

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

**Jarbas Magalhães Resende**

**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  
2008**



UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



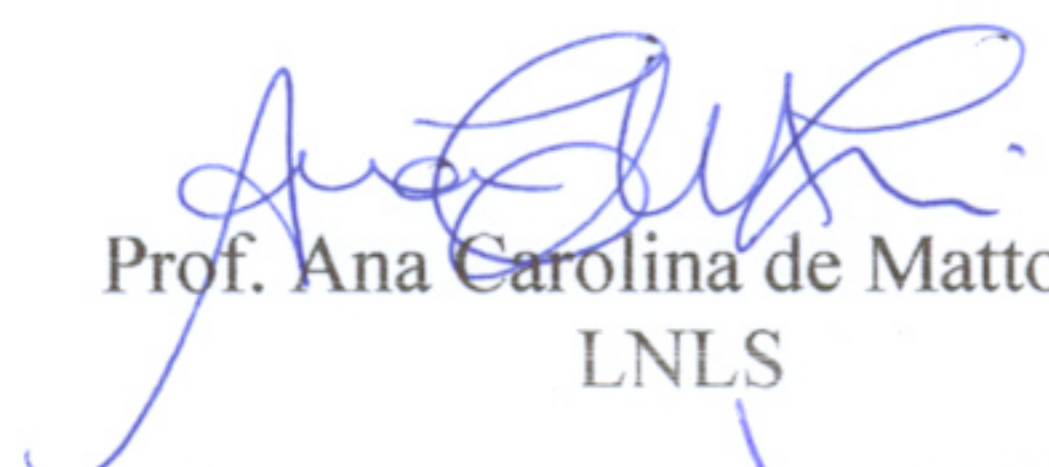
**"Estudos Estruturais e das Interações com Membranas de Peptídeos Antimicrobianos por RMN em Solução e em fase Sólida. Análise Conformacional e Cálculos ab-initio de Tensores de Blindagem "**

**Jarbas Magalhães Resende**

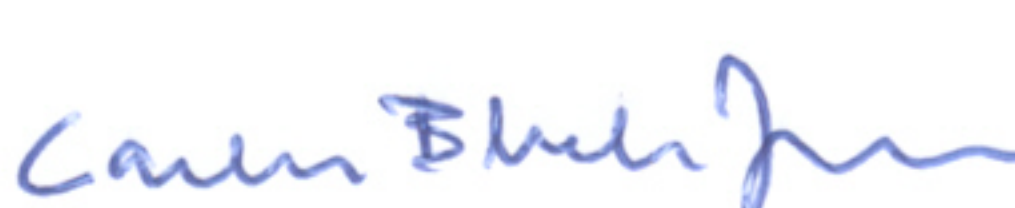
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


  
Prof. Amary César Ferreira - Orientador  
UFMG

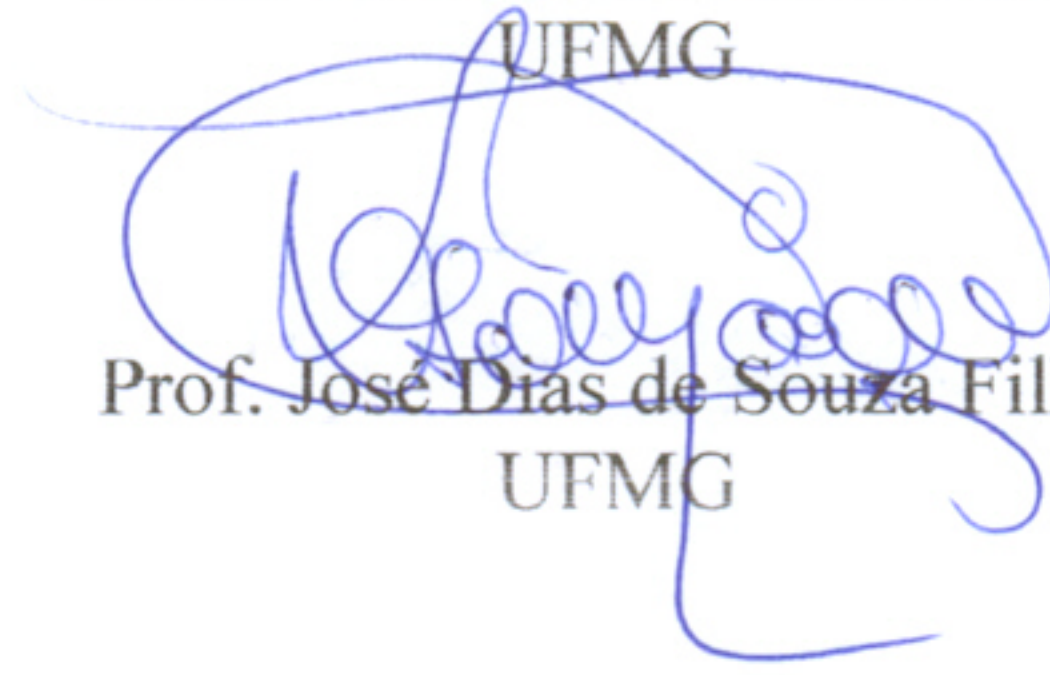
  
Profa. Dorila Piló Veloso - Co-Orientadora  
UFMG

  
Prof. Ana Carolina de Mattos Zeri  
LNLS

  
Prof. Cláudio Francisco Tormena  
UNICAMP

  
Prof. Carlos Bloch Junior  
EMBRAPA

  
Profa. Rosemeire Brondi Alves  
UFMG

  
Prof. José Dias de Souza Filho  
UFMG

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2008.

**UFMG 708**  
**T. 300**

**Jarbas Magalhães Resende**

**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.**

Tese apresentada ao Departamento de  
Química do Instituto de Ciências  
Exatas da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências – Química.

**Belo Horizonte**  
**2008**

Resende, Jarbas Magalhães  
R433e        Estudos estruturais e das interações com membranas  
2008        de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em  
T           fase sólida. Análise conformacional e cálculos ab-  
             initio de tensores de blindagem. 2008.  
             viii, 179f. : il.

Orientador: Amary César Ferreira  
Co-orientadora: Dorila Piló Veloso

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química Orgânica - Teses 2. RMN em solução e em  
fase sólida -Teses. 3.Interações peptídeos - Membranas  
- Teses I.Ferreira, Amary César, Orientador II.Piló-  
Veloso, Dorila, Co-orientadora. III.Título.

CDU 043

Esta tese foi realizada sob a orientação do Professor Doutor Amary César Ferreira e sob co-orientação da Professora Doutora Dorila Piló-Veloso.

## Agradecimentos

- Agradeço ao Professor Amary César Ferreira pela orientação neste trabalho de tese. Agradeço-o, principalmente, por seu auxílio mais que imprescindível nas etapas de simulações de parâmetros da RMN em fase sólida e nas etapas de cálculos DFT realizados neste trabalho.
- Agradeço à Professora Dorila Piló-Veloso pela sua co-orientação nas atividades da tese. Sou grato por suas sugestões e pela organização de várias etapas do trabalho.
- I am much indebt to Professor Burkhard Bechinger for the amicable acceptance in his research team in Strasbourg. I am grateful for many stimulating discussions and for his critical reading of our manuscripts.
- Sou imensamente grato ao Professor Fábio Ceneviva Lacerda Almeida, pelas inúmeras discussões e ensinamentos sobre RMN de peptídeos. Realizei a aquisição de grande parte dos experimentos de RMN em solução desta tese no Centro Nacional de RMN, onde contei com o total apoio do Professor Fábio.
- Sou muito grato à Doutora Cléria Mendonça de Moraes, por sua ajuda em diferentes etapas do trabalho. Agradeço pelos ensinamentos sobre síntese de peptídeos, em especial sobre os aspectos práticos do processo. Sou também grato pelos ensinamentos sobre dicroísmo circular e pelas inúmeras discussões sobre aspectos práticos de experimentos de RMN em fase sólida.
- Agradeço às colaboradoras Nathália Carolina Côrtes Rocha Mundim e Doutora Maura Viana Prates (EMBRAPA, Brasília) pela purificação e realização de testes biológicos com alguns peptídeos estudados nessa tese.
- Agradeço ao Professor Marcelo Porto Bemquerer (EMBRAPA, Brasília), pelas discussões e sugestões durante a tese. Agradeço em especial às dicas durante as sínteses dos peptídeos.

- Agradeço à Professora Ana Paula Valente pela ajuda e discussões durante a aquisição de experimentos de RMN em solução no Centro Nacional de RMN, Rio de Janeiro.
- I am grateful to Dr. Philippe Bertani and Dr. Jesus Raya for their help with some tricky aspects of solid-state NMR spectroscopy.
- Agradeço ao meu eterno Professor e amigo José Dias de Souza Filho. Sou muito grato pelas inúmeras dicas, ensinamentos e pela amizade ao longo de diversos anos na UFMG.
- Agradeço ao CNPq pela concessão da minha bolsa de doutorado.
- Sou imensamente grato ao Ricardo Machado por seu enorme auxílio durante esses anos de trabalho com espectrômetros de RMN, tendo com ele aprendido inúmeros detalhes sobre aquisição e processamentos de experimentos, além de vários outros aspectos práticos associados à RMN.
- Agradeço ao meu amigo Gessy James Vieira, pelas inúmeras discussões científicas e ensinamentos durante meus cursos de pós-graduação. Sou grato, principalmente, a sua grande amizade e companheirismo ao longo destes anos.
- Mil obrigados à amiga Ivana Silva Lula por seus ensinamentos e dicas com relação ao trabalho com espectrômetros de RMN.
- Agradeço ao meu grande amigo Marcelo Tavares de Oliveira pelas inúmeras discussões científicas e dicas durante esses anos de pós-graduação. Sou imensamente grato por sua amizade e pelas conversas jogadas fora durante algumas cervejas, que foram bem propícias após longas horas de trabalho no laboratório.
- O meu obrigado aos colegas de laboratório Kátia, Viviane, Márcia, Ivanildo, Daniel, Freddy, Maicon, Priscila, Bianca, Luan, Rodrigo e Victor pelas discussões científicas, pela amizade e pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

- To François for his enjoyable company, peculiar sense of humour and jokes. Ah, thanks also for introducing me to the more than special “magret de canard au miel”. Thanks also for the scientific discussions.
- Special thanks to Sebastiaan for the times that we spent on Strasbourg pubs watching football matches, having some nice European beers and (sometimes) complaining about science. Cheers!
- Many thanks to Ali, Linas, Marc and Verica for their more than special friendship and for a lot of fun we had together during my stay in Strasbourg.
- Thanks to my lab mates Evgeni, Svetlana, Celine, Baudouin, Marie-Catherine and Phil for their help, support and friendship.
- Agradeço aos amigos Chico, Catharina, Carol Cruzeiro, Carol Sarzedas, Cris, Gisele, Elicardo, Guilherme, Rodolpho, Fabiana, Renata, Vivi, e Ânderson pela hospitalidade mais que especial no CNRMN, Rio de Janeiro.
- Agradeço ao meu grande amigo Ábdon Haley pelo apoio e forte amizade durante meus vários anos na UFMG. Obrigado pelas inúmeras ajudas durante a graduação e, principalmente, pela ajuda imprescindível com química inorgânica.
- Agradeço aos meus avós, tios, tias, primos e primas pelo grande apoio e amizade.
- Agradeço ao meu Pai por seu incentivo e apoio.
- Agradeço a minha Mãe pelo apoio, carinho, paciência e força sempre presentes.
- Agradeço à Clara pelo carinho, inspiração e força a mim dadas para a conclusão desta tese.
- Obrigado Deus!



