicela (88,8 Hz). Como em meio aquoso o valor do desdobramento é associado à $^1J_{HN}$, chega-se a um valor de RDC de +5,7 Hz para o sinal do peptídeo ligado à membrana. A determinação de valores de RDC pode fornecer informações importantes sobre o alinhamento das cadeias polipeptídicas em relação a B_0 e, uma vez que se conhece a orientação da bicela em relação a B_0 , pode-se obter informações importantes sobre o alinhamento da cadeia peptídica em relação à superfície da membrana.

Entretanto, a determinação de apenas um valor de RDC não possibilita a parametrização de restrições topológicas suficientemente necessárias para a determinação do alinhamento das cadeias peptídicas em relação à membrana. Existem duas possibilidades para se determinar esse alinhamento relativo, sendo elas a obtenção de outros valores RDC em diferentes sítios marcados na estrutura (CAVANAGH, FAIRBROTHER, *et al.*, 2007) ou a obtenção do valor de RDC, em um meio idêntico, para um peptídeo, cuja estrutura e a orientação relativa à membrana já são conhecidas. Todavia, a obtenção dessas informações demanda a realização de outras sínteses e de experimentos de RMN com os peptídeos obtidos, sendo de interesse do nosso grupo de pesquisa realizar esses estudos em trabalhos futuros.

Tendo-se esses dados em mãos, pretende-se determinar a estrutura tridimensional da Htr em meios de membranas, uma vez que nosso grupo já determinou por RMN em solução a

estrutura tridimensional adotada pelas cadeias do homodímero na presença de micelas de DPC- d_{38} (Figura 2-29), entretanto a ausência de NOEs intercadeia impossibilitou a determinação da orientação relativa entre as duas cadeias (VERLY, 2010).

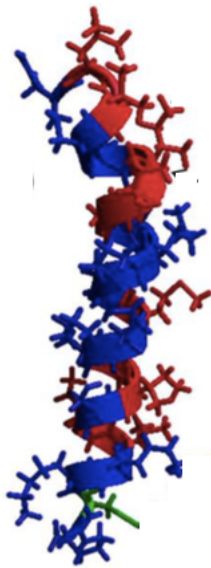


Figura 2-29 - Estrutura tridimensional da cadeia monomérica da Htr em solução micelar de DPC- d_{38} . Figura retirada de (VERLY, 2010).

No entanto, devido à grande dificuldade em se obter valores de RDC por RMN de solução nessas condições, uma nova abordagem, por meio da RMN de estado sólido, foi utilizada.

2.4.6 Experimentos de RMN do estado sólido

A primeira tentativa de amostra contendo o peptídeo foi feita, utilizando-se uma proporção de 17:1 de fosfolipídeos para peptídeo. Essa proporção foi utilizada, pois foi a proporção máxima obtida por estudos ITC realizados por nosso grupo de pesquisa previamente (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016). No entanto, a adição dessa quantidade de Htr de uma vez só, diferentemente do que é realizado nos experimentos de ITC, provocou uma perturbação excessiva na membrana, rompendo as vesículas e provocando precipitação da mistura de lipídeos. Desse modo, uma nova solução de vesículas e peptídeos foi preparada, com a mesma concentração da anterior, porém a adição de peptídeo foi feita paulatinamente e sobre leve agitação. No entanto, devido à pequena quantidade de amostra, foi necessária a inserção de um espaçador no rotor e, ainda assim, não foi possível a detecção de sinais.

Devido à dificuldade de produção de vesículas em grande quantidade e ao fato de que as vesículas são facilmente perturbadas pela Htr, tentou-se uma abordagem diferente,

utilizando-se uma solução de bicelas 50%*m/V* contendo o peptídeo a 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Os resultados dos experimentos, utilizando a sequência de pulso *cpredori.av* (Figura 2-30), não mostraram nenhum sinal de peptídeo, mas apenas de lipídeos. Isso poderia ser um indicativo de que a concentração de peptídeos estava baixa, no entanto, experimentos de INEPT mostraram sinais de peptídeo. Dessas informações, conclui-se que a ligação entre os peptídeos e a bicamada lipídica das bicelas é lábil e, portanto, os experimentos de CP (polarização cruzada), que necessitam de uma amostra bastante rígida, não foram capazes de detectar o sinal do peptídeo.

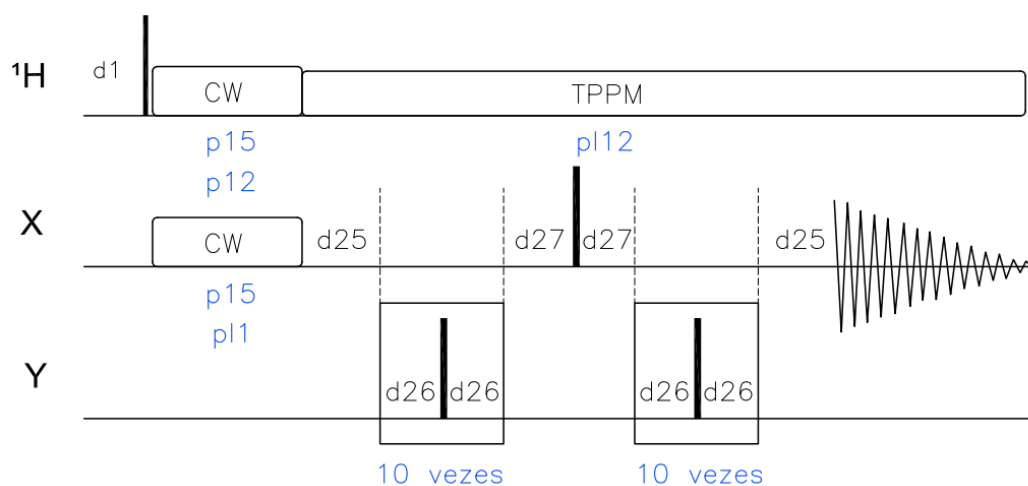


Figura 2-30 - Sequência de pulso para o experimento CP REDOR utilizada

Essa labilidade do peptídeo em contato com as bicelas utilizadas neste trabalho, pode estar associada à natureza das cabeças polares dos lipídeos utilizados, uma vez que essas foram preparadas a partir de fosfolipídeos zwitteriônicos. Estudos de interação da Htr com membranas realizados pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando diferentes aproximações biofísicas (ITC, DLS, SPE e extravasamento de marcador químico incorporado a vesículas), indicaram parâmetros de interação bem mais fortes do homodímero com modelos de membrana carregados negativamente do que com membranas zwitteriônicas (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016). Isso se deve, em parte, ao número significativo de resíduos de lisina presentes na estrutura do homodímero.

Com base nisso, decidiu-se realizar outros experimentos na presença de vesículas de POPC:POPG 3:1, que são constituídas por 25% de lipídeos aniônicos. Entretanto, devido à insensibilidade nos primeiros experimentos com vesículas, decidiu-se aumentar a quantidade de vesículas e de peptídeo, de modo a preencher completamente o rotor, não sendo necessária a colocação de espaçadores, o que aumentou a quantidade de peptídeo total no rotor, possibilitando a detecção de seus sinais de ressonância. Para a realização desses

experimentos, foi necessário a implementação de algumas modificações à sequência de pulsos original. Essas modificações visavam eliminar a contribuição do sinal do lipídeo ao longo do experimento, uma vez que os lipídeos disponíveis não eram deuterados. Para tanto, optou-se por tentar maximizar a transferência de magnetização entre prótons e as carbonilas. Para isso, um pulso adiabático foi adicionado à sequência, assim como a mudança do *offset* durante o período de CP. Durante a polarização cruzada o *offset* foi centrado na ressonância da carbonila (178,092 ppm), a fim de intensificar a transferência de magnetização, tendo-se ainda utilizado um tempo de contato de 2500 μ s. No entanto, ainda assim, a contribuição dos lipídeos ainda foi grande, como pode ser observado para os sinais entre 21,8 e 77,8 ppm na Figura 2-31.

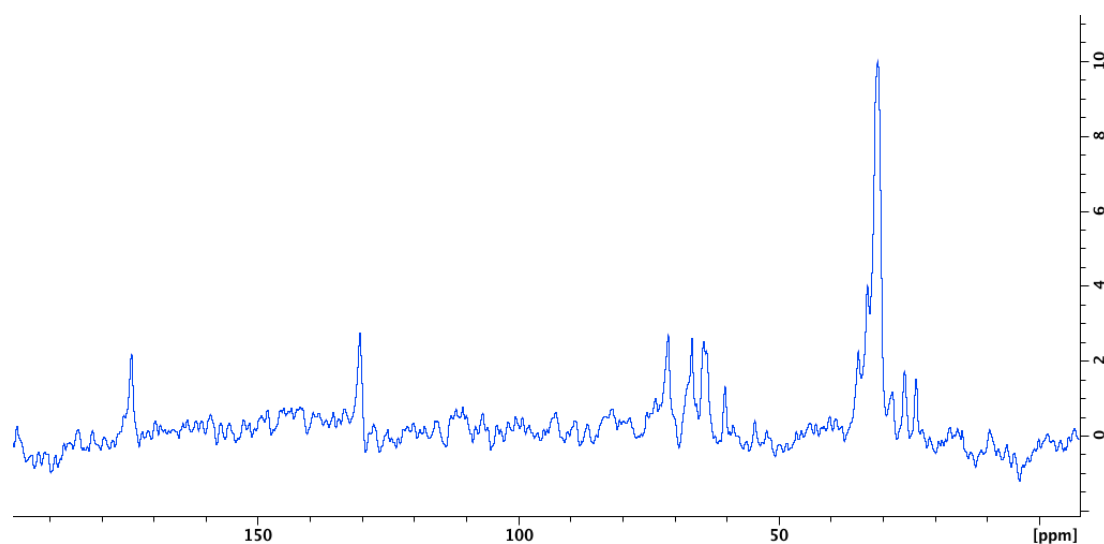


Figura 2-31 - Espectro de ^{13}C da Htr-I em vesículas (POPC:POPG 3:1), na proporção lipídeo: peptídeo 17:1, a 4 °C e MAS a 7kHz, obtido a partir do experimento CPREDOR em 175 MHz.

Para a determinação da distância entre os dois spins, foram feitos vários experimentos sequenciais. Os experimentos ímpares continham pulsos no canal de nitrogênio, enquanto nos experimentos pares os pulsos de nitrogênio apresentavam potência zero.

O número de pulsos de refocalização foi otimizado de 1 a 15 (Figura 2-32). No entanto, pode-se perceber que não há variação significativa na intensidade do sinal da carbonila (178,092 ppm).

Esse resultado sugere que o par de spins se encontra muito afastado espacialmente, para que um afetasse a intensidade do outro, o que sugere que os sítios marcados nas duas cadeias (resíduos de Gly-8 e Leu-16) se encontram distantes na estrutura do homodímero. No entanto, devido à relação sinal/ruído do experimento não ser muito alta (3,21), o resultado deve ser analisado com certa cautela. Apesar disso, este resultado corrobora os estudos realizados para a Htr na presença de micelas de DPC- d_{38} , uma vez que a não observação de

NOEs intercadeia (ao contrário do observado para o peptídeo em meio aquoso) sugere a não proximidade das cadeias na estrutura do homodímero, quando em ambiente de membrana (VERLY, 2010). Esses resultados sugerem que a Htr, quando em contato com membranas, deve apresentar uma conformação mais aberta, o que estaria de acordo com uma maior distância intercadeias.