## Resumo

As filoseptinas (*phylloseptins*) são peptídeos antimicrobianos de dezenove a vinte resíduos de aminoácidos encontrados na secreção da pele de anfíbios do gênero *Phyllomedusa*, que habitam as florestas tropicais das Américas do Sul e Central. O foco principal desta tese diz respeito a estudos estruturais e da interação das filoseptinas 1, 2 e 3 (PS-1, PS-2 e PS-3) com membranas. Esses peptídeos possuem a porção C-terminal naturalmente amidada e exibem 74% de homologia entre suas seqüências primárias, sendo que as principais variações envolvem apenas quatro resíduos próximos à fração C-terminal.

Neste trabalho são investigadas e comparadas em detalhes as estruturas dessas três filoseptinas, sendo usadas para tal objetivo as espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN) e de dicroísmo circular (CD) na presença de vesículas fosfolipídicas e/ou meios que mimetizam o ambiente de membranas. Ambas as espectroscopias indicaram um alto grau de ordenamento helicoidal para essas moléculas, o qual segue a ordem  $PS-2 \geq PS-1 > PS-3$ . As variações conformacionais ocorrem principalmente nas porções C-terminais e elas são explicadas pela consideração de interações eletrostáticas do momento de dipolo negativo em C-terminal com os resíduos potencialmente catiônicos nas posições 17 e 18: enquanto o PS-1 e o PS-2 possuem dois resíduos capazes de suportar um carga positiva nessas posições, apenas um é observado para o PS-3. Além do mais, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, efeitos de *capping* de hélice, bem como a amidação C-terminal natural, desempenham importante papel na estabilização das estruturas peptídicas.

Uma vez determinadas, por CD e RMN em solução, a existência de segmentos helicoidais anfipáticos bem definidos para os três peptídeos, esses compostos (seletivamente marcados com  $^{15}N$  e  $^2H$ ) foram incorporados a bicamadas fosfolipídicas orientadas e então medidas de RMN em fase sólida foram efetuadas. Embora não tenha sido possível se determinarem com precisão as orientações dos peptídeos pelo uso exclusivo do deslocamento químico de  $^{15}N$  ou do desdobramento quadrupolar de  $^2H$ , os dois parâmetros forneceram restrições topológicas altamente complementares, as quais foram usadas para se

obterem com precisão as orientações dos peptídeos nas bicamadas lipídicas. Eventualmente, o desdobramento dipolar de  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  (obtido no espectro de PISEMA) forneceu restrições topológicas extras na determinação da orientação peptídica na bicamada. A PS-2 e a PS-3 adotam alinhamentos perfeitamente planares, o que está em pleno acordo com suas hélices anfipáticas dispostas na interface da membrana. Apesar do alto caráter anfipático da PS-1, o resíduo polar C-terminal de Asn-19, localizado na face hidrofóbica da hélice, força um pequeno desvio do eixo principal da hélice com relação à superfície da membrana. As diferenças estruturais e topológicas, observadas para as três filoseptinas em meios que mimetizam membranas, podem ser correlacionadas a um sistema imunológico inato de defesa avançado do animal, uma vez que o armazenamento de coquetéis de compostos antimicrobianos na pele torna disponível uma larga gama de escolha e, portanto, fornece um mecanismo que é ativo contra vários tipos de microorganismos. Não obstante, a liberação de misturas de agentes antimicrobianos permite a ação sinérgica de combinações de peptídeos.

Uma outra parte deste trabalho, diz respeito a estudos estruturais e cálculos de constantes de blindagem por métodos DFT (teoria do funcional densidade) da química quântica. Nesses estudos foi proposta uma estratégia de “fragmentação peptídica”, a qual tem por objetivo a definição de um método, que visa a modelagem de peptídeos  $\alpha$ -helicoidais. Tal estratégia mostrou ser bem eficiente, uma vez que as estruturas obtidas por métodos teóricos apresentaram uma alta similaridade com relação às estruturas obtidas por RMN em solução. Um bom acordo foi também obtido ao se compararem os valores de deslocamentos químicos teóricos e experimentais, o que indica que a estratégia de modelagem molecular proposta é bastante promissora e pode, portanto, ser empregada como uma importante ferramenta de análise em situações nas quais problemas como alargamento de linhas espectrais, ou mesmo outros fatores termodinâmicos, inviabilizam a aquisição de espectros bidimensionais de RMN com boa qualidade.

## Abstract

Phylloseptins are antimicrobial peptides of 19 to 20 residues which are found in the skin secretions of the *Phyllomedusa* frogs that inhabit the tropical forests of South and Central Americas. The focus of this PhD thesis concerns structural and membrane-interactions studies of the peptides phylloseptin 1, 2 and 3 (PS-1, PS-2 and PS-3). These peptides carry an amidated C-terminus and they exhibit 74% sequence homology with major variations of only four residues close to the C-terminus.

Here are investigated and compared the structures of the three phylloseptins in detail by circular dichroism (CD) and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies in the presence of phospholipid vesicles or in membrane mimetic environments. Both CD and NMR spectroscopies reveal a high degree of helicity in the order  $PS-2 \geq PS-1 > PS-3$ , where the main differences accumulate at the C-terminus. The conformational variations can be explained by taking into consideration electrostatic interactions of the negative ends of the helix dipoles with potentially cationic residues at positions 17 and 18. Whereas two are present in the sequence of PS-1 and -2, only one is present in PS-3. Furthermore, the additional role of hydrophobic interactions, hydrogen bonding, capping interactions and C-terminal amidation for the stabilization of the helix and for antimicrobial action are discussed.

Once amphipathic helical arrangements have been determined for the three peptides by CD and solution NMR, these compounds (selectively labelled with  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$ ) were reconstituted into oriented phospholipid bilayers and solid-state NMR measurements were carried out. Although it is not possible to precisely determine the peptide orientation from  $^{15}\text{N}$  chemical shift or the  $^2\text{H}$  quadrupolar splitting alone, the two parameters furnished highly complementary topological restraints that have been used to obtain an accurate definition of the orientation of the peptides in the bilayers. Eventually, the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolar splitting (obtained from PISEMA experiments) gave further topological restraints. PS-2 and PS-3 adopt perfect in-plane alignments, which is in plain agreement with their amphipathic structures lying at the membrane interface. Despite the high

amphipathic character of PS-1, the polar C-terminal Asn-19 residue at the hydrophobic side of the helix forces a small deviation of the helix main axis with regards to an in-plane orientation. The structural and topological differences observed for the three phylloseptins in membrane-mimicking environments can be correlated to an advanced innate immunological system of the animal, as the storage of cocktails of antimicrobials in the skin makes available a larger choice and, therefore, a defense mechanism that works against many different microorganisms. At the same time releasing mixtures of antimicrobial compounds allows for a synergistic action of combinations of peptides.

Another part of this work comprises structural studies and shielding constant calculations by DFT (density functional theory) quantum methods. A strategy of peptide fragmentation aiming at a feasible molecular modelling of  $\alpha$ -helical peptides has been proposed, and the obtained final structures have shown to be pretty similar to the ones obtained by solution NMR. A good agreement has been reached between experimental and theoretical chemical shifts and, therefore, the proposed strategy of molecular modelling proves to be a very promising tool in cases where problems like natural line-broadening or even other thermodynamic issues prevents the acquisition of good quality 2D NMR spectra.

# SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	5
1.1 – Peptídeos antimicrobianos.....	5
1.2 – Estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida.....	9
1.2.1 – Remoção do grupo Fmoc.....	13
1.2.2 – Ativação do Fmoc-Aminoácido para reações de acoplamento.....	14
1.2.3 – Clivagem do peptídeo da peptidil-resina.....	15
1.2.4 – Teste de Kaiser.....	16
1.3 – Dicroísmo circular.....	17
1.4 – Ressonância Magnética Nuclear – Uma abordagem histórica.....	18
1.5 – Experimentos de RMN.....	25
1.5.1 – Introdução à RMN bidimensional.....	26
1.5.2 – Supressão do sinal do solvente – Pré-saturação.....	29
1.5.3 – Espectroscopia Total de Correlação (TOCSY).....	31
1.5.4 – Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (NOESY).....	35
1.5.5 – Pulsos de gradiente de campo na RMN.....	38
1.5.6 – Uma introdução sobre detecção inversa.....	42
1.5.7 – Coerência Heteronuclear de Simples Quantum.....	45
1.5.8 – Polarização Cruzada (CP).....	47
1.5.9 – Eco Quadrupolar.....	51
2 – METODOLOGIA.....	54
2.1 – Síntese de peptídeos.....	54
2.1.1 – Preparação da resina para acoplamento do primeiro aminoácido.....	55
2.1.2 – Acoplamento do primeiro aminoácido à resina.....	55
2.1.3 – Acoplamento dos demais aminoácidos à peptidil-resina.....	56
2.1.4 – Clivagem do peptídeo da peptidil-resina e isolamento do peptídeo bruto.....	57
2.1.5 – Teste de Kaiser.....	58
2.1.6 – Purificação dos peptídeos por CLAE e análise por EM.....	58

2.2 – Dicroísmo circular.....	59
2.3 – RMN em solução.....	61
2.4 – Estrutura das filoseptinas a partir de dados de <i>nOe</i> .....	63
2.5 – RMN em fase sólida.....	64
2.5.1 – Preparação das amostras.....	64
2.5.2 – Experimentos.....	65
2.5.3 – Simulação de parâmetros da RMN em fase sólida e e determinação da topologia dos peptídeos em bicamadas lipídicas.....	67
2.6 – Estrutura e constantes de blindagem da PS-2 a partir de cálculos quânticos.....	69
3 – RESULTADOS.....	74
3.1 – Síntese de Peptídeos.....	74
3.2 – Dicroísmo circular.....	79
3.3 – Experimentos de RMN em solução.....	83
3.3.1 – Atribuição dos sinais de RMN.....	83
3.3.2 – Estrutura tridimensional dos peptídeos a partir de dados de <i>nOe</i> .....	95
3.4 – Experimentos de RMN em fase sólida.....	108
3.4.1 – Alinhamento das bicamadas lipídicas.....	108
3.4.2 – Análise topológica dos peptídeos em bicamadas lipídicas por RMN de <sup>15</sup> N & <sup>2</sup> H .....	113
3.5 – Estrutura e constantes de blindagem do PS-2 a partir de cálculos <i>ab-intio</i> .....	125
3.5.1 – Estrutura do PS-2 a partir de cálculos <i>ab-intio</i> .....	125
3.5.2 – Cálculos quânticos das constantes de blindagem da PS-2.....	132
4 – CONCLUSÃO.....	142
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
APÊNDICE A1 – Lista com trabalhos apresentados em congressos.....	173
APÊNDICE A2 – Artigos produzidos durante o doutorado.....	178

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D – unidimensional

2D – bidimensional

$180^{\circ}_x$  – pulso de RMN de  $180^{\circ}$  ao longo do eixo  $x$  positivo

$180^{\circ}_{-x}$  – pulso de RMN de  $180^{\circ}$  ao longo do eixo  $x$  negativo

$180^{\circ}_y$  – pulso de RMN de  $180^{\circ}$  ao longo do eixo  $y$  positivo

$180^{\circ}_{-y}$  – pulso de RMN de  $180^{\circ}$  ao longo do eixo  $y$  negativo

$90^{\circ}_x$  – pulso de RMN de  $90^{\circ}$  ao longo do eixo  $x$  positivo

$90^{\circ}_{-x}$  – pulso de RMN de  $90^{\circ}$  ao longo do eixo  $x$  negativo

$90^{\circ}_y$  – pulso de RMN de  $90^{\circ}$  ao longo do eixo  $y$  positivo

$90^{\circ}_{-y}$  – pulso de RMN de  $90^{\circ}$  ao longo do eixo  $y$  negativo

AIP – Álcool isopropílico

$B_0$  – Campo de indução magnética

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DQF-COSY – Espectroscopia de correlação com filtro de duplo-quantum  
(*Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy*)

CPMAS – Polarização Cruzada e Giro no Ângulo Mágico (*Cross Polarization Magic-Angle Spinning*)

DCM – diclorometano

DFT – Teoria do funcional densidade (*Density Functional Theory*)

DIC – 1,3-di-isopropil-carbo-di-imida

DMAP – 4-(N,N-dimetilamino)-piridina

DMF – dimetilformamida

DSS – 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio

EM – Espectrometria de Massas

ESI – Ionização por eletro-spray

FID – Decaimento da Indução Livre (*Free Induction Decay*)

HF – Hartree-Fock

HMBC – Correlação Heteronuclear via Múltiplas Ligações (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*)

HMQC –Coerência Heteronuclear de Múltiplo Quanta (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*)

HOBt – 1-hodróxi-benzotriazol

HSQC –Coerência Heteronuclear de Simples Quantum (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

$J$  – Constante de acoplamento escalar *spin-spin* nuclear

MAS – Giro no Ângulo Mágico (*Magic-Angle Spinning*)

$M_{xy}$  – Componente transversal da magnetização

$M_z$  – Componente longitudinal da magnetização

$nOe$  – Efeito nuclear Overhauser

NOESY – Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

p. – página

PGC – Pulsos de gradiente de campo

PISEMA – Inversão de polarização com troca de spin no ângulo mágico (*Polarisation Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle*)

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

POPS – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina

ppm – partes por milhão

PS-1 – filoseptina 1

PS-2 – filoseptina 2

PS-3 – filoseptina 3

RF – Radiofrequência

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – Desvio padrão quadrático médio

TFA – Ácido trifluoroacético

TFE – 2,2,2-trifluoroetanol

TIS – Tri-isopropilsilano

TOCSY – Espectroscopia total de correlação (*Total Correlation Spectroscopy*)

$\delta$  – Deslocamento Químico

$\nu_L$  – frequência de Larmor



# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Peptídeos antimicrobianos

Tem-se notado nas últimas décadas, o reaparecimento de doenças infecciosas, devido ao desenvolvimento de resistência por parte de microrganismos a antibióticos ordinariamente usados no tratamento de doenças. Tal fator tem provocado grande interesse na descoberta de novos medicamentos e compostos como peptídeos têm mostrado bastante interesse nesse tipo de aplicação. Dessa forma, o estudo das atividades, sínteses e mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos vêm despertando grande interesse em diversas áreas de pesquisa (Bechinger, 1999).

A pele de anfíbios é uma fonte valiosa de peptídeos e muitos estudos demonstram que diferentes espécies desses anfíbios armazenam classes distintas de peptídeos biologicamente ativos. Entre eles, peptídeos antimicrobianos que são considerados os mais avançados participantes do sistema imunológico inato (Rinaldi *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2001; Simmaco *et al.*, 1998; Barra & Simmao, 1998; Csordas & Michl, 1970). Esses peptídeos antibióticos tornaram-se agentes alternativos contra bactérias patogênicas e fungos (Boman, 1995). Além de uma composição de aminoácidos, comprimento e estruturas variadas da cadeia peptídica, muitos desses compostos são catiônicos e exibem propriedades anfipáticas. O mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos tem sido alvo de investigação através de metodologias variadas (Huang *et al.*, 2004). Algumas dessas substâncias exercem suas atividades pela permeabilização da membrana bacteriana. O processo básico inicia-se com um peptídeo desestruturado em solução que, quando em contato com uma membrana bacteriana, geralmente aniônica, adota uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal, com seus resíduos catiônicos atraídos eletrostaticamente à membrana. Finalmente, ocorre a ligação entre o peptídeo e a membrana e a permeabilização da mesma (Bechinger & Lohner, 2006; Bechinger, 1999; Vogt & Bechinger, 1999).

Peptídeos são compostos formados pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos (Nelson & Cox, 2004). Peptídeos de ocorrência biológica de diversos tamanhos, de dois a milhares de resíduos de aminoácidos,

são conhecidos. Em peptídeos, os resíduos de aminoácidos são covalentemente unidos via uma ligação amídica formada entre um grupo carboxílico ácido e o grupo amino de duas moléculas de aminoácidos distintas. Essa junção é chamada de “ligação peptídica”, a qual é formada pela desidratação associada à perda de um grupo OH de uma carboxila de aminoácido e a um hidrogênio de um grupo amino de outro aminoácido, conforme representado na Figura 1.1 a seguir.

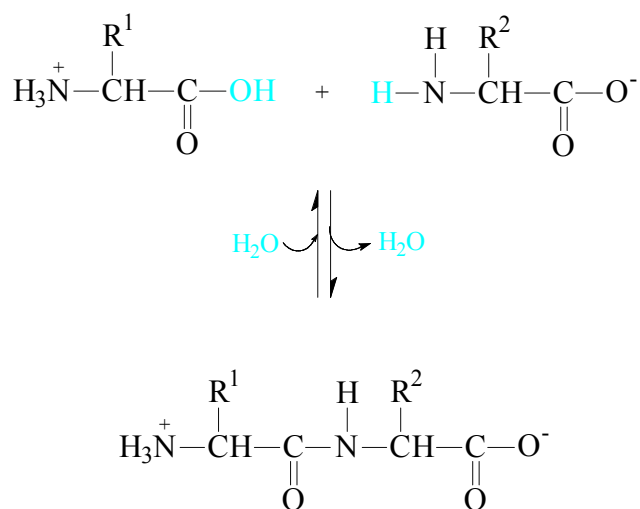


Figura 1.1 – Formação de uma ligação peptídica pela condensação de dois aminoácidos.

Diferentes níveis de estruturação são definidos para peptídeos (Nelson & Cox, 2004). A descrição de todas as ligações covalentes unindo resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica é definida como “estrutura primária”. A “estrutura secundária” se refere a arranjos particularmente estáveis de resíduos de aminoácidos, que levam a padrões recorrentes de estruturas. A “estrutura terciária” relata os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. A “estrutura quaternária” descreve o arranjo no espaço de uma proteína que contém mais de uma subunidade peptídica.

A seguir é apresentada a Figura 1.2, contendo os vinte aminoácidos essenciais, a partir dos quais são formados a maioria dos peptídeos e proteínas.