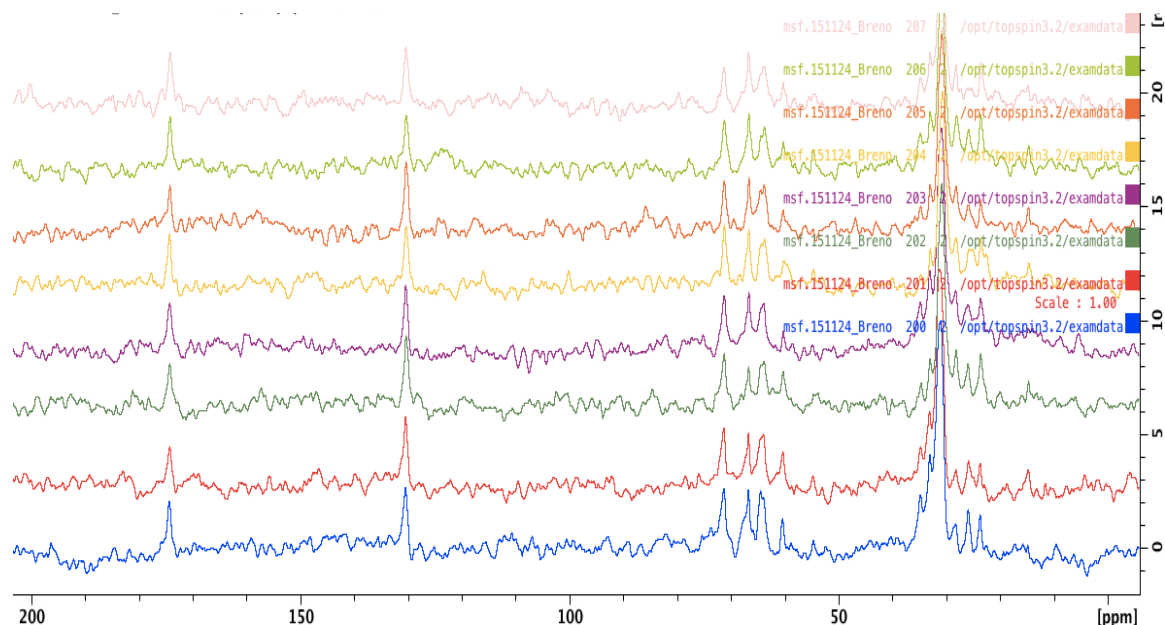


Figura 2-32 - Otimização do número de pulsos de refocalização do experimento CPREDOR a partir de espectros de ^{13}C da Htr-I em vesículas (POPC:POPG 3:1), na proporção lipídeo: peptídeo 17:1, a 4 °C e MAS a 7kHz, em 175 MHz

2.5 Conclusão

Os resultados obtidos para o peptídeo homotarsinina na presença de bicelas magneticamente orientadas confirmam resultados obtidos anteriormente por nosso grupo para o peptídeo na presença de micelas de DPC- d_{38} , no sentido de que o homodímero, ao sair do meio aquoso e se ligar a membranas, sofre um rearranjo conformacional, no qual as duas cadeias adotam ambientes químicos equivalentes na estrutura do homodímero. Experimentos de CP REDOR para a homotarsinina na presença de vesículas fosfolipídicas indicaram que as cadeias peptídicas, apesar de conectadas por uma ligação de dissulfeto, não estão espacialmente próximas, o que sugere que o dímero adota uma conformação aberta.

Esses resultados também corroboram dados obtidos anteriormente por nosso grupo para o peptídeo na presença de micelas de DPC- d_{38} , sendo que correlações de NOE intercadeias não foram detectadas por experimentos de RMN em solução. Apesar das informações obtidas, não foi possível se determinar a topologia definida das duas cadeias na estrutura do

homodímero em meios miméticos de membranas. Pretende-se, em outros estudos do grupo de pesquisas, dar continuidade a investigações por RMN, que forneçam a topologia exata das cadeias peptídicas em meios de membranas.

Capítulo 3 Estudo da estrutura tridimensional do peptídeo antimicrobiano LyeTx I mn Δ K Ac

3.1 Introdução

3.1.1 Peptídeo antimicrobiano LyeTx mn Δ K Ac

O peptídeo LyeTx I (Figura 3-2) foi isolado do veneno da aranha-lobo, um aracnídeo da espécie *Lycosa erythrognatha* (Figura 3-1). Os aracnídeos da espécie *L. erythrognatha* são também chamados de aranha-de-grama ou aranha-de-jardim. Quando adultos os indivíduos dessa espécie possuem cerca de 5 centímetros de comprimento e apresentam coloração variando do marrom-claro ao cinza.



Figura 3-1 - *Lycosa erythrognatha*, fotografia retirada de <http://npabombeiro.blogspot.com.br/2015/07/conheca-aranha-de-grama-lycosa.html>

Seu veneno causa, além de uma dor intensa, sensação de queima e formigação. Apesar disso, devido a sua atividade principalmente proteolítica, não requer um soro específico. O isolamento do veneno pelo grupo coordenado pela professora Maria Elena Lima do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG levou ao estudo de sua estrutura pelo nosso grupo.

O peptídeo original LyeTx I é composto por 25 aminoácidos e é naturalmente amidado na porção C-terminal, tendo sido sua estrutura tridimensional em meio mimético de membrana já elucidada por RMN (SANTOS, VERLY, *et al.*, 2010).

A fim de buscar uma maior compreensão da atividade antimicrobiana desse peptídeo o grupo do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pela professora Maria Elena Lima realizou, em parceria com o nosso grupo de pesquisa, a síntese de peptídeos modificados derivados do LyeTx I, sendo um deles a LyeTx I mn Δ K Ac (Figura 3-2). O peptídeo modificado foi testado e apresentou atividade antimicrobiana significativa (JÚNIOR, 2015). Neste trabalho são propostos estudos estruturais do peptídeo

LyeTx I mnΔK Ac por RMN em solução e cálculos estruturais utilizando como método de minimização de energia o *simulated annealing*.

Peptídeo	Sequência
LyeTx I	IWLTA LKFLG KNLGK HLAQK QLAKL-NH ₂
LyeTx I mnΔK Ac	CH ₃ CO-IWLTK ALKFL GKNLG K-NH ₂

Figura 3-2 - Quadro com as sequências de resíduos de aminoácidos de LyeTx I e LyeTx I mnΔK Ac

3.1.2 Assinalamento sequencial de ressonâncias de peptídeos por RMN em solução

A partir da década de 80 a espectroscopia de RMN se tornou uma técnica de extremo interesse para a elucidação estrutural de biomacromoléculas. Isso é considerado um avanço pois, até então, essas elucidações tinham que ser realizadas apenas por difração de raios-X, que apesar de extremamente importante e precisa, apresenta uma grande dificuldade na preparação de amostra, já que requer a formação de monocristais, cuja obtenção é de extrema dificuldade no caso de macromoléculas.

Em 1986, Kurt Wüthrich introduz a metodologia de determinação estrutural de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, a partir de seus sistemas de *spin* das unidades formadoras (aminoácidos ou nucleotídeos) (WÜTHRICH, 1986). A partir dessa data a utilização dos mapas de contornos de TOCSY, NOESY, ¹H-¹⁵N HSQC e ¹H-¹³C HSQC tornou-se amplamente difundida para a determinação da estrutura tridimensional dessas biomacromoléculas.

Para a proposição de uma estrutura peptídica por meio de técnicas que utilizam a RMN em solução a partir da metodologia proposta por Kurt Wüthrich, deve-se analisar simultaneamente os mapas de contornos 2D-TOCSY e 2D-NOESY.

Nos mapas de contornos 2D-TOCSY são observadas correlações intrarresiduais, ou seja, obtêm-se informações sobre as conectividades entre os átomos de hidrogênio dentro de um mesmo resíduo de aminoácido da cadeia peptídica. Isso ocorre pois, durante esse experimento, há um tempo no qual a magnetização de um átomo de hidrogênio pode ser transferida para outro por meio de ligações químicas (acoplamento escalar *J*). Desse modo, enquanto existirem átomos hidrogenados no respectivo sistema de *spin*, a magnetização pode ser transferida e as ressonâncias dos hidrogênios podem ser correlacionadas.

Como um peptídeo é formado pela união de aminoácidos, há sempre a formação de uma ligação peptídica, que interrompe a transferência de magnetização devido à presença da

carbonila. Devido a isso, o sistema de *spins* de cada resíduo de aminoácido presente na sequência pode ser determinado.

Quanto maior o número de ligações químicas entre os hidrogênios, menos eficiente é a transferência de magnetização entre eles. Desse modo correlações relativas a hidrogênios distantes por várias ordens de ligação, como, $H_N-N-C_\alpha-C_\beta-C_\gamma-H_y$ podem não ser detectadas, ou serem bem menos intensas que correlações referentes a menores ordens de ligação, como, $H_N-N-C_\alpha-H_\alpha$.

Os mapas de contornos 2D-NOESY fornecem informações sobre as vizinhanças espaciais através de interações de acoplamento dipolar entre hidrogênios vizinhos. Dessa forma, ressonâncias de hidrogênios próximos espacialmente podem correlacionar entre si. Devido à proximidade espacial, correlações intrarresiduais podem ser observadas no mapa de contornos NOESY, entretanto correlações inter-residuais também podem ser detectadas, desde que os núcleos em questão sejam espacialmente vizinhos.

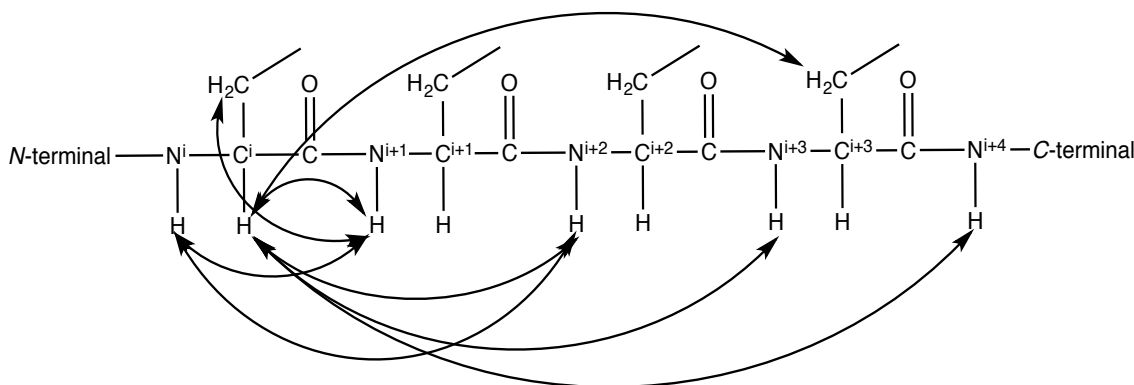


Figura 3-3 - Representação das correlações típicas de estruturas do tipo α -hélice

Em particular, as correlações de NOE a média distância ($i, i+j$, sendo $2 \leq j \leq 5$) são indicadores importantes de motivos de estruturas secundárias. Motivos estruturais tipo α -hélice apresentam correlações de NOE bem características, principalmente $NN (i, i+2)$; $\alpha N (i, i+3)$; $\alpha N (i, i+4)$ e $\alpha\beta (i, i+3)$, além de outras mais comumente observadas como $NN (i, i+1)$; $\alpha N (i, i+1)$; $\alpha N (i, i+2)$; e $\beta N (i, i+1)$ (Figura 3-3).