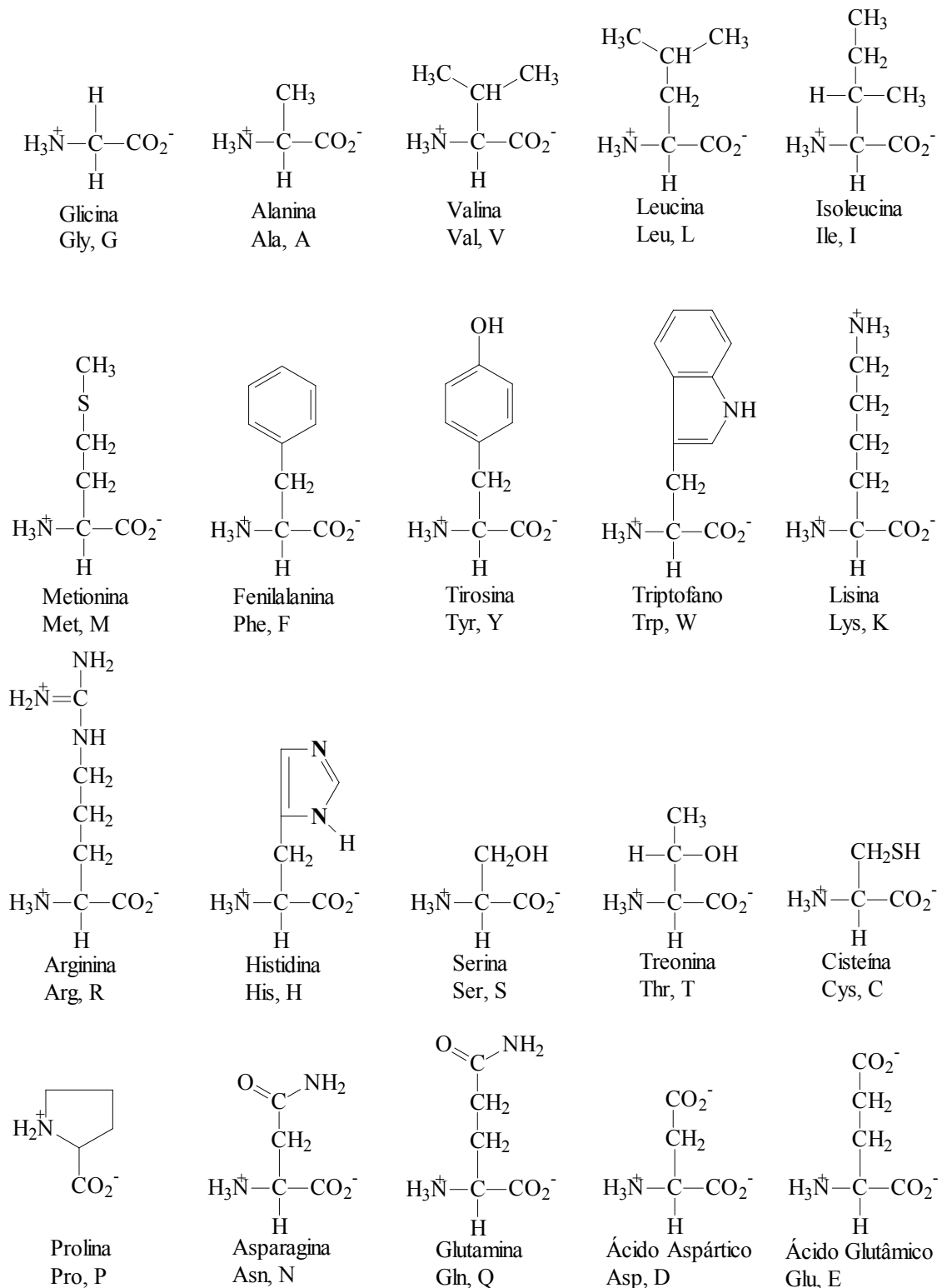


Figura 1.2 – Fórmulas estruturais, nomes, siglas e símbolos dos vinte aminoácidos essenciais. O estado de ionização predominante a pH 7,0 é representado. Apesar da histidina não estar predominantemente protonada na cadeia lateral, uma significativa fração de cadeias laterais carregadas é encontrada nesse pH.

Neste trabalho serão estudados os peptídeos antimicrobianos PS-1, PS-2 e PS-3, isolados da espécie *Phyllomedusa hypochondrialis* (Leite *et al.*, 2005). As seqüências primárias dessas filoseptinas são apresentadas na Tabela 1.1. Essas moléculas são formadas por dezenove resíduos de aminoácidos com 74% de homologia nas seqüências primárias. Esses três peptídeos são encontrados naturalmente na forma amidada na posição C-terminal, sendo que esse tipo de modificação natural tem mostrado efeito na promoção de atividade biológica em outras seqüências peptídicas (Katayama *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2001). Cerca de 60 a 80% dos resíduos de aminoácidos desses peptídeos são hidrofóbicos, os quais estão separados por resíduos hidrofílicos. Nas três seqüências são encontrados resíduos de aminoácidos que podem suportar carga positiva via protonação em valores de pH próximos à neutralidade. Nesse ponto, o peptídeo PS-1 contém duas histidinas nas posições 7 e 18 e uma lisina na posição 17, o peptídeo PS-2 apresenta três unidades de histidina nas mesmas posições, enquanto que o peptídeo PS-3 apresenta apenas duas unidades de histidina nas posições 7 e 18.

**Tabela 1.1: Seqüências primárias dos peptídeos em estudo**

Peptídeo	Seqüências
PS-1	FLSLI PHAIN AVSAI AKHN-NH <sub>2</sub>
PS-2	FLSLI PHAIN AVSTL VHVF-NH <sub>2</sub>
PS-3	FLSLI PHAIN AVSAL ANHG-NH <sub>2</sub>

Consideráveis diferenças de atividades biológicas têm sido observadas devido a pequenas variações nas seqüências primárias de compostos-modelo, mesmo em casos onde a composição de aminoácidos dos peptídeos se mantém constante (Mason *et al.*, 2005; Wieprecht *et al.*, 1997). No que tange esse ponto, as filoseptinas fornecem um exemplo interessante, uma vez que seqüências primárias idênticas são encontradas para os três peptídeos entre os resíduos 1 e 13, bem como no resíduo 18. Por outro lado, as variações nas seqüências primárias entre os resíduos 14-17 e 19 fornecem a possibilidade de investigação

de diferentes interações que possam atuar tanto na atividade, quanto na estruturação desses compostos. A diferença mais pronunciada é a variação da carga efetiva do resíduo 17 em pH fisiológico. Enquanto uma lisina (carga +1 a pH 7,0) é encontrada para a PS-1 nessa posição, uma histidina (carga entre 0 e +1 a pH 7,0) é observada para a PS-2 e uma asparagina (carga 0) é observada para a PS-3. Não obstante as demais diferenças na composição de aminoácidos sugerem diferentes caracteres hidrofóbicos para os três compostos, sendo que é bem conhecido que um balanço entre carga e caráter hidrofóbico tem um papel muito importante na afinidade e na interação de um peptídeo com a membrana bacteriana, que é um alvo bem comum de ataque desse tipo de composto antimicrobiano (Vogt & Bechinger, 1999; White *et al.*, 1999).

Tem-se, portanto, grande interesse e motivação na realização de estudos desses peptídeos no sentido de se tentar compreender como as diferenças estruturais, bem como as diferenças nas afinidades com os respectivos alvos biológicos (no caso as superfícies de membranas bacterianas) podem atuar na atividade biológica de peptídeos. Espera-se que a compreensão detalhada da relação estrutura-função de peptídeos antimicrobianos venha a possibilitar a arquitetura racional de compostos análogos mais eficientes e baratos (Mason, *et al.*, 2006; Hwang & Vogel, 1998). Em particular, as filoseptinas se apresentam como um bom sistema de teste para o estudo de como interações eletrostáticas e hidrofóbicas podem modular as características estruturais e topológicas de peptídeos em meios que mimetizam o ambiente de membranas.

Dessa forma, tem-se como objetivo principal deste trabalho, estudos estruturais, topológicos em sistemas que mimetizam o ambiente de membranas. Nesses estudos serão empregadas técnicas espectroscópicas como o dicroísmo circular, a RMN em solução e em fase sólida, bem como procedimentos teóricos associados a cálculos de estruturas e determinação de parâmetros da RMN.

## **1.2 – Estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida**

Peptídeos podem ser obtidos por três diferentes formas. Uma primeira pelo isolamento direto dos tecidos, um processo trabalhoso, principalmente

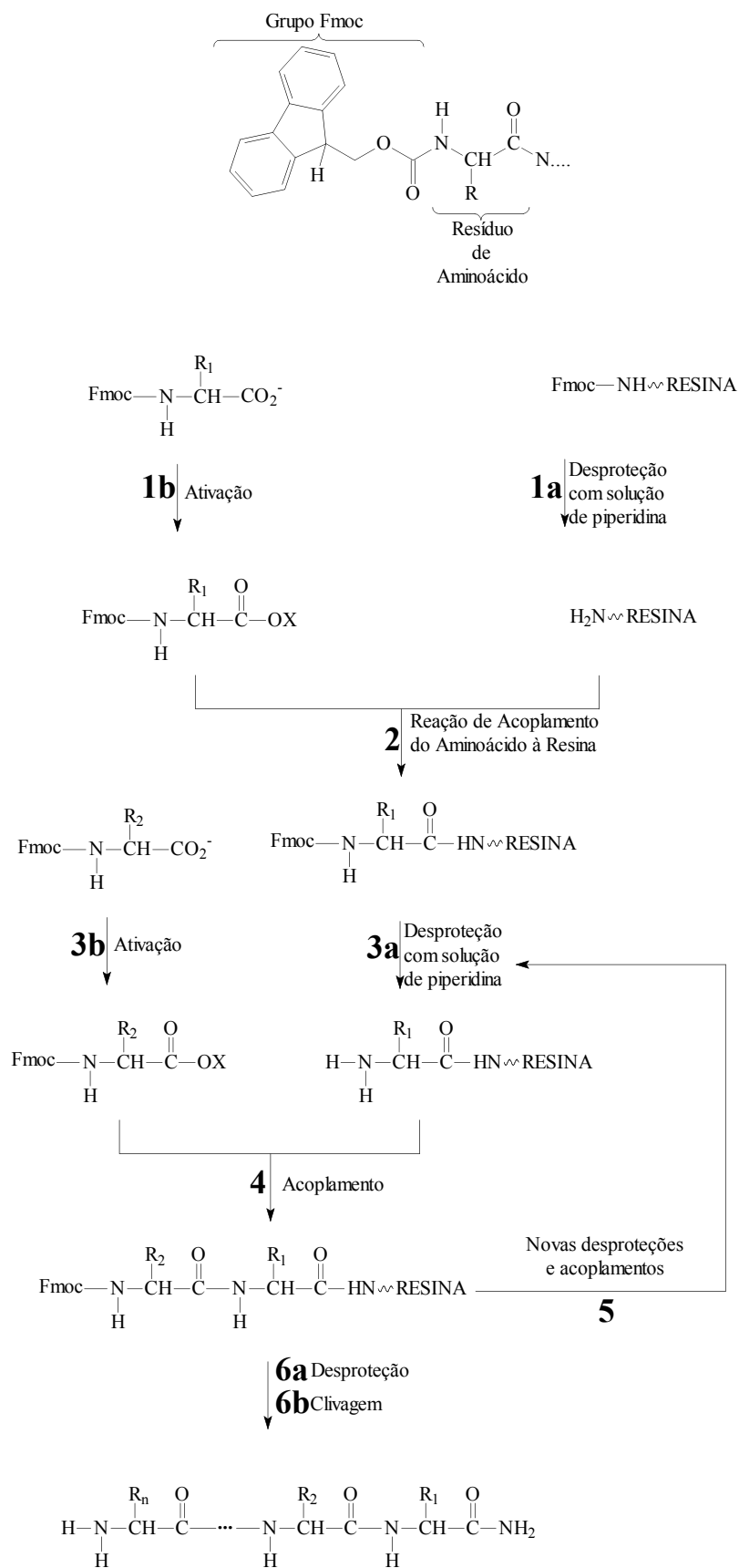
devido às baixas concentrações dos peptídeos de interesse. Uma segunda maneira envolve a engenharia genética e uma terceira maneira é via síntese química direta (Nelson & Cox, 2004). Entretanto, devido aos inúmeros resíduos de aminoácidos presentes em uma cadeia polipeptídica, a obtenção de peptídeos por metodologias clássicas de síntese orgânica, se tornaria inviável, podendo-se obter por reações convencionais em solução, apenas peptídeos com até cinco resíduos (Nelson & Cox, 2004; Chan & White, 2000).

Na tentativa de solucionar tal problema, R. B. Merrifield, realizou inúmeros estudos de síntese em fase sólida, nos quais aminoácidos poderiam ser ligados em um suporte sólido, tendo-se então a adição de novos resíduos de aminoácidos por reações de acoplamento até se chegar ao peptídeo desejado, o qual seria posteriormente clivado do suporte sólido (Chang & White, 2000). Em um trabalho publicado no ano de 1963, Merrifield conseguiu sintetizar um tetrapeptídeo, usando um suporte sólido poroso para tal (Merrifield, 1963). Esse trabalho provocou certa desconfiança entre os químicos orgânicos da época, pois até então reações em sistemas heterogêneos normalmente produziam muitas impurezas (Chan & White, 2000). No ano seguinte, Merrifield publicou um outro trabalho, baseado também em síntese de fase sólida, no qual era relatada a síntese e purificação de um nonapeptídeo em apenas cinco dias, tendo tal resultado revolucionado as estratégias de síntese de peptídeos da época (Merrifield, 1964). Em comparação com o primeiro trabalho, algumas modificações foram introduzidas, como por exemplo o uso de aminoácidos protegidos com o grupo Boc (*tert*-butóxi-carbonil) (estratégia Boc de síntese de peptídeos em fase sólida – Rosenthal *et al.*, 1999; Kent, 1988; Tam *et al.*, 1986), o que possibilitava o uso de técnicas mais suaves de reação e eliminava problemas como a perda de produtos intermediários de reação.

Nesse tipo de estratégia de síntese proposta por Merrifield (posteriormente aprimorada em outros trabalhos), eram utilizados nas reações de acoplamentos, aminoácidos protegidos por grupos lábeis em meio ácido. A estratégia então era realizar uma etapa de acoplamento e depois, com um ácido (*e.g.* ácido trifluoroacético), realizar a clivagem do grupo protetor, realizando-se a seguir um

novo acoplamento em um ciclo reacional. Após terminados todos os acoplamentos, era utilizado um ácido mais forte (*e.g.* ácido trifluorometanosulfônico em ácido trifluoroacético (Tam *et al.*, 1986)) que o empregado na etapa de desproteção, a fim de se clivar o peptídeo da resina. Nota-se aí um inconveniente dessa estratégia de síntese. Trabalha-se com um grupo protetor lábil em meio ácido, bem como com uma resina lábil em meio ácido. O detalhe é que o ácido empregado na etapa de desproteção é um ácido mais fraco, o que não causa a clivagem muito significativa de fragmentos peptídicos da resina, entretanto é evidente que tal clivagem indesejada era inevitável, mesmo que em pequena escala. Tal fator levou então a uma busca por grupos protetores que fossem lábeis em meio básico, tendo sido alcançados bons resultados para o grupo Fmoc (9-fluorenil-metóxi-carbonil – ver esquema 1.1, p. 12) (Caprino & Han, 1972). A grande vantagem dessa estratégia de síntese está no fato que, após cada acoplamento, é utilizada uma solução básica para se efetuar a remoção do grupo protetor (desproteção), a qual não causa a clivagem de peptídeo da resina, pois essa última ligação é lábil em meio ácido (Chang & White, 2000; Caprino & Han, 1972).

A seguir é apresentado o Esquema 1.1, que descreve de forma sucinta a estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida. Inicia-se o processo de síntese pela clivagem do grupo Fmoc da resina (etapa 1a), a qual é efetuada pelo emprego de uma solução básica (piperidina, por exemplo). Como os peptídeos estudados neste projeto de doutorado são amidados na fração C-terminal (ver seção 1.1), decidiu-se utilizar no Esquema 1.1 a representação de uma resina do tipo amida. Para se realizar a colagem do primeiro aminoácido à resina, esse deve ser inicialmente ativado, a fim de se ter um grupo mais reativo que a carboxila ácida convencional (etapa 1b). Várias técnicas de ativação são encontradas na literatura (Chan & White, 2000). Uma vez ativado o aminoácido, procede-se então a reação de acoplamento entre esse e a resina com, auxílio de agitação mecânica (etapa 2), obtendo-se então o aminoácido protegido ligado à resina.



Esquema 1.1 – Esquema de síntese em fase sólida de peptídeos, segundo estratégia Fmoc.



Para realizar uma reação de acoplamento de um outro resíduo de aminoácido, deve-se proceder a etapa de desproteção do aminoácido ligado à resina (etapa 3a) e a etapa de ativação do Fmoc-aminoácido a ser acoplado (etapa 3b). Procede-se então uma reação de acoplamento (etapa 4) e tem-se como resultado um dipeptídeo (protegido na porção amino terminal) ligado à resina. São então efetuadas novas etapas de desproteção e acoplamento (etapa 5), até que se tenha obtido o peptídeo desejado ligado à resina. Após todas essas etapas, procede-se uma última reação de desproteção (etapa 6a), e o peptídeo desejado é finalmente clivado da resina pelo emprego de uma solução ácida (etapa 6b).

### 1.2.1 – Remoção do grupo Fmoc

A etapa de desproteção, ou seja, remoção do grupo Fmoc, consiste na remoção de um próton do dito grupo pela por uma base (por exemplo a piperidina), sucedendo-se então a clivagem do grupo Fmoc com a liberação de gás carbônico e da peptidil-resina com seu grupo amino terminal desprotegido. O mecanismo proposto para a reação de desproteção é apresentado na Figura 1.3 (Chan & White, 2000).

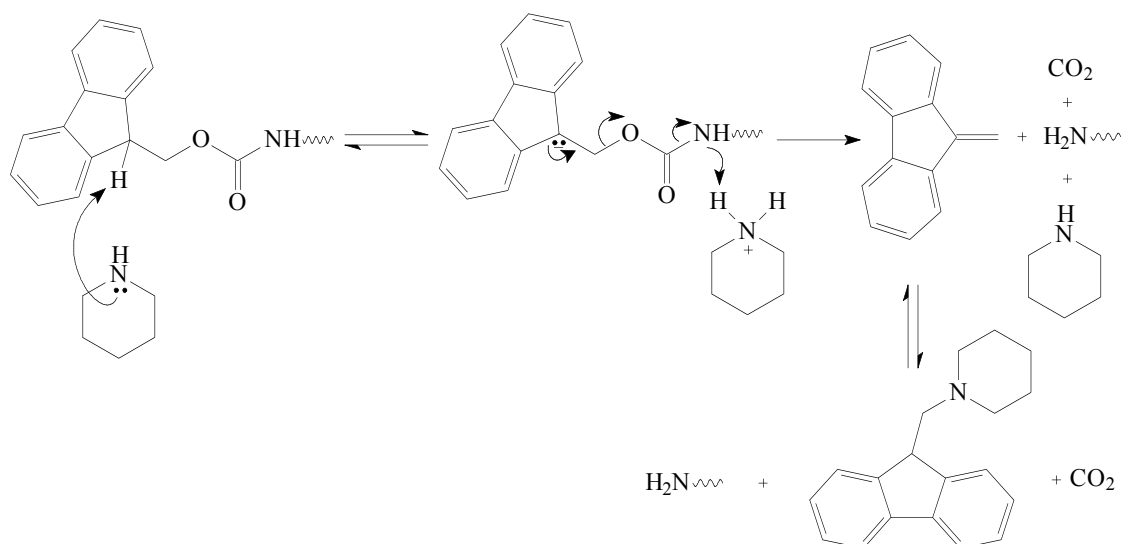


Figura 1.3 – Mecanismo genérico proposto para a reação de desproteção (remoção do grupo Fmoc) com piperidina em Fmoc-peptidil-resinas.

## 1.2.2 – Ativação do Fmoc-Aminoácido para reações de acoplamento

Dentre as possíveis técnicas existentes de ativação de Fmoc-aminoácidos para reações de acoplamento (Chan & White, 2000), decidiu-se utilizar neste trabalho a técnica conhecida como *síntese de ésteres OXt*, devido justamente ao intermediário ativo formado na reação (Figura 1.4) (Montalbetti & Falque, 2005; Chan & White, 2000). Nesse caso, tem-se inicialmente uma reação entre o Fmoc-aminoácido e a 1,3-di-isopropil-carbo-di-imida (DIC), seguindo-se o acoplamento com o 1-hodróxi-benzotriazol (HOBt), que leva à liberação de uma di-amida similar à uréia e à formação do éster ativo OXt. Ocorre, então, o ataque da peptidil resina à carbonila do éster ativo, obtendo-se finalmente o acoplamento e a Fmoc-peptidil-resina resultante, bem como a simultânea liberação de HOBt. Para que ocorra a formação do éster OXt, deve-se deixar o sistema Fmoc-aminoácido/DIC/HOBt dissolvido em dimetilformamida (DMF) em processo de ativação por pelo menos dez minutos, antes da reação com a peptidil resina.