O cálculo teórico para a determinação da estrutura tridimensional do peptídeo é realizado, utilizando-se dois parâmetros. O primeiro desses parâmetros são as restrições de distância obtidas a partir das intensidades das correlações do mapa de contornos 2D-NOESY. Essas distâncias são classificadas em faixas semi-quantitativas, de acordo com as intensidades ou volumes dos sinais de NOE obtidos. O segundo parâmetro que pode ser utilizados são as restrições de ângulos diedro, obtidas a partir dos deslocamento químico ou constantes de acoplamento dos átomos do esqueleto do peptídeo. Para a determinação desses valores de

deslocamento químicos são realizados experimentos ^1H - ^{13}C e ^1H - ^{15}N HMQC ou HSQC, ao passo que os valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ são normalmente obtidos por experimentos de DQF-COSY.

A partir desses dados, várias estruturas são calculadas utilizando o método do *simulated annealing* e as estruturas de menor energia analisadas em conjunto.

3.2 Objetivos

O objetivo desse capítulo é a realização de estudos conformacionais do peptídeo sintético LyeTx I mn Δ K Ac em solução de $\text{H}_2\text{O}:\text{TFE-}d_2$ (60:40), a partir de dados de Ressonância Magnética Nuclear em solução e de cálculos computacionais.

3.3 Metodologia

3.3.1 Preparo da amostra de LyeTx I mn Δ K Ac

Para a elucidação estrutural do peptídeo LyeTx I mn Δ K Ac, preparou-se uma amostra dissolvendo-se 2,3 mg de peptídeo, previamente sintetizado por colaboradores, em uma solução 60:40 TFE- d_2 : H_2O , na presença tampão fosfato pH 7,0 a 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) a uma concentração de 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi utilizado como padrão interno de referência para ressonâncias de ^1H e ^{13}C .

3.3.2 Experimentos de RMN em solução com o peptídeo LyeTx I mn Δ K Ac

Foram realizados os experimentos de correlação heteronucleare de RMN em duas dimensões ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* e homonucleare DQF-COSY, TOCSY (tempo de mistura de 60 ms) e NOESY (experimentos realizados para diferentes tempos de mistura – 60, 100, 150 e 200 ms – para se avaliar difusão de *spin*). Os experimentos realizados a 20 °C em um espectrômetro Bruker Avance III 600 pertencente ao Centro Nacional de RMN Jiri Jonas no Rio de Janeiro. Uma sonda de 5 mm de tripla ressonância ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$), equipada com bobina para o emprego de pulsos de gradiente de campo, foi utilizada para as aquisições. A supressão do sinal da água foi efetuada por pré-saturação. O *software* Topspin[®] da Bruker foi utilizado durante a aquisição dos experimentos e os espectros obtidos foram processados com a suíte de *softwares* NMRPipe[®] (NMRPipe

Spectral Processing and Analysis System®) (DELAGLIO, GRZESIEK, *et al.*, 1995). Os sinais dos espectros de RMN obtidos foram analisados e atribuídos com auxílio do *software* NMRView® (JOHNSON e BLEVINS, 1994).

As correlações de NOE obtidas no mapa de contornos 2D-NOESY com tempo de mistura de 150 ms tiveram suas intensidades convertidas em restrições de distâncias, as quais foram calibradas segundo algoritmos propostos por Hyberts e co-autores (HYBERTS, GOLDBERG, *et al.*, 1992). Os limites máximos de restrições de geometria obtidos foram de 2,8, 3,4 e 5,0 Å (NOEs fortes, médios e fracos, respectivamente). Os assinalamentos e calibrações das restrições de NOE foram realizados com auxílio do *software* NMRView®. Os deslocamentos químicos dos átomos do esqueleto peptídico foram convertidos em restrições de ângulo diedro, utilizando-se o *software* TALOS+ (SHEN, DELAGLIO, *et al.*, 2009). Cálculos da estruturas dos peptídeos foram realizados com o *software* Xplor-NIH, versão 2.37 (SCHWIETERS, KUSZEWSKI, *et al.*, 2003). Partindo-se da estrutura estendida, 100 estruturas eram geradas utilizando-se um protocolo de *simulated annealing*. Procederam-se 18000 passos de *simulated annealing* a 1000K, com o subsequente decréscimo na temperatura em 9000 passos no primeiro estágio de processo de resfriamento. O controle estereoquímico das estruturas de menor energia geradas foi realizado com o *software* PROCHECK-NMR (LASKOWSKI, RULLMANN, *et al.*, 1996). A manipulação, a visualização e a análise das estruturas tridimensionais obtidas foram realizadas com auxílio do *software* MOLMOL (KORADI, BILLETER e WÜTHRICH, 1996).

3.4 Resultados

A análise dos mapas de contornos de ^1H - ^{13}C HSQC foram utilizados para a determinação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono da estrutura do peptídeo.

A sobreposição de algumas correlações (Figura 3-4) se deve à grande repetição de resíduos na estrutura. Nas posições 3 e 10, por exemplo, estão presentes resíduos de leucinas, ao passo que nas posições 5 e 8 se encontram resíduos de lisina, o que leva a superposições de ambos os pares das correlações. A sobreposição parcial das correlações dos resíduos 7, leucina, e 12, lisina, se deve ao fato do deslocamento químico dos $\text{C}\alpha$ de ambos os resíduos estarem na mesma faixa.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 I W L T K A L K F L G K N L G K

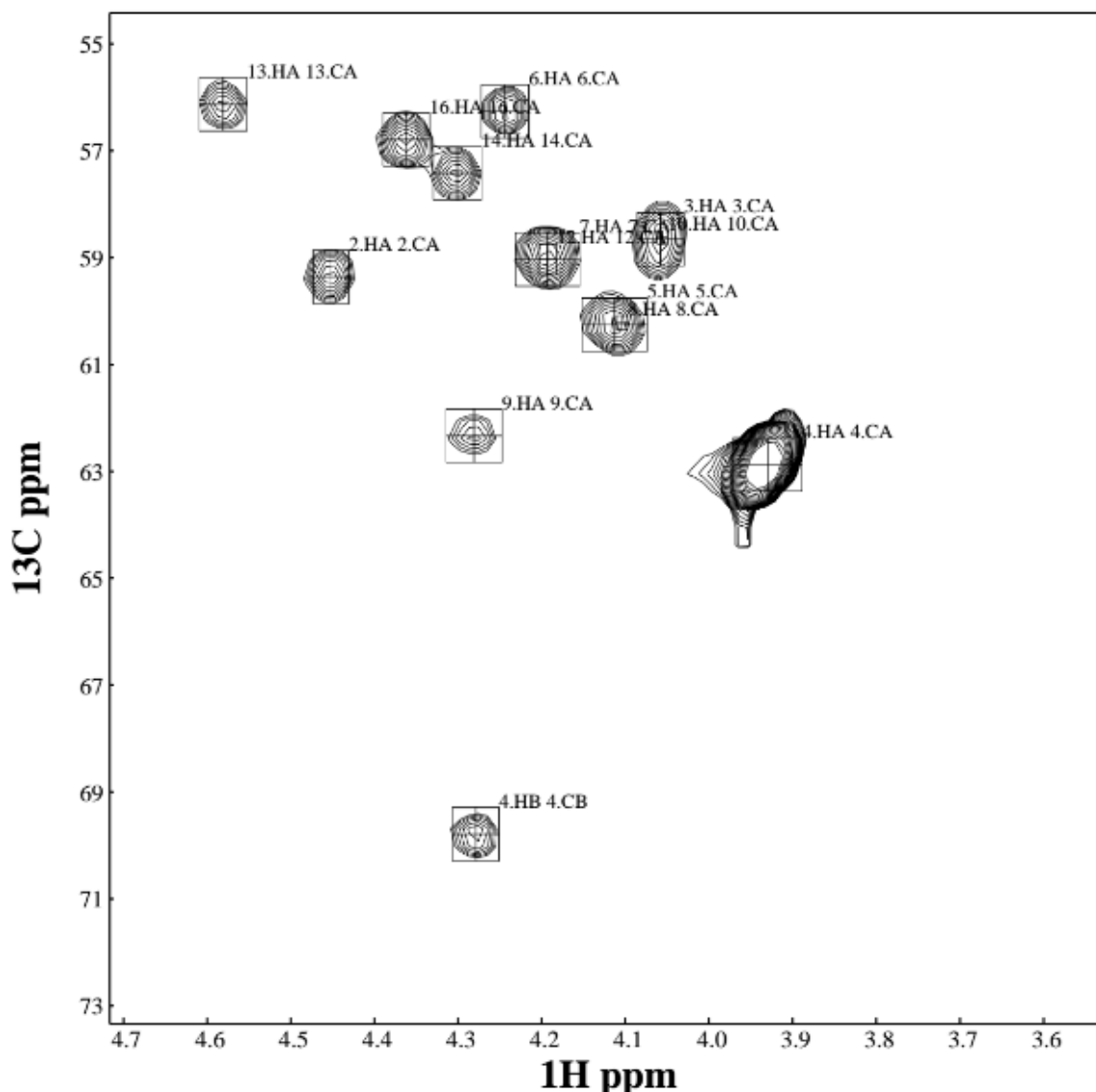


Figura 3-4 - Seção do mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC referente a algumas correlações $\text{C} \alpha \text{H} \alpha$ para a LyeTx I mnAK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$ (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L^{-1}).

A análise do mapa de contorno ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* foi bem menos laboriosa, já que o número de correlações é significativamente menor do que no mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC. Além disso, a dispersão dos sinais foi suficiente, para que ocorresse apenas uma sobreposição de correlações, referente às correlações $\text{H}_\text{N}\text{N}$ dos resíduos 5 e 16, ambos lisinas. Vale a pena ressaltar que foi observada a correlação referente ao resíduo de Ile-1, o que é possível devido à acetilação da porção *N*-terminal, que confere uma ligação amídica extra para este peptídeo. Ressalta-se ainda que a dispersão de deslocamentos químicos de ^1H e ^{15}N observada nesse mapa de contornos é indicativa de um arranjo estrutural para o peptídeo no meio estudado.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 I W L T K A L K F L G K N L G K

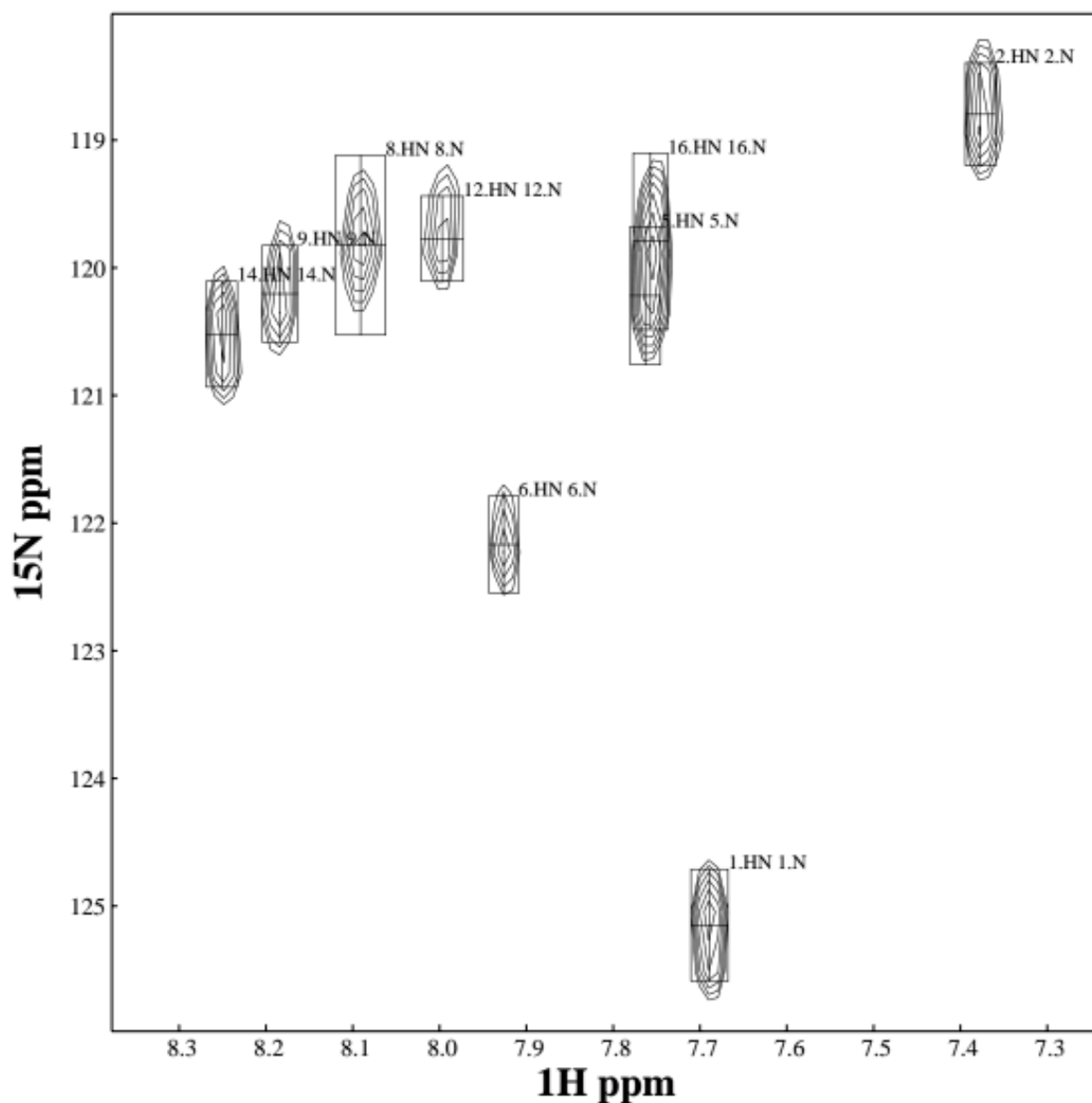


Figura 3-5 - Seção mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC *sofast* referente a algumas correlações para a LyeTx I mnAK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em TFE- d_2 : H_2O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L^{-1}).

Ainda foi possível detectar uma correlação referente à cadeia lateral do resíduo Trp-2, centralizada em 9,86 e 127,82 ppm, para os deslocamentos químicos de hidrogênio e nitrogênio, respectivamente.

Várias correlações sequenciais do tipo $\text{H}_\text{N}\text{H}_\text{N}$ (i, i+1) e do tipo $\text{H}_\alpha\text{H}_\text{N}$ (i, i+1) foram detectadas no mapa de contornos NOESY, o que facilitou bem o assinalamento da sequência polipeptídica. Várias correlações a média distância, com destaque correlações do tipo $\text{H}_\alpha\text{H}_\text{N}$ (i, i+4), foram observadas, o que indica a existência de um motivo estrutural de natureza α -hélice para o peptídeo no meio estudado. Ressalta-se a detecção da correlação $\text{H}_\alpha\text{H}_\text{N}$ (i, i+4)

entre os resíduos de isoleucina-1 e a lisina-5, o que indica que a estruturação em α -hélice inicia-se desde a porção *N*-terminal do peptídeo. Expansões do mapa de contornos NOESY são apresentadas nas Figura 3-6 e Figura 3-7.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	W	L	T	K	A	L	K	F	L	G	K	N	L	G	K

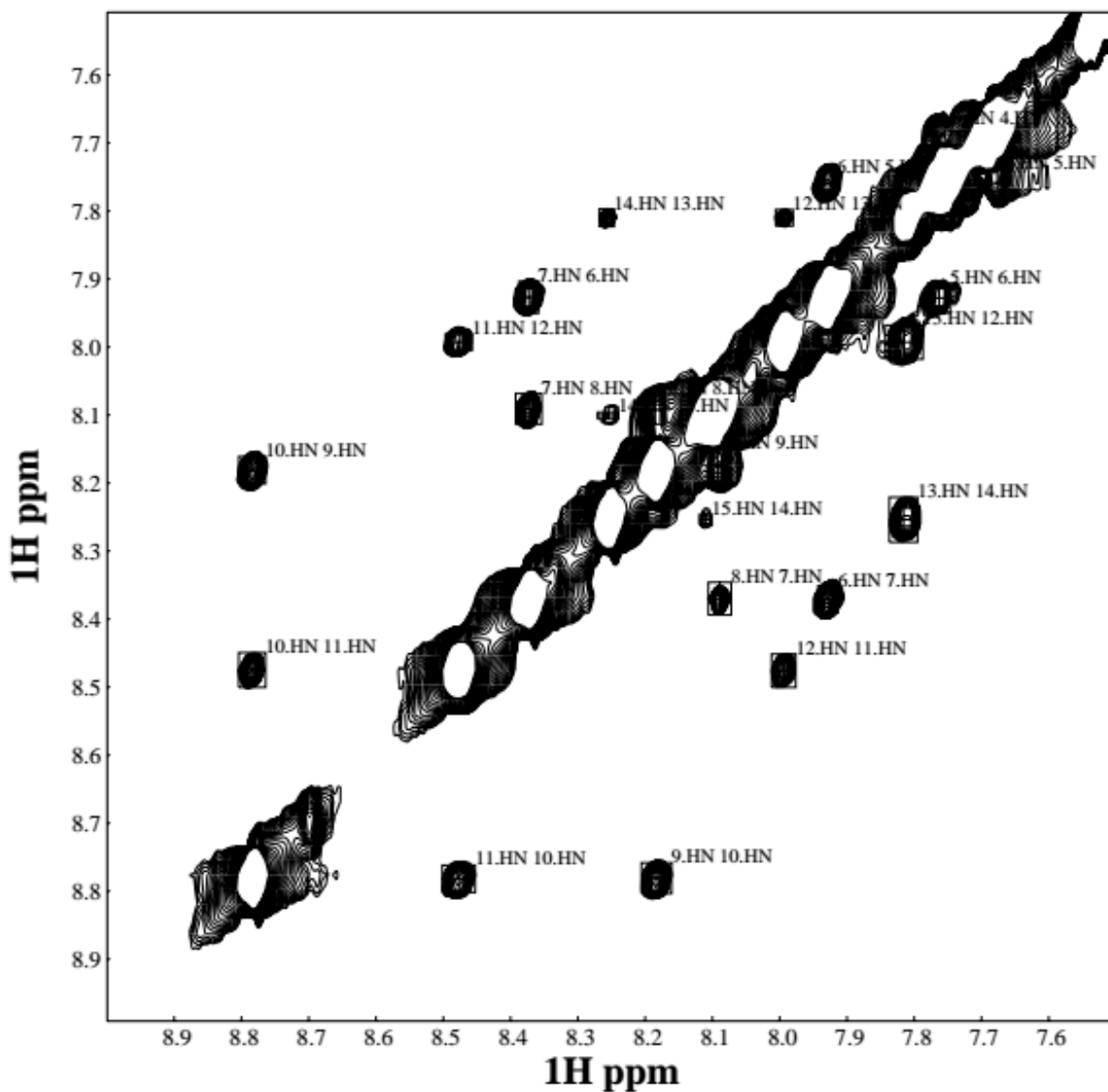


Figura 3-6 - Seção mapa de contornos NOESY mostrando correlações do tipo $H_N H_N$ para a LyeTx I $m\Delta K$ Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$ (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L^{-1}).

No entanto a análise do mapa de contornos TOCSY provou-se difícil devido à grande sobreposição de correlações referente às ressonâncias das cadeias laterais. Isso ocorreu pois, dos 16 resíduos de aminoácidos presentes, quatro são resíduos de leucinas e quatro são resíduos de lisinas, ambos caracterizados por sistemas de *spins* complexos. Abaixo é apresentada a região de impressão digital, ou seja, correlações do tipo $H_\alpha H_N$ do mapa de

contornos TOCSY, na qual foi possível se localizarem correlações de todos os resíduos de aminoácidos.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I	W	L	T	K	A	L	K	F	L	G	K	N	L	G	K