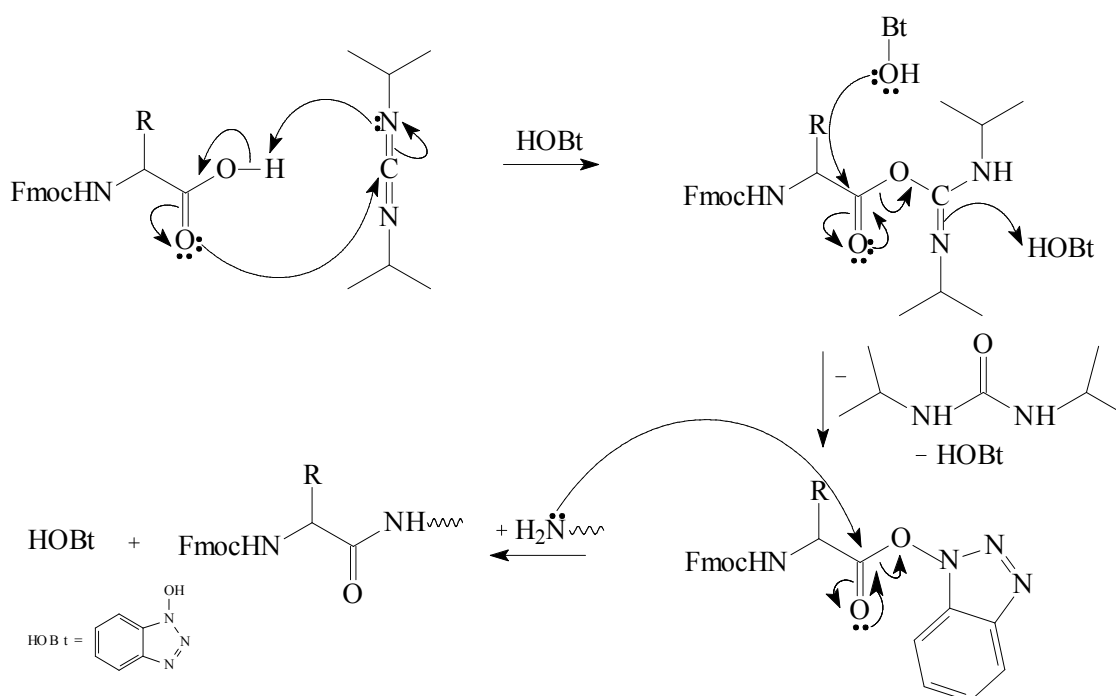


Figura 1.4 – Mecanismo genérico proposto para a reação de acoplamento de Fmoc-aminoácidos à peptidil-resinas pelo método de ésteres OXt.

Um fator importante a ser comentado aqui, é sobre o uso de um detergente (neste trabalho usou-se o TRITON) nas etapas de desproteção e acoplamento. À medida que a cadeia peptídica vai aumentando na peptidil-resina, é comum que o peptídeo comece a adquirir estrutura secundária, além do que, dependendo do tipo de resina, esses peptídeos podem se tornar de difícil acesso devido ao impedimento estérico. Esse problema é conhecido como agregação e acaba por gerar impedimento à aproximação do Fmoc-aminoácido à peptidil resina. O emprego de um detergente como o TRITON, possibilita a desaglomeração das cadeias peptídicas e, por conseguinte, uma solvatação mais eficiente dessas e uma maior liberdade para o ataque do Fmoc-aminoácido à peptidil-resina.

### **1.2.3 – Clivagem do peptídeo da peptidil-resina**

Na estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, utiliza-se grupo protetor Fmoc (Esquema 1, p. 12) que é lábil em meio básico, todavia utiliza-se uma resina, bem como grupos protetores de cadeias laterais, que são lábeis em meio ácido. Dessa forma, tem-se que um ácido como o ácido trifluoroacético (TFA) promove a clivagem do peptídeo da resina, bem como a clivagem dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Chan & White, 2000; Kent, 1988). Durante o processo de clivagem são geradas espécies catiônicas altamente reativas, as quais são provenientes desses grupos protetores e da resina. Essas espécies, caso não sejam modificadas, podem atacar grupos funcionais ricos em elétrons. Por esse motivo, reagentes nucleofílicos conhecidos como *scavengers* são utilizados juntamente ao TFA. O *scavenger* mais utilizado é a água, que é moderadamente efetiva na neutralização da ação de cátions *t*-butila (1,2-etanoditiol é o melhor *scavenger* usado para cátion *t*-butila, mas seu uso é evitado devido à sua toxicidade e ao seu odor demasiadamente desagradável). O tri-isopropilsilano (TIS) é um reagente muito efetivo na neutralização da ação de grupos Trt e Boc, bem como de alguns grupos liberados da resina. Nas sínteses realizadas neste trabalho, empregou-se uma solução de clivagem TFA:TIS:água na proporção de 95,0:2,5:2,5 (v/v), entretanto, quando outros aminoácidos como cisteína, metionina e triptofano estão presentes outros *scavengers* (tóxicos e de

odor desagradável) devem ser empregados (Chan & White, 2000; Fmoc resin cleavage and deprotection – Protocolo de clivagem da Novabiochem).

### **1.2.4 – Teste de Kaiser**

O teste de Kaiser, também conhecido como teste da ninidrina, é usado para identificação de amins primárias. Nesse teste, a peptidil-resina é lavada e secada, sendo então uma pequena alíquota transferida para um tubo de ensaio. Adiciona-se a esse tubo de ensaio uma gota de solução de ninidrina a 5 % em etanol, duas gotas de solução de 80 % de fenol em etanol e uma gota de solução de KCN/água em piridina (2 mL de solução 0,001 mol / L de KCN em 98 mL de piridina) e o tubo é aquecido a 120°C entre 4 a 6 minutos (Chan & White, 2000).

Caso a solução e a resina mantenham coloração amarela, o teste é negativo, indicando acoplamento eficiente (no caso de reações de acoplamento), ou desproteção ineficiente (no caso de etapa de desproteção, significa que lavagens extras com solução de piperidina em DMF devem ser efetuadas para se ter desproteção eficiente).

Caso a solução apresente coloração violeta e/ou a resina apresente coloração escura, tem-se o resultado positivo, indicando desproteção eficiente (no caso de reações de remoção do grupo Fmoc), ou que a reação de acoplamento não chegou ao seu final (tendo-se a necessidade de se fazer a reação de acoplamento adicional).

O mecanismo por trás da reação de Kaiser é apresentado a seguir na Figura 1.5 (p. 17). A primeira etapa da reação de Kaiser está relacionada ao ataque nucleofílico do par de elétrons não ligantes do nitrogênio do aminoácido a uma carbonila da ninidrina que, após perda de água, leva à formação de imina, a qual sofre rearranjo e, após hidrólise, tem-se a formação de uma amina primária, que, por reação com outra molécula de ninidrina e perda de água, leva à formação de uma nova imina que apresenta forte coloração violeta, indicando, então, resultado positivo para o teste.

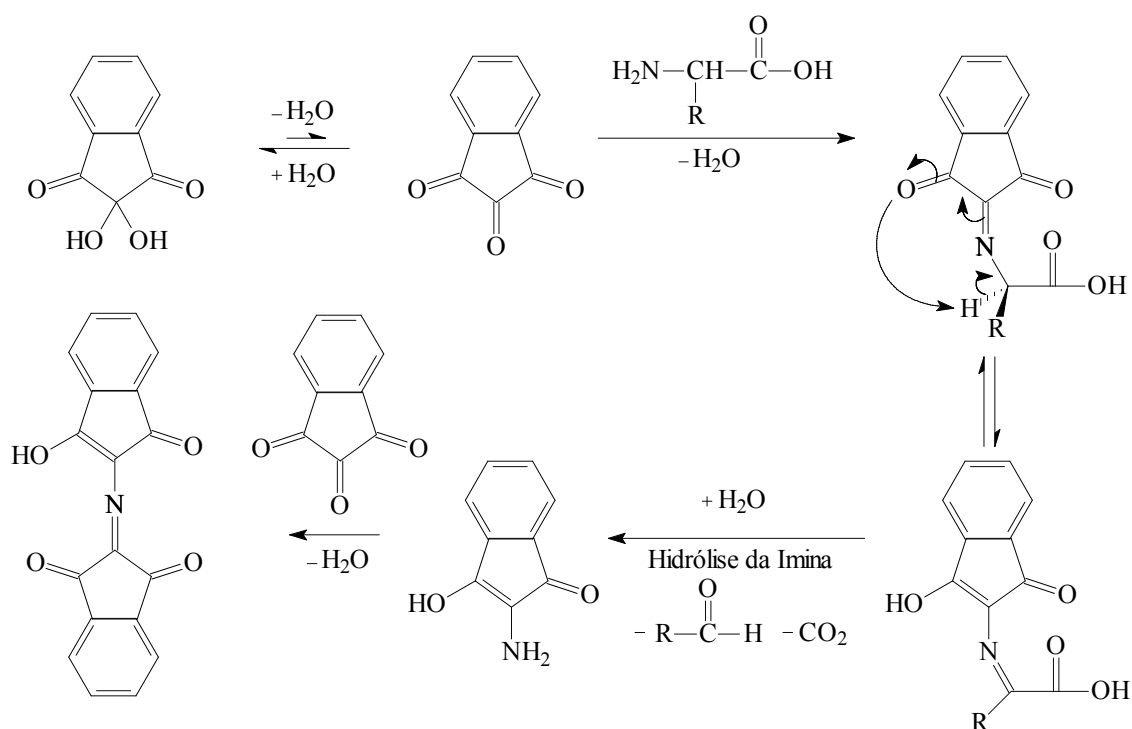


Figura 1.5 – Mecanismo genérico proposto para o teste de Kaiser.

### 1.3 – Dicroísmo circular

Tem-se, associado a uma componente de luz plano-polarizada, um campo elétrico oscilante  $E$  que pode ser decomposto em duas componentes, uma correspondente a uma onda circularmente polarizada à direita ( $E_R$ ) e a outra correspondente a uma onda circularmente polarizada à esquerda ( $E_L$ ). Após passar através de uma meio opticamente ativo, essas componentes  $E_L$  e  $E_R$  não apenas apresentam diferentes velocidades devido aos diferentes índices de refração  $n_L$  e  $n_R$  (birrefringência circular), mas também são diferencialmente absorvidas (Cabréé, 1965). Nesses casos, como  $E_L$  é diferente de  $E_R$ , a resultante  $E$  não irá oscilar ao longo de uma circunferência, ao contrário,  $E$  irá seguir uma elipse. Dessa forma, quando um meio opticamente polarizado é transpassado por uma componente de luz plano polarizada na região de comprimento de onda de absorção de um cromóforo opticamente ativo, não apenas o plano de polarização gira de um ângulo  $\alpha$ , mas a luz resultante é elipticamente polarizada, ou seja, o meio exibe dicroísmo circular (CD). As probabilidades de transições quânticas

são diferentes para a luz polarizada à esquerda e à direita (Schellman, 1975 & Cabré, 1965).