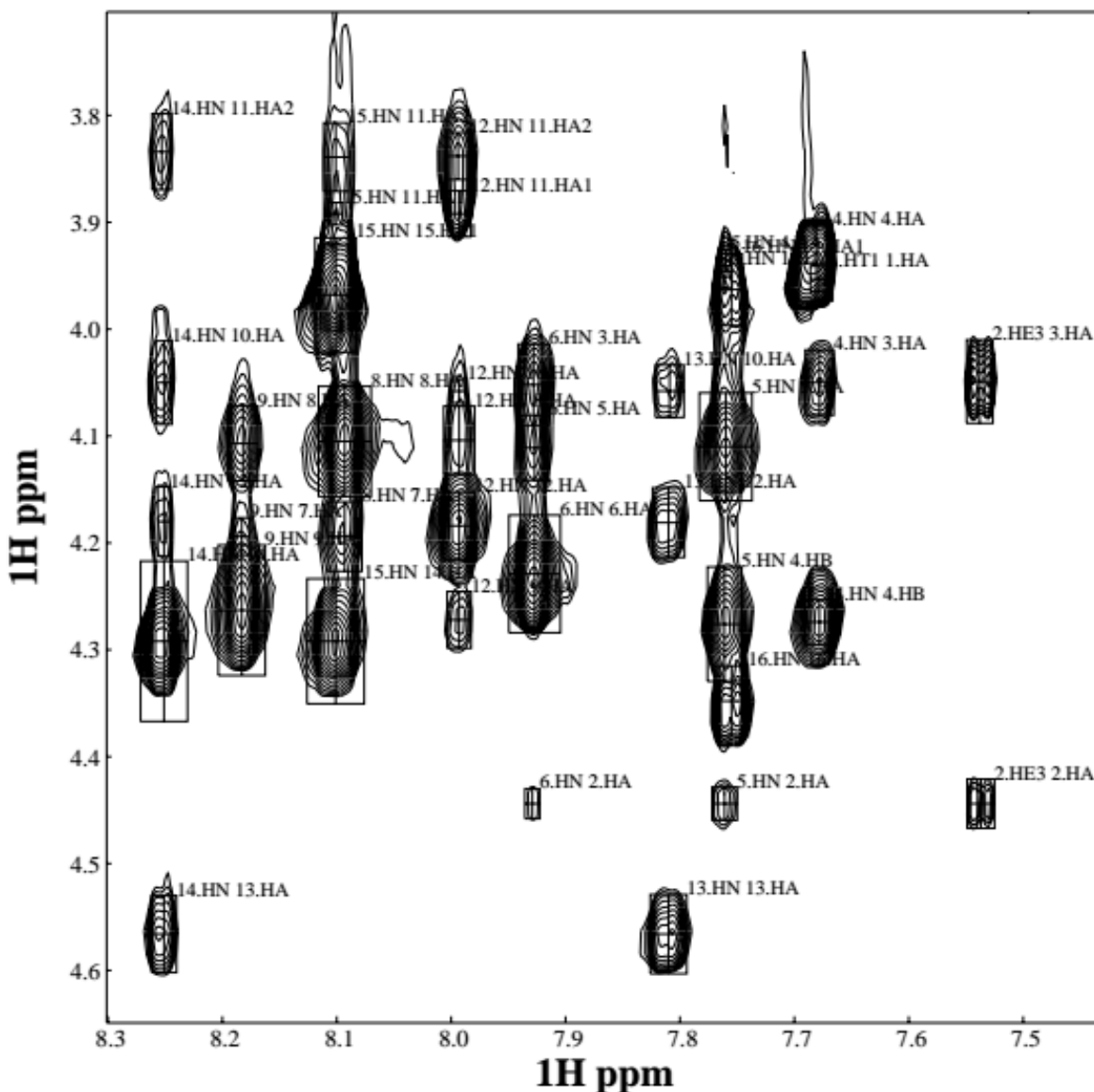


Figura 3-7 - Seção mapa de contornos NOESY mostrando, principalmente, correlações do tipo $H_{\alpha}H_N(i, i+4)$ para a LyeTx I mnAK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em TFE- d_2 : H_2O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L^{-1}).

A partir da análise dos mapas de contornos TOCSY e NOESY os sistemas de *spins* puderam ser identificados, e, desse modo foi possível construir uma lista com todas as correlações de NOE assinaladas. As correlações de NOE tiveram então suas intensidades convertidas em restrições de distância semi-quantitativas, conforme discutido na seção 3.3.2 (p. 49), estando sumariados na Figura 3-9 abaixo as restrições características de motivos de estrutura secundária do tipo α -hélice.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 I W L T K A L K F L G K N L G K

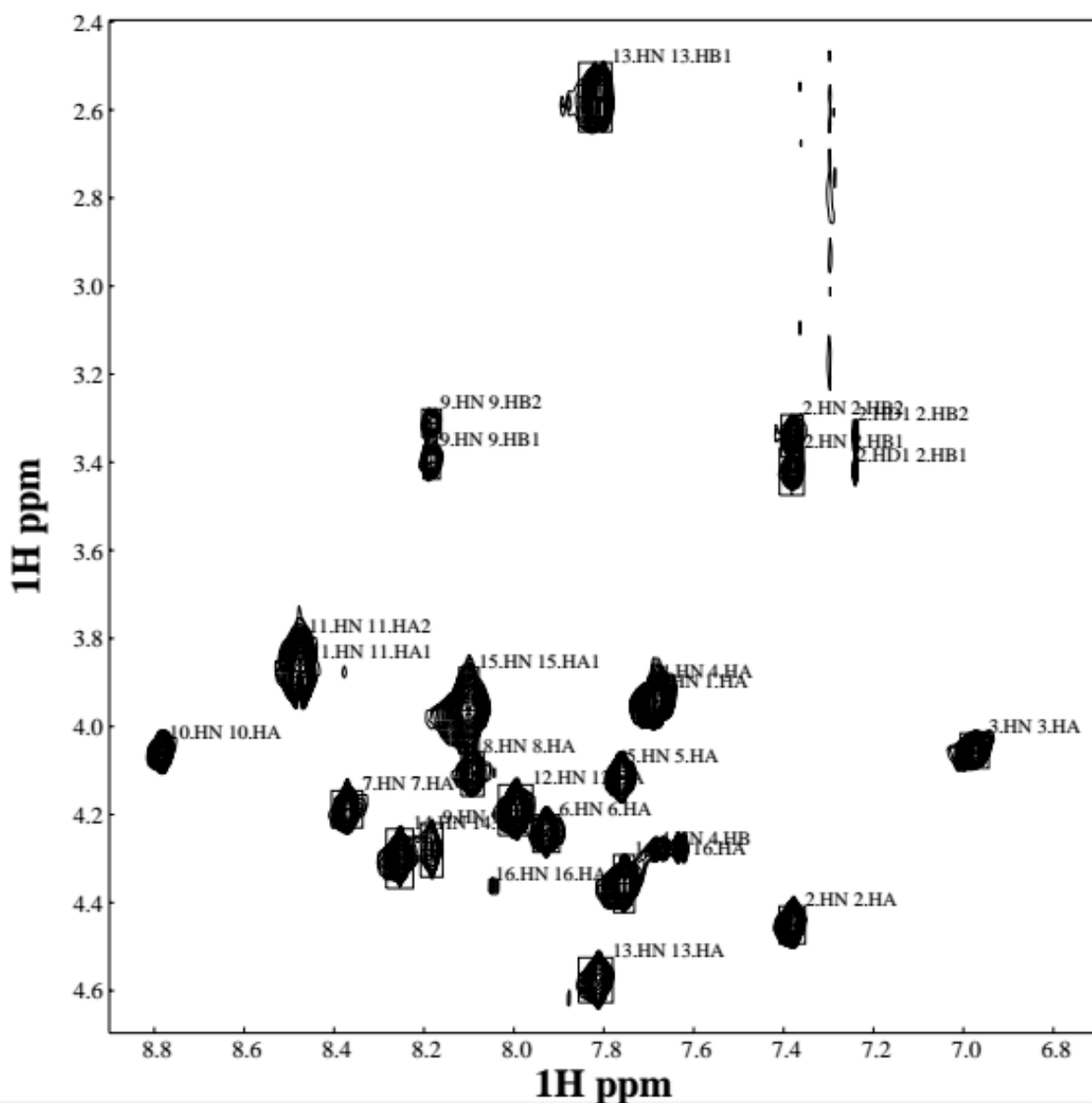


Figura 3-8 - Seção mapa de contornos TOCSY mostrando, principalmente, correlações do tipo $H_{\alpha}H_N$ para a LyeTx I mnΔK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em TFE- d_2 : H_2O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20 mmol.L^{-1}).

Os deslocamentos químicos de H_{α} , H_{β} , C_{α} , C_{β} e N, obtidos pelos experimentos de RMN-2D, foram utilizados para o cálculo das restrições de ângulos diedro pelo *software* TALOS+, tendo os resultados de saída indicado, com alta confiabilidade, que o peptídeo apresenta um conformação helicoidal entre os resíduos de Trp-2 e Gly-15, conforme apresentado a seguir na Figura 3-10 (ressalta-se que as restrições de ângulos de diedro para os resíduos das porções *N*- e *C*-terminais não são avaliadas por esse *software*).

Correlação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	-NH ₂
	I	W	L	T	K	A	L	K	F	L	G	K	N	L	G	K	-NH ₂
NN (i,i+1)																	
α N (i,i+1)																	
β N (i,i+1)																	
α N (i,i+2)																	
α N (i,i+3)																	
$\alpha\beta$ (i,i+3)																	
α N (i,i+4)																	

Figura 3-9 - Correlações de NOE características de estrutura secundária obtidas a partir da análise do mapa de contornos NOESY do peptídeo LyeTx I mn Δ K Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-d₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). As linhas finas correspondem a restrições de distância fracas (entre 5,0 e 1,8 Å), as linhas com larguras intermediárias a restrições de distância médias (entre 3,4 e 1,8 Å) e as linhas grossas a restrições de distância fortes (entre 2,8 e 1,8 Å),

Os valores de CSI (*chemical shift index*) obtidos corroboram a qualidade dos resultados de restrição obtidos, uma vez que os valores próximos a -1 para todos os resíduos (sem interrupções) entre as posições 2 e 15, indicam uma conformação favorável em α -hélice. Valores consecutivos próximos a +1 seriam indicativos um motivo estrutural em conformação- β ou valores próximos a 0 indicariam região não estruturada.

A análise do gráfico de RCI – S² da Figura 3-10 confirmam a rigidez da conformação estrutural obtida. Valores de S² para o RCI (*random coil index*) menores do que 0,5 indicariam uma região flexível, no entanto os valores obtidos para toda a estrutura encontram-se bem superiores a 0,5, reforçando os resultados obtidos para a boa estruturação do peptídeo no meio descrito.

As restrições de ângulo diedro e de distância foram adicionadas empregadas em uma rotina de *simulated annealing* do Xplor-NIH (seção 2.5.4, p. 26), tendo sido calculadas 100 estruturas. As dez estruturas mais estáveis foram então selecionadas para compor o conjunto

de geometrias que representa o modelo para a estrutura da LyeTx I mnΔK Ac no meio investigado.

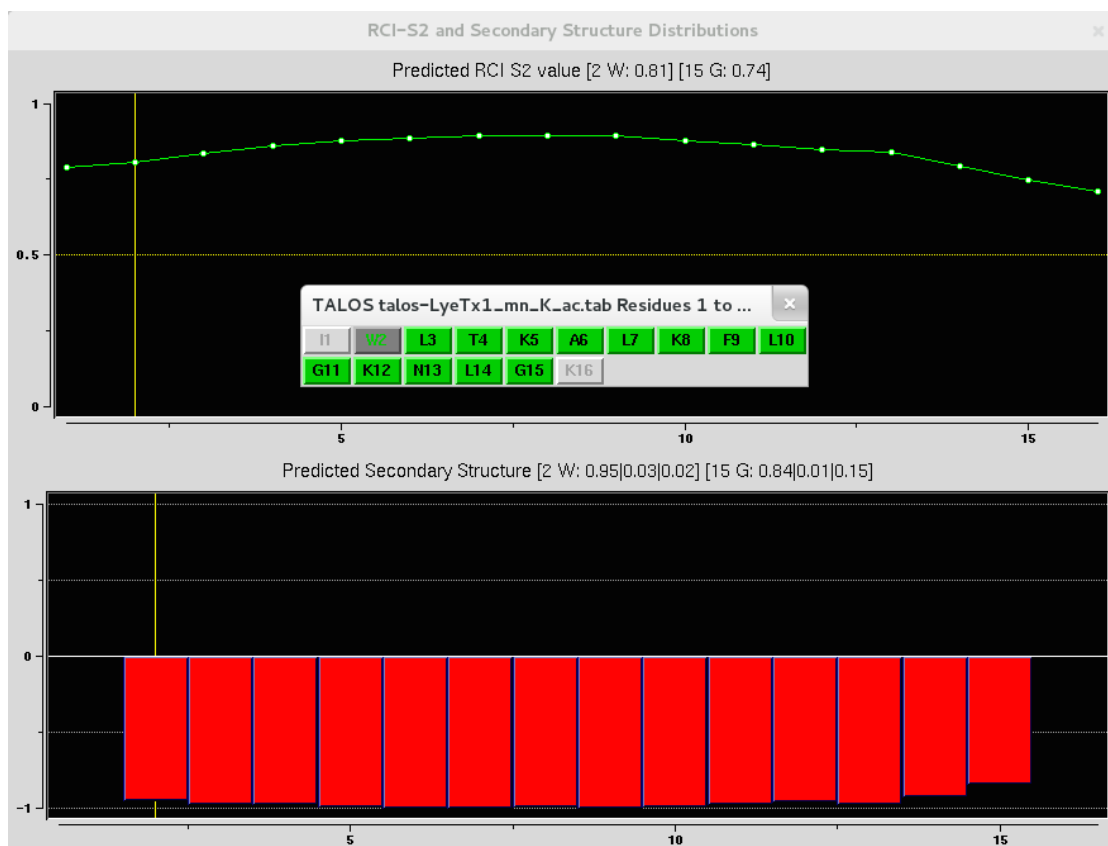


Figura 3-10 - Resultados obtidos pelo *software* TALOS+ para o peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-d₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). Os resíduos marcados em verde indicam boa qualidade das restrições de ângulo diedro obtidas e a não existência de ambiguidade de deslocamentos químicos para todos os resíduos entre o Trp-2 e a Lys-15. Na parte superior a curva em verde conecta os valores de RCI - S² para os resíduos e na parte inferior são apresentados os valores de CSI para os resíduos de aminoácidos em vermelho.

A análise do diagrama de Ramachandran (Figura 3-11) para a LyeTx I mnΔK Ac indica que todos os resíduos de todas as dez estruturas analisadas possuem os valores de ângulo diedro inseridos nas regiões mais favoráveis para a formação de motivos estruturais em α -hélice.

Os resultados obtidos indicam então que o peptídeo apresenta uma conformação α -helicoidal entre os resíduos de Ile-1 e Gly-15. A superposição para os átomos pesados de todos os resíduos das dez estruturas mais estáveis levou a um valor de RMSD de $0,70 \pm 0,22$ Å, sendo esse parâmetro bem significativo, uma vez que um baixo desvio é um indicativo da concordância entre as estruturas mais estáveis, o que por sua vez aumenta a confiabilidade dos cálculos e do modelo obtido.

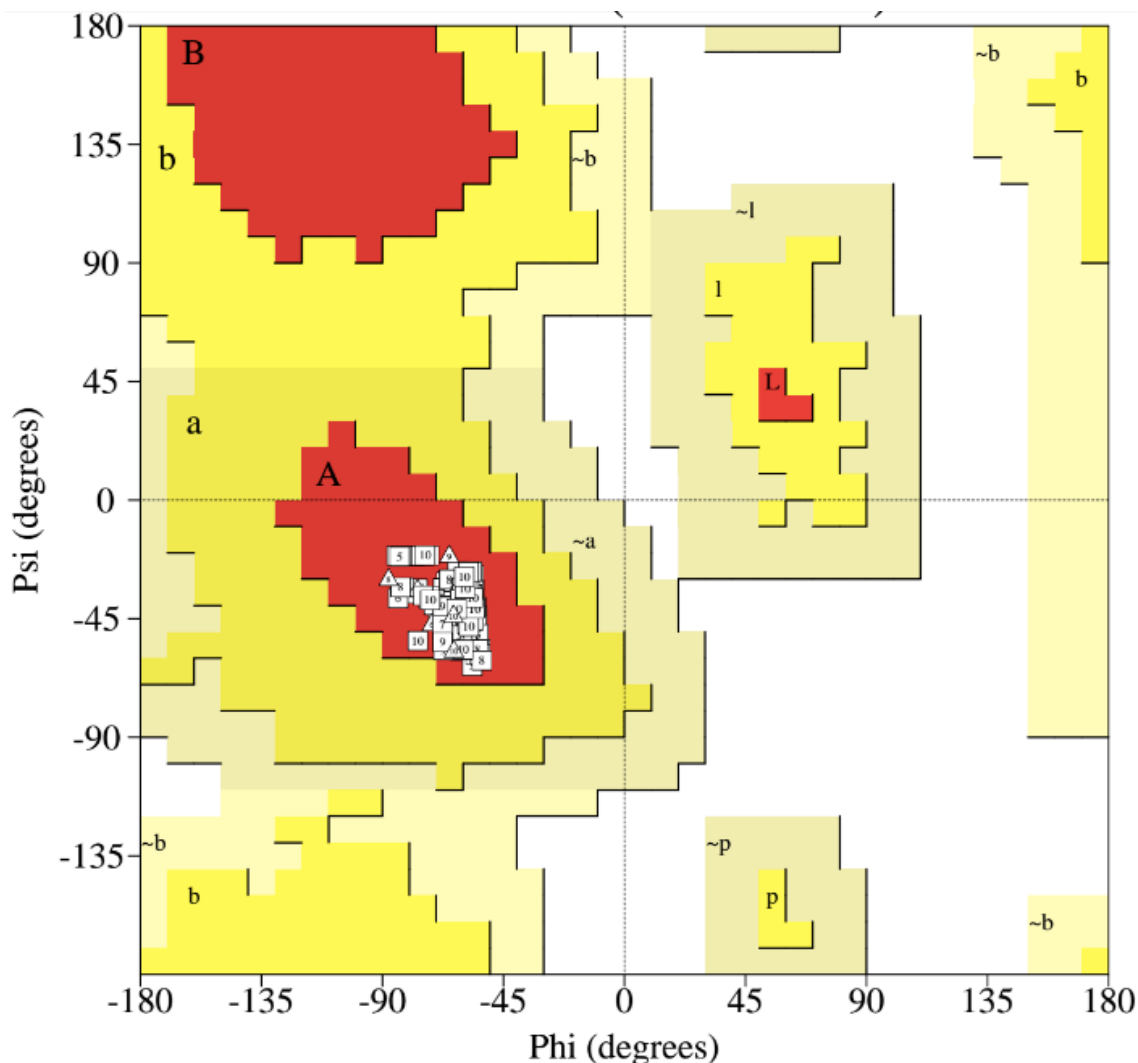


Figura 3-11 - Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$ (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). "Regiões mais favoráveis" em vermelho, "regiões adicionalmente favoráveis" em amarelo, "regiões generosamente favoráveis" em bege e "regiões proibidas" em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (LASKOWSKI, RULLMANN, *et al.*, 1996)

Os dados estatísticos da análise estrutural do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac estão sumariados na Tabela 3-1.

Em muita das vezes, a atividade antimicrobiana de peptídeos está relacionada as características anfipáticas. No conjunto de estruturas mais estáveis, pode-se claramente ver uma face com características mais hidrofílicas e outra com características mais hidrofóbicas

Todavia, pode-se perceber a presença de um resíduo polar de asparagina (Asn-13) ao longo da face mais hidrofóbica (Figura 3-12 C). Vale a pena ressaltar que o resíduo de asparagina, apesar de hidrofílico, apresenta uma polaridade bem menos pronunciada que outros resíduos desta sequência, como os quatro resíduos de lisina. Este peptídeo foi obtido a partir de modificações na estrutura química da LyeTx I, tendo se destacado por apresentar atividades antimicrobianas bem pronunciadas, seção 3.1.1 (p. 45)

Tabela 3-1 - Tabela sumariando a estatística do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a 2,0 mmol.L⁻¹ em TFE-d₂:H₂O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mmol.L⁻¹). ^a Resultados obtidos com o *software* MOLMOL. ^b Resultados obtidos com o *software* TALOS+.

Restrições de Distância	
Número total de restrições de distância	220
Número de restrições intrarresiduais	154
Número de restrições sequenciais (i, i+1)	42
Número de restrições a médias distâncias (i, i+j) _{j=2,3,4}	24
RMSD (Å) – todos os resíduos^a	
Esqueleto	0,70 ± 0,22
Esqueleto e átomos pesados	1,49 ± 0,36
Análise do diagrama de Ramachandran^b	
Resíduos em regiões mais favoráveis	120 (100%)
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	0 (0%)
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0 (0%)
Resíduos em regiões proibidas	0 (0%)

Curiosamente a estrutura obtida por RMN, apesar de possuir certo caráter anfipático, apresenta uma descontinuidade em sua face hidrofóbica, não sendo portanto tão anfipática como as estruturas de outros peptídeos antimicrobianos, como as filoseptinas (RESENDE, 2008) e a DDK (VERLY, MORAES, *et al.*, 2009). Entretanto, a própria LyeTx I nativa não apresenta caráter anfipático significativo (SANTOS, VERLY, *et al.*, 2010).

Uma estrutura peptídica, que apresenta descontinuidade similar é a cadeia monomérica da Homotarsinina cuja face hidrofóbica é interrompida pela presença de um resíduo de lisina (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016). No caso da homotarsinina dimérica, a estrutura tridimensional de RMN mostrou que essa descontinuidade na face hidrofóbica tem uma função estrutural importante, sendo responsável por realizar interações iônicas com resíduos de Aspartato e de serina da outra cadeia, o que contribui para a estabilização da conformação em super-hélice do dímero (VERLY, RESENDE, *et al.*, 2016). Em trabalhos futuros, pode ser válida a realização a síntese de um derivado da LyeTx I mnΔK, substituindo-se o resíduo de Asn-13 por um resíduo hidrofóbico, a fim de se comparar as atividades desses dois peptídeos.