A técnica de dicroísmo circular permite a determinação da estrutura secundária de peptídeos e proteínas (Johnson, 1988) através da absorção da luz circularmente polarizada. A grandeza física mais frequentemente obtida é a elipticidade,  $\theta$ , que é proporcional a  $\Delta A$ , diferença de absorção dos dois componentes da luz polarizada circularmente ( $\theta = 32,98 \Delta A$ ) (Woody, 1996). Peptídeos não estruturados, bem como estruturas secundárias clássicas de peptídeos, como em  $\alpha$ -hélice e fitas  $\beta$  apresentam espectros bem característicos (Greenfield & Fasman, 1969), de forma que essa técnica permite uma análise semi-quantitativa das proporções dos diferentes domínios de estruturas secundárias existentes em proteínas.

Em particular, a espectroscopia de dicroísmo circular é bastante utilizada em estudos que tentam simular o efeito das membranas biológicas sobre as conformações peptídicas. Co-solventes orgânicos, tais como acetonitrila, 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), e detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) são usados frequentemente para mimetizar a membrana e determinar assim a conformação induzida relevante para a atividade do peptídeo (Jasanoff & Fersht, 1994). Sistemas que representam modelos mais complexos de membranas biológicas, como vesículas, são também utilizados em estudos de CD que visam a análise de interações entre peptídeos e membranas (Ding *et al.*, 2002).

## **1.4 – Ressonância Magnética Nuclear – Uma abordagem Histórica**

Stern e Gerlach notaram, no início da década de 1920, que um feixe de átomos de prata é desviado, ao passar por um campo magnético não homogêneo. Isso fez com que Pauli propusesse, em 1924, que um certo tipo de núcleo deveria possuir uma componente de momento angular de *spin*. Seguindo com os estudos de Stern e Gerlach, Rabi e colaboradores conseguiram enfim observar um

primeiro fenômeno associado à ressonância magnética nuclear (RMN), na qual um feixe de moléculas absorvia energia na região de radiofrequência e sofria um desvio na sua trajetórias (Andrew & Szczesniak, 1995; Emsley & Feeney, 1995; Gil & Geraldes, 2002; Eisberg & Resnick, 1974).

Deve-se comentar que, entre esse período, tentativas efetuadas por Gorter e colaboradores falharam no objetivo de detectar efeitos de RMN em matérias condensadas. Provavelmente tais tentativas falharam, devido aos altos tempos de relaxação spin-rede existentes nas amostras escolhidas, que, provavelmente, levaram a uma situação de saturação, impedindo a observação da ressonância (Andrew & Szczesniak, 1995; Gil & Geraldes, 2002).

Entretanto, no final de 1945, dois grupos independentes, um coordenado por Purcell na Universidade de Havard e outro coordenado por Bloch na Universidade de Stanford, obtiveram pela primeira vez sucesso na detecção da ressonância magnética de hidrogênio em matéria condensada. O primeiro grupo trabalhou com parafina e o segundo grupo com água. Deve-se ressaltar que esses grupos possuíam conhecimentos sobre a importância da relaxação e tomaram cuidados para evitar problemas de saturação. Prova disso é que o grupo coordenado por Bloch adicionou compostos paramagnéticos em algumas amostras de água, para se ter um processo de relaxação mais eficaz. Tais trabalhos renderam a Purcell e Bloch o Prêmio Nobel em Física em 1952 (Andrew & Szczesniak, 1995; Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Gil & Geraldes, 2002).

Um resultado já bem perceptível nesses trabalhos era que o sinal da amostra líquida (água) se apresentava bem mais estreito que o da amostra sólida, o que viria a indicar a existência de interações que são normalmente eliminadas na fase líquida, todavia apresentando papel significativo na ressonância em fase sólida (Andrew & Szczesniak, 1995).

O fenômeno da RMN, no início do processo de sua constatação, foi um grande atrativo para os físicos. Entretanto, suas aplicações em química começaram a aparecer após a realização de um experimento “frustrado”, conduzido por Arnald e Packcard (alunos de Bloch) em 1951. Nesse

experimento, tentou-se medir a ressonância em uma amostra de etanol, sendo o resultado esperado um sinal mais intenso que o obtido pelo experimento com a água. Todavia, o que se constatou, foram três sinais distintos, que apresentavam a proporções de intensidade de 3:2:1. Percebeu-se, então, estar a ocorrência dos três sinais em frequências diferentes associada ao deslocamento químico de hidrogênio, que poderia fornecer informações estruturais sobre as moléculas, tendo-se assim um resultado de aparente interesse aos químicos. Deve-se ressaltar que ressonâncias em diferentes frequências já haviam sido previamente constatadas no estudo do nitrato de amônio, tendo sido tal trabalho também efetuado no grupo de Bloch, por Proctor e Yu (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Gil & Geraldles, 2002).

Uma outra constatação que apareceu de forma surpreendente, essa feita por Proctor e Yu, foi o desdobramento da estrutura do sinal de ressonância de  $^{121}\text{Sb}$  na amostra de  $\text{NaSbF}_6$ , que, juntamente com considerações efetuadas por Gutowsky e McCall e por Purcell e Ramsey, caracterizou-se como um tipo de acoplamento diferente dos conhecidos até então. Era sabido da existência de acoplamentos dipolares em sólidos, todavia esses eram anulados na fase líquida, devido a efeitos de dinâmica molecular. Concluiu-se serem tais interações no estado líquido provenientes de uma interação entre os núcleos, a qual era transmitida através das ligações químicas, tendo sido então constatado o acoplamento escalar spin-spin (Emsley & Feeney, 1995).

Uma vez que tais resultados haviam sido difundidos pela a comunidade científica mundo afora, Russell Varian, ao retornar para Stanford após a Segunda Guerra Mundial, entrou em acordo com Bloch e Hansen a respeito da patente de seus experimentos, fundando em 1948 a Varian Associates. Essa empresa contratou os serviços de alguns estudantes de Bloch e o resultado foi o desenvolvimento do primeiro espectrômetro de RMN com uma certa resolução e sensibilidade que propiciaram seu lançamento para o mercado (Shoollery, 1995).

Tendo sido iniciado tal comércio de espectrômetros, começou a haver retorno financeiro, que era em parte convertido para pesquisa e desenvolvimento na área. Foram então sendo construídos espectrômetros mais estáveis e com



campos magnéticos mais homogêneos, sendo o melhoramento de ambos os fatores crucial ao aumento da resolução dos experimentos. Desenvolveu-se para tal um complexo sistema de bobinas, que possibilitava o auto ajuste do campo de forma a garantir uma certa estabilidade ao fluxo magnético (Shoollery, 1995).

Os trabalhos acima comentados envolveram pesquisa de ponta na época em que foram efetuados, entretanto um simples detalhe observado por Bloch possibilitou uma melhora sensível na homogeneização do campo. Esse processo é que a aquisição dos espectros com a amostra girando, de forma a se eliminarem efeitos de gradientes de campo transversais, sendo a maior parte do problema restrita ao eixo longitudinal (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995).<sup>Δ</sup>

Com relação à questão da aquisição da ressonância com o emprego de giro de amostras, deve-se ressaltar uma outra grande descoberta no final da década de 1950, entretanto direcionada à RMN em fase sólida. Andrew e colaboradores, bem como Lowe e colaboradores, demonstraram, a partir de cálculos teóricos e resultados experimentais, que a aplicação de um giro a uma alta frequência na amostra, em torno de um ângulo de  $54^{\circ} 44'$  era capaz de eliminar os efeitos de alargamento de sinais de RMN na fase sólida devido ao cancelamento de interações dipolares e da anisotropia do deslocamento químico, resultando na aquisição de sinais bem mais resolvidos para a fase sólida. Esse ângulo ficou conhecido como ângulo mágico e tal técnica como MAS (*Magic-Angle Spinning*) (Andrew & Szczesniak, 1995; Emsley & Feeney, 1995).

Posteriormente, ainda se descobriram técnicas capazes de remover outros efeitos de alargamento de sinais em sólidos, como efeitos de quadrupolo. Isso era feito pelo emprego de um giro em um segundo ângulo, os quais poderiam ser  $30^{\circ} 34'$  ou  $70^{\circ} 7'$ . Tais técnicas são conhecidas como DOR (*Double-Orientation Rotation*) e DAS (*Dynamic Angle Spinning*) (Mueller *et al.*, 1990; Samson *et al.*, 1988). Com o desenvolvimento de técnicas de ressonância múltipla, pode-se chegar ainda a outros experimentos como o CRAMPS (*Combined Rotational and Multiple Pulse Spectroscopy*) e CPMAS (*Cross Polarization Magic-Angle*

---

<sup>Δ</sup> Devido às altas homogeneidades de campos atuais, não é comum o emprego de giro em experimentos de RMN em solução, pois o giro pode levar a artefatos no espectros.

*Spinning*), que podem aumentar também a resolução e intensidade dos sinais de RMN na fase sólida (Macomber, 1998; Andrew & Szczesniak, 1995).

Até o início da década de 1960, os espectrômetros de RMN funcionavam com o emprego de eletromagnetos. Parecia existir, portanto, uma barreira igual a 2 T, que não seria ultrapassada, devido a problemas como o gasto de energia, necessidade de resfriamento, tamanho do magneto, dentre outras complicações. Todavia, progressos na ciência dos materiais mostravam a existência de compostos acessíveis, que poderiam apresentar, a baixas temperaturas, a característica de supercondutividade. Dessa forma, o fluxo de elétrons sem a existência de resistência, possibilitou à Varian, em 1962, a construção do primeiro espectrômetro com o eletroímã substituído por um supercondutor, com um campo equivalente a 4,7 T, ou seja, um espectrômetro de 200 MHz.<sup>Δ</sup> Em 1968, a marca de 300 MHz já havia sido alcançada, entretanto problemas como o elevado preço do aparelho e a necessidade de hélio líquido para a sua manutenção, obliteraram, a princípio, a difusão efetiva desse tipo de equipamento no mercado (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995).