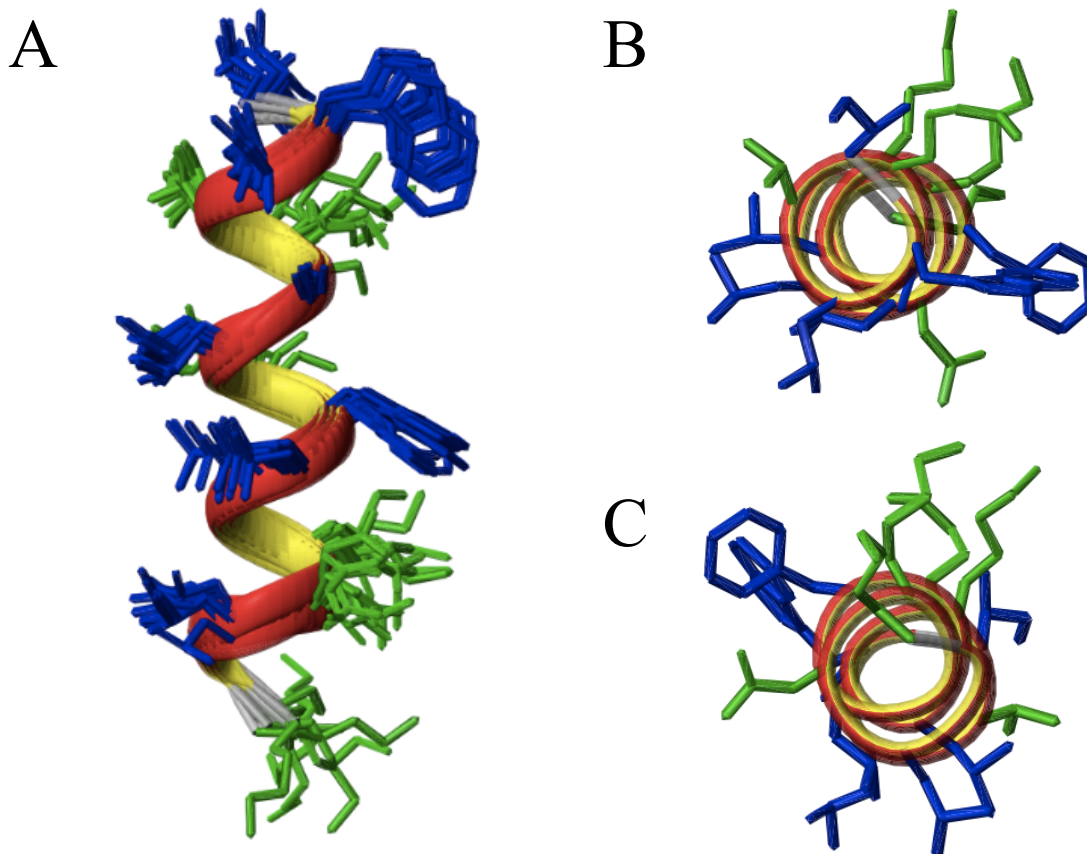


Figura 3-12 - Resultados obtidos para a LyeTx I mnΔK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em $\text{TFE-}d_2\text{:H}_2\text{O}$ (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). As cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos estão representadas em azul e as dos resíduos hidrofílicos estão representadas em verdes. (A) Conjunto das dez estruturas de menor energia evidenciando a face de caráter mais hidrofóbico. A fração C-terminal aponta para a parte inferior da Figura. (B) Estrutura de menor energia do peptídeo sendo evidenciada no sentido N-terminal para o sentido C-terminal. Nessa representação percebe-se que a cadeia lateral da Ile-1 faz parte da face de caráter mais hidrofílico. (C) Estrutura de menor energia do peptídeo sendo evidenciada no sentido C-terminal para o sentido N-terminal. Nessa representação percebe-se que a cadeia lateral do resíduo de Asn-13 se encontra na face de caráter mais hidrofóbico do peptídeo.

Ao se compararem as estruturas da LyeTx I nativa (SANTOS, VERLY, *et al.*, 2010) e do derivado LyeTx I mnΔK Ac, percebem-se diferenças consideráveis de estruturação nas proximidades da porção N-terminal. De forma geral, a LyeTx I mnΔK Ac apresenta uma helicidade significativamente maior (93,8 % - resíduos 1 ao 15) (Figura 3-13 - A) que a LyeTx I (76,0 % - resíduos 6 à amidação C-terminal na posição 25) (Figura 3-13 - B).

Um dos fatores que certamente é importante para a maior estabilidade estrutural na porção N-terminal é a acetilação do resíduo de Ile-1, uma vez que essa modificação possibilita a existência de uma interação de ligação de H extra do tipo $\text{CO}\cdots\text{HN } i, i+4$, entre o sítio da acetilação e o resíduo de Thr-4. A estabilização da estrutura em α -hélice é claramente confirmada nas proximidades da porção N-terminal, ao se observarem as correlações HN, $\text{H}\alpha$ do tipo $i, i+4$, entre os resíduos I-1/K-5, W-2/A-6 e L-3/L-7. Em trabalhos futuros do grupo é de interesse realizarem-se estudos estruturais por RMN do

derivado peptídico não acetilado na porção *N*-terminal, a fim de se verificar a importância dessa modificação na estrutura do peptídeo.

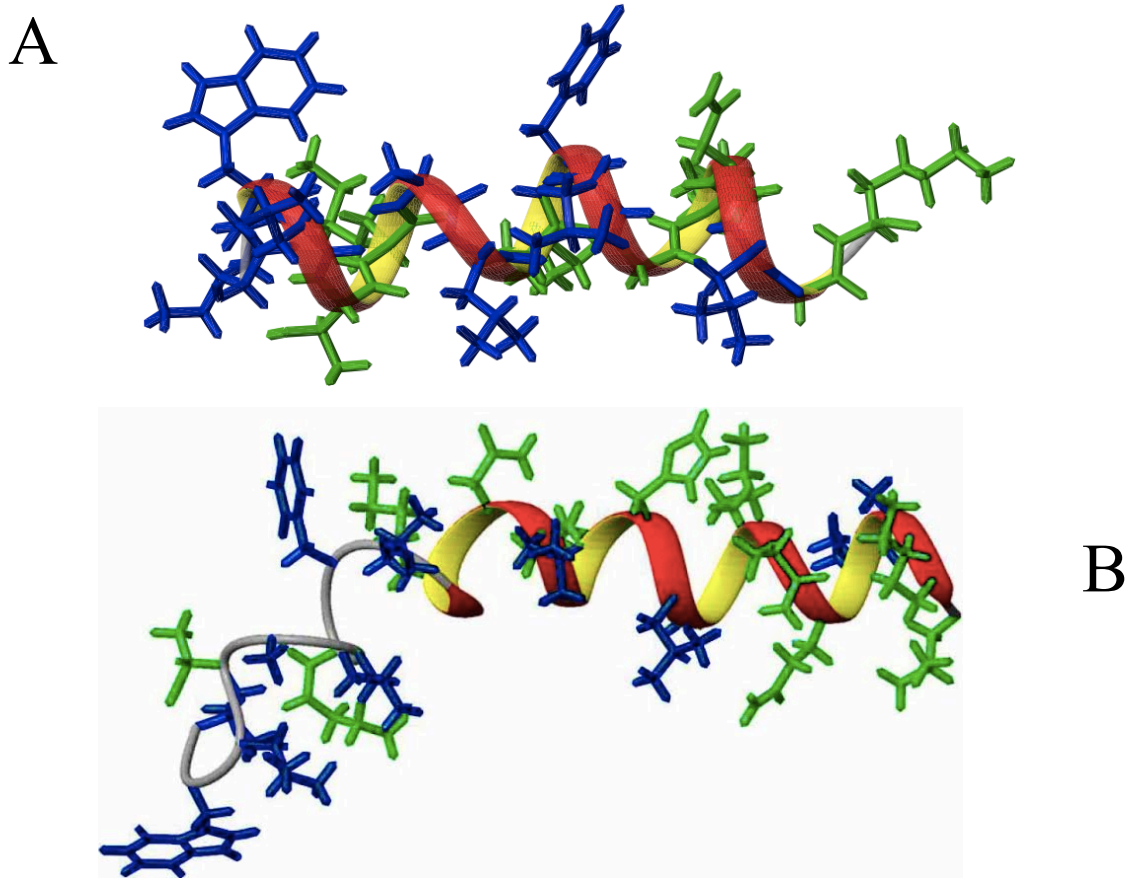


Figura 3-13 - (A) Estrutura de menor energia do peptídeo LyeTx I mnΔK Ac a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). (B) Estrutura de menor energia do peptídeo LyeTx I a $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em solução micelar de DPC- d_{38} 400 mmol.L^{-1} e pH 7,0 (tampão fosfato $20,0 \text{ mmol.L}^{-1}$). Os resíduos hidrofílicos estão representados em verde e os hidrofóbicos em azul (VERLY, 2010).

3.5 Conclusões

Os resultados obtidos com o peptídeo LyeTx I mnΔK Ac mostraram que esse peptídeo apresenta alto grau de estruturação α - helicoidal, tendo-se obtido restrições geométricas, que possibilitaram a determinação da estrutura de alta resolução do peptídeo. Esse peptídeo é derivado ativo da LyeTx I, sendo ele mais simples e, portanto, mais barato que o peptídeo nativo. O peptídeo bioativo estudado neste trabalho foi obtido após várias modificações do peptídeo nativo e, curiosamente, apresenta um percentual de estruturação helicoidal mais significativo que o peptídeo nativo, característica que pode ser importante para a atividade do mesmo.

Capítulo 4 Anexos

ANEXO A

Tabela 4-1 - Tabela dos valores de desdobramento quadrupolar de deutério em função do tempo para solução de bicelas de 14-*O*-PC e de 6-*O*-PC ($q = 3$) a 5% m/m em H₂O e D₂O (95:5) em diferentes campos a 316 K

Tempo / min	Desdobramento quadrupolar do deutério / Hz		
	9.4 Tesla	11.75 Tesla	18.8 Tesla
0	0	0	0
1	9,74	12,85	19,77
2	16,24	19,10	23,06
3	17,84	20,19	23,23
4	18,80	20,48	23,20
5	19,09	20,69	23,27
6	19,38	20,96	23,27
7	19,55	21,08	23,33
8	19,65	21,14	23,47
9	19,74	21,22	23,38
10	19,82	21,27	23,49
11	19,93	21,30	23,59
12	19,97	21,38	23,55
13	20,20	21,44	23,53
14	20,08	21,44	23,69
15	20,19	21,51	23,63
16	20,16	21,50	23,59
17	20,19	21,57	23,52
18	20,23	21,60	23,66
19	20,36	21,60	23,71
20	20,37	21,65	23,71
21	20,29	21,68	23,61
22	20,38	21,70	23,81
23	20,30	21,72	23,55
24	20,35	21,77	23,46
25	20,25	21,74	23,48
26	20,52	21,73	23,71
27	20,44	21,77	23,22
28	20,55	21,79	23,65
29	20,52	21,82	23,44
30	20,63	21,85	23,52
31	20,40	21,90	23,77
32	20,59	21,90	23,75
33	20,46	21,89	23,80

34	20,71	21,87	23,58
35	20,62	21,93	23,92
36	20,39	21,95	23,73
37	20,65	21,93	23,79
38	20,67	21,97	23,86
39	20,73	21,97	23,73
40	20,74	21,96	23,84
41	20,86	21,94	23,64
42	20,79	21,98	23,84
43	20,74	22,00	23,79
44	20,86	21,98	23,70
45	20,73	21,99	23,52
46	20,68	22,06	23,85
47	20,70	22,04	23,76
48	20,86	22,03	23,74
49	20,98	22,06	23,97
50	20,90	22,03	23,77
51	20,98	22,07	23,61
52	21,03	22,09	23,73
53	21,02	22,13	23,97
54	20,90	22,08	23,53
55	21,07	22,10	23,69
56	20,90	22,13	23,74
57	20,95	22,14	23,77
58	21,24	22,12	23,76
59	20,91	22,16	23,69
60	20,91	22,16	23,74
61	21,05	22,14	23,92
62	21,02	22,15	23,87
63	21,06	22,17	23,91
64	21,07	22,19	23,82
65	21,05	22,20	23,81
66	21,10	22,18	23,87
67	21,19	22,23	23,97
68	21,15	22,19	23,87
69	21,07	22,24	23,77
70	21,16	22,19	23,77
71	21,05	22,23	23,91
72	21,31	22,23	23,85
73	21,23	22,23	23,61
74	21,08	22,26	23,91
75	21,17	22,31	23,90
76	20,87	22,34	23,73
77	21,35	22,30	24,02
78	21,24	22,26	23,82

79	21,21	22,28	23,91
80	21,14	22,29	23,54
81	21,40	22,32	23,92
82	21,40	22,30	23,73
83	21,03	22,27	23,98
84	21,44	22,29	23,70
85	21,18	22,25	23,49
86	21,17	22,37	23,92
87	21,32	22,34	24,08
88	21,42	22,29	23,95
89	21,64	22,35	23,84
90	21,35	22,36	23,92
91	21,36	22,34	23,81
92	21,43	22,37	23,90
93	21,13	22,33	23,87
94	21,18	22,36	24,02
95	21,44	22,36	23,87
96	21,49	22,36	23,90
97	21,45	22,40	23,96
98	21,19	22,44	23,82
99	21,57	22,31	23,89
100	21,23	22,36	23,87

ANEXO B

Resíduo	Acoplamento	Excesso	Tempo / min	Observações
Arginina (24)	1	4x	160	
Cisteína (23)	1	4x	160	
Lisina (22)	1	4x	160	
Lisina (21)	1	4x	160	
Isoleucina (20)	1	4x	180	
Isoleucina (19)	1	4x	160	
Serina (18)	1	4x	160	
Isoleucina (17)	1	4x	160	
	2	5x	160	
Leucina (16)	1	4x	160	AA marcado com ^{15}N
Lisina (15)	1	4x	160	
	2	5x	160	
Glutamato (14)	1	4x	160	
	2	5x	160	
Metionina (13)	1	4x	160	
Histidina (12)	1	4x	160	
	2	5x	160	
	3	6x	180	+ 2 gotas de triton
	4	8x	180	+ 3 gotas de triton
	5	8x	170	+ 3 gotas de triton
Lisina (11)	1	4x	120	
	2	6x	180	
	3	6x	160	+3 gotas de triton
Lisina (10)	1	4x	160	+1 gota de triton
	2	6x	160	+ 3 gotas de triton
Serina (9)	1	4x	200	+ 1 gota de triton
Glicina (8)	1	4x	200	+3 gotas de triton AA marcado com ^{15}N
Isoleucina (7)	1	4x	130	
Isoleucina (6)	1	4x	135	

Aspartato (5)	1	4x	170	
Serina (4)	1	4x	160	
Valina (3)	1	4x	170	
Leucina (2)	1	4x	160	AA marcado com ^{13}C
Asparagina (1)	1	4x	240	

Figura 4-1 - Quadro com as informações da síntese do peptídeo Htr-M I

Resíduo	Acoplamento	Excesso	Tempo / min	Observações
Arginina (24)	1	4x	180	
Cisteína (23)	1	4x	180	
Lisina (22)	1	4x	160	
	2	4x	170	
Lisina (21)	1	4x	210	
	2	6x	210	
Isoleucina (20)	1	4x	160	
Isoleucina (19)	1	4x	200	
Serina (18)	1	4x	220	
Isoleucina (17)	1	4x	110	
Leucina (16)	1	4x	180	AA marcado com ^{13}C
Lisina (15)	1	4x	180	
Glutamato (14)	1	4x	200	
Metionina (13)	1	4x	130	
Histidina (12)	1	4x	160	
	2	4x	160	
Lisina (11)	1	4x	180	
	2	5x	140	+2 gotas de triton
	3	8x	180	+3 gotas de triton
Lisina (10)	1	4x	190	
Serina (9)	1	4x	160	
	2	6x	160	
	3	8x	160	+3 gotas de triton
Glicina (8)	1	4x	160	AA marcado com ^{13}C
Isoleucina (7)	1	4x	180	
Isoleucina (6)	1	4x	160	

Aspartato (5)	1	4x	160	
Serina (4)	1	4x	160	
Valina (3)	1	4x	180	
Leucina (2)	1	4x	170	AA marcado com ¹⁵ N
Asparagina (1)	1	4x	160	

Figura 4-2 - Quadro com as informações da síntese do peptídeo Htr-M II

ANEXO C

This Agreement between Breno Barbosa ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3913060748518
License date	Jul 20, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biophysical Chemistry
Licensed Content Title	The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments
Licensed Content Author	Burkhard Bechinger, Jarbas M. Resende, Christopher Aisenbrey
Licensed Content Date	January 2011
Licensed Content Volume Number	153
Licensed Content Issue Number	2-3
Licensed Content Pages	11
Start Page	115
End Page	125
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	
Original figure numbers	Fig. 1.
Title of your thesis/dissertation	Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos Homotarsinina e LyeTx I mnΔK Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolipídicas
Expected completion date	Jul 2016
Estimated size (number of pages)	90
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Breno Barbosa Bernardo guimarães 455/601 Belo horizonte, Minas Gerais 30140080 Brazil Attn: Breno Barbosa

This Agreement between Breno Barbosa ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3913061100878
License date	Jul 20, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes
Licensed Content Title	Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides
Licensed Content Author	Hiromi Sato, Jimmy B. Feix
Licensed Content Date	September 2006
Licensed Content Volume Number	1758
Licensed Content Issue Number	9
Licensed Content Pages	12
Start Page	1245
End Page	1256
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	
Original figure numbers	Fig. 8 and 9
Title of your thesis/dissertation	Estudos por Ressonância Magnética Nuclear das Estruturas dos Peptídeos Homotarsinina e LyeTx I mn Δ K Ac e do Alinhamento Magnético de Bicelas Fosfolípicas
Expected completion date	Jul 2016
Estimated size (number of pages)	90
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Breno Barbosa Bernardo guimarães 455/601 Belo horizonte, Minas Gerais 30140080 Brazil

Capítulo 5 Bibliografia

- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. **The New England Journal of Medicine**, 5, n. 360, 29 Janeiro 2009. 439-443.
- BECHINGER, B.; RESENDE, J. M.; AISENBREY, C. The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments. **Biophysical Chemistry**, 153, 2011. 115-125.
- BEVINS, C. L.; ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Annual Review of Biochemistry**, 1990. 395-414.
- BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: Key components Needed in Immunity. **Cell**, 19 Abril 1991. 205-207.
- CAVANAGH, J. et al. **Protein NMR Spectroscopy**. Segunda. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2007.
- CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide Synthesis: A practical approach**. Primeira. ed. Nova Iorque: Oxford University Press, 2000.
- DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Janeiro 1995. 9 - 13.
- DE ANGELIS, A. A.; OPELLA, S. J. Bicelle samples for solid-state NMR of membrane proteins. **Nature Protocols**, 2, n. 10, 2007. 2332-2338.
- DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277-293, Novembro 1995.
- DUER, M. J. **Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy**. primeira. ed. Malden: Blackwell Publishing Ltd, 2004.
- EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta** , 1999. 11-28.
- GOTO, N. K. et al. What is the Average Conformation of Bacteriophage T4 Lysozyme in Solution? A Domain Orientation Study Using Dipolar Couplings Measured by Solution NMR. **Journal of Molecular Biology**, 308, 2001. 745-764.
- GUIMARÃES, C. F. R. C. Peptídeo antimicrobiano homotarsinina: Síntese, estudos reacionais de dimerização e ensaios de citotoxicidade. **Dissertação (Mestrado)**, Diamantina, 2013.

HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97, n. 16, 1 Agosto 2000. 8856-8861.

HYBERTS, S. G. et al. The solution structure of eglin c based on measurements of many NOEs and coupling constants and its comparison with X-ray structures. **Protein Science**, v. 1, n. 6, p. 736-751, Junho 1992.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. The IUCN Red List of Threatened Species. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 30 Abril 2004. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/55864/0>>. Acesso em: 11 Março 2016.

JOHNSON, B. A.; BLEVINS, R. A. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 4, n. 5, p. 603-614, Setembro 1994.

JÚNIOR, J. T. D. A. Estudo de três peptídeos sintéticos com atividade antimicrobiana, derivados da toxina LyeTx I da aranha *Lycosa erythrognata* (Lucas, 1836). **Dissertação (Mestrado)**, 2015.

KABARA, J. J.; VRABLE, R. Antimicrobial Lipids: Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides. **Lipids**, Março 1977. 753 - 759.

KAISER, E. et al. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical Biochemistry**, 34, n. 2, 1970. 595-598.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 29-32, Fevereiro 1996.

LASKOWSKI, R. A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, p. 477-486, Dezembro 1996.

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SEISTED, M. E. Defensins: Endogenous Antibiotic Peptides of Animal Cells. **Cell**, 25 Janeiro 1991. 229-230.

MANDARD, N. et al. Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. **European Journal of Biochemistry**, 256, n. 2, 16 Junho 1998. 404-410.

MOORE, K. S. et al. Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90, Fevereiro 1993. 1354-1358.

OPELLA, S. J.; DE ANGELIS, A. A. Bicelle samples for solid-state NMR of membrane proteins. **Nature Protocols**, 2, n. 10, 20 Setembro 2007. 2332-2338.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. **Biopolymers**, 47, 1998. 451-463.

PARELLA, T. NMR Periodic Table. **NMR Periodic Table**, 2000. Disponível em: <<http://www.bruker-nmr.de/guide/eNMR/chem/NMRnuclei.html>>. Acesso em: 4 Fevereiro 2016.

PRATES, M. V. Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica. **Dissertação (Mestrado)**, Brasília, 1999.

PREUSSER, H. J. et al. Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. **Toxicon**, Março 1975. 285-289.

RESENDE, J. M. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos ab-initio de tensores de blindagem**. Belo Horizonte: Tese de Doutorado, 2008.

RESENDE, J. M. et al. Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 39, p. 16639-16644, 29 Setembro 2009.

SANDERS, C. R. et al. Magnetically-Oriented Phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. **Progress in NMR Spectroscopy**, 26, 16 Fevereiro 1994. 421-444.

SANTOS, D. M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognata*. **Amino Acids**, n. 39, p. 135-144, 2010.

SATO, H.; FEIX, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006. 1245-1256.

SCHWIETERS, C. D. et al. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 160, p. 65-73, 2003.

SHEN, Y. et al. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 44, n. 4, p. 213-223, Agosto 2009.

SUGAWARA, M. et al. Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. **The FASEB Journal**, 24, n. 6, Junho 2010. 1737-1746.

THE Antimicrobial Peptide Database. **The Antimicrobial Peptide Database**, 14 dezembro 2015. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em: 16 dezembro 2015.

TROLL, W.; CANNAN, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. **Journal of Biological Chemistry**, Nova Iorque, 200, n. 2, 1953. 803-811.

VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, 96, Março 2009. 2194-2203.

VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. **Ainda não publicado**, 2016.

VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaio Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. Belo Horizonte: Tese de Doutorado, 2010.

WILKEN, J.; KENT, S. B. H. Chemical Protein Synthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, 9, n. 4, Agosto 1998. 412-426.

WÜTHRICH, K. **NMR of Proteins and Nucleic Acids**. Nova Iorque: Wiley Interscience, 1986.

XU, J. et al. Bicelle-Enabled Structural Studies on a Membrane-Associated Cytochrome b5 by Solid-State MAS NMR Spectroscopy. **Angewandte Chemie**, 120, 2008. 7982-7985.

XU, X.; LAI, R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. **Chemical Reviews**, Yunnan, 115, 16 Janeiro 2015. 1760-1846.