Nos estudos preliminares efetuados por Bloch e seu grupo, já era notada a possibilidade de se promover a ressonância de núcleos com emprego de pulsos de radiofrequência (RF), tendo sido tal fenômeno também constatado por Hahn em suas descobertas, como o eco de *spin*. Tendo em conta tais fatos, Ernst e colaboradores conseguiram excitar núcleos em uma região espectral inteira e observaram como resultado o decaimento da magnetização transversal resultante, ou decaimento livre da indução (FID), que apresentava sinais no domínio do tempo. Constatou-se então que a aplicação da transformada de Fourier, poderia transformar o FID para um espectro de RMN convencional, no domínio da frequência (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Ernst, *et al.*, 1966).

Avanços tecnológicos nas áreas da eletrônica e computação, bem como a descoberta de técnicas de ressonância múltipla, como o desacoplamento em banda larga, outra importante inovação apareceu de forma a revolucionar o uso

---

<sup>Δ</sup> Frequência de ressonância de <sup>1</sup>H de 100 MHz indicada em um espectrômetro de RMN, equívale a um campo magnético de 2,35 T.

da ressonância magnética nuclear em suas várias áreas de atuação. Aliando-se tais técnicas à RMN pulsada (ou de transformada de Fourier), foi possível tornarem mais simples as aquisições de espectros de RMN de núcleos pouco sensíveis, como  $^{13}\text{C}$  (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995).

Tais idéias inovadoras, bem como avanços posteriores na área de computação, possibilitaram a uma empresa alemã, a Bruker GmbH, o lançamento no mercado do primeiro espectrômetro pulsado ou de TF (transformada de Fourier) que veio a possibilitar aos químicos, a aquisição rotineira de espectros de núcleos pouco sensíveis. Ressalta-se também que enormes avanços na área de materiais, bem como a modernização de aparatos em espectrômetros, principalmente por parte da Bruker, possibilitaram a construção de espectrômetros com campos magnéticos cada vez mais elevados, tendo sido alcançada, em 1979, a marca de 500 MHz (Shoollery, 1995).

Em uma escola de verão promovida na Iugoslávia, em 1971, foi proposto por Jeener, de forma teórica, um experimento que consistia de dois pulsos, sendo aplicado entre eles um tempo que variasse com um pequeno incremento. Aplicar-se-ia a cada seqüência, a transformada de Fourier no FID detectado após o segundo pulso, e obter-se-ia, então, uma série de espectros que seriam modulados pelo intervalo variado de tempo entre os pulsos. A aplicação da transformada de Fourier em uma segunda dimensão, conduziria assim a um espectro bidimensional, apresentando uma correlação entre as duas dimensões (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Bax, 1985).

Posteriores avanços na computação permitiram a elaboração sucinta de tais técnicas e trabalhos desenvolvidos por Ernst e colaboradores concretizaram a técnica de RMN bidimensional. Em 1976, um trabalho publicado por Aue, Bartholdi e Ernst, descrevia o funcionamento das técnicas de espectroscopia bidimensionais e possíveis formas de sua aplicação na RMN. Trabalhos como esse incentivaram a descoberta de inúmeras técnicas, como o HETCOR e o NOESY. Pelos seus trabalhos associados à aplicação da transformada de Fourier e aos experimentos bidimensionais na área da RMN, Ernst foi agraciado com o

prêmio Nobel em química em 1991, ou seja, a RMN conseguia o seu segundo Prêmio Nobel (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Aue *et al.*, 1976).

Um outro avanço, que se iniciou em 1979 e se difundiu durante a década de 1980, é associado aos processos de detecção inversa, sendo possível se detectarem núcleos pouco sensíveis, no canal de núcleos mais sensíveis, como  $^1\text{H}$ , alcançando-se então um enorme avanço para a detecção de sinais. O trabalho pioneiro nessa área foi introduzido por Müller, que apresentava uma técnica que, além de apresentar maior sensibilidade na detecção, era baseada na evolução de coerências de múltiplo quantum (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Müller, 1979).

O aumento contínuo na resolução dos espectrômetros, bem como o aparecimento das técnicas de detecção inversa, começaram a despertar interesse nos bioquímicos, tendo sido logo adaptadas técnicas para a detecção inversa de núcleos de nitrogênio, o que possibilitava estudos de moléculas de interesse biológico, como peptídeos e ácidos nucleicos. Além do que, experimentos baseados no efeito nuclear Overhauser, ou *nOe*, (Carver & Slichter, 1956; Carver & Slichter, 1953; Overhauser, 1953) possibilitavam especulações sobre as conformações dessas classes de moléculas em solução. Em 1985, Wüthrich e colaboradores apresentaram o primeiro trabalho da elucidação estrutural de uma proteína globular, baseando-se apenas em técnicas de RMN (Andrew & Szczesniak, 1995; Cohen *et al.*, 1995; Shoollery, 1995; Williamson *et al.*, 1985).

Seguindo-se com os avanços da ressonância magnética, destaca-se, na década de 1990, a grande melhoria na qualidade dos espectros e mapas de contornos de RMN, bem como a redução de tempo de máquina devotada à aquisição de experimentos. Isso foi possível, devido à implementação de pulsos de gradientes de campo, os quais se apresentaram eficientes na eliminação de ruídos e artefatos, de tal maneira a substituírem os processos de ciclagem de fase e de filtros na RMN. Ressalta-se também o avanço nos espectrômetros, sendo encontrados no comércio aparelhos de até 750 MHz até o final dessa década (Emsley & Feeney, 1995; Shoollery, 1995; Claridge, 1999).

Todavia a RMN continua em processo de evolução, sendo várias técnicas novas ainda desenvolvidas. Pode-se ressaltar o emprego de criosondas, permitindo a aquisição de experimentos de RMN com ínfimas quantidades de amostra (da ordem de nanogramas) e a evolução da RMN em fase sólida no estudo de amostras biológicas, encontrando-se na literatura trabalhos sobre determinações de estruturas tridimensionais de proteínas via emprego de técnicas de RMN em fase sólida, o que possibilita até a determinação de estruturas peptídicas em ambientes de membrana (Jaroniec *et al.*, 2004; Castellani *et al.* 2002; Fu & Cross, 1999; Cross, 1997). Ressalta-se ainda o Prêmio Nobel em Química cedido a Kurt Wüthrich em 2003, por seus trabalhos associados à RMN de proteínas e ácidos nucleicos. É ainda destacada a existência de espectrômetros de 950 MHz no comércio, sendo já aguardada a instalação do primeiro espectrômetro de 1GHz na cidade de Lyon, França (<http://www.ens-lyon.fr/web/nav/article.php?id=703>). Portanto a RMN se encontra em etapa de voraz desenvolvimento e com certeza várias outras técnicas e aplicações serão encontradas até o fim desta década.

## 1.5 – Experimentos de RMN

Esta seção é direcionada à descrição dos experimentos de RMN realizados neste trabalho de tese. São apresentadas as técnicas de aquisições de experimentos, os mecanismos físicos envolvidos e os resultados esperados. Discutem-se também implementações nas seqüências de pulsos, como a aplicação de pulsos de gradientes de campo, que possam vir a fornecer melhores resultados.

Foram adquiridos, para as amostras de todos os peptídeos, experimentos de RMN em solução empregando técnicas de TOCSY, NOESY, DQF-COSY, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Experimentos de RMN em fase sólida de  $^{31}\text{P}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$  foram adquiridos pelo emprego de técnicas de eco de Hahn, polarização cruzada (CP) e eco quadrupolar, respectivamente, para todos os peptídeos incorporados em bicamadas lipídicas. O experimento de Inversão de Polarização com Troca de Spin no Ângulo Mágico (*Polarization Inversion with Spin*

*Exchange at the Magic Angle* – PISEMA) foi também adquirido para uma amostra contendo o PS-3 incorporado a bicamadas lipídicas. Maiores detalhes são explicados no decorrer desta seção, bem como na seção de metodologias (item 2.3, p. 60).

### **1.5.1 – Introdução à RMN bidimensional**

Em trabalhos de elucidação estrutural por RMN de polipeptídeos/proteínas e de outras classes de macromoléculas (como ácidos nucléicos) em solução, é imprescindível o emprego de experimentos multidimensionais (Wüthrich, 1986). Tal fato ocorre, principalmente, devido a problemas de sobreposição de sinais em experimentos unidimensionais, além do que, tem-se de uma forma muito mais direta em experimentos multidimensionais, a correlação de informações como conectividades estruturais (HSQC, por exemplo) e vizinhanças espaciais (NOESY, por exemplo) do que com experimentos seletivos unidimensionais.

O presente trabalho engloba o estudo de peptídeos contendo dezenove resíduos de aminoácidos. Peptídeos dessa magnitude podem ter, via de regra, sua completa elucidação estrutural a partir de experimentos bidimensionais (2D), de forma que se optou pela aquisição desse tipo de experimento. Será aqui apresentada uma breve descrição desse tipo de metodologia, entretanto explicações mais detalhadas são encontradas nas referências Cavanagh *et al.*, 2007; Levitt, 2006; Teng, 2005; Claridge, 1999; Derome, 1987; Gil & Geraldes, 2002; Bax, 1985; Breitmeier & Voelter, 1986. Esse tema é apresentado com um formalismo mais conciso na referência Aue *et al.*, 1976.

Nos esquemas de seqüências de pulsos de RMN unidimensional, ou RMN 1D, os programas de pulsos envolvem duas etapas bem distintas. A primeira etapa engloba os pulsos de RF e os tempos de evolução das magnetizações. Tem-se a seguir, a segunda etapa, que é associada à detecção das magnetizações. Os tempos que englobam essas etapas de evolução e detecção são denominados  $t_1$  e  $t_2$ , respectivamente. Processando-se então a transformada de Fourier dos sinais detectados em função do tempo, obtém-se um espectro em função da frequência.

Considere-se a seqüência de pulsos apresentada a seguir (Figura 1.6), na qual se aplica, inicialmente, um pulso de  $90^\circ_x$ , deixando-se então a magnetização evoluir por um período  $t_1$ , seguindo-se outro pulso de  $90^\circ_x$  e, por fim, a detecção de sinal ao longo do eixo  $x$  durante um intervalo de tempo  $t_2$  (desconsidere-se o efeito da relaxação longitudinal).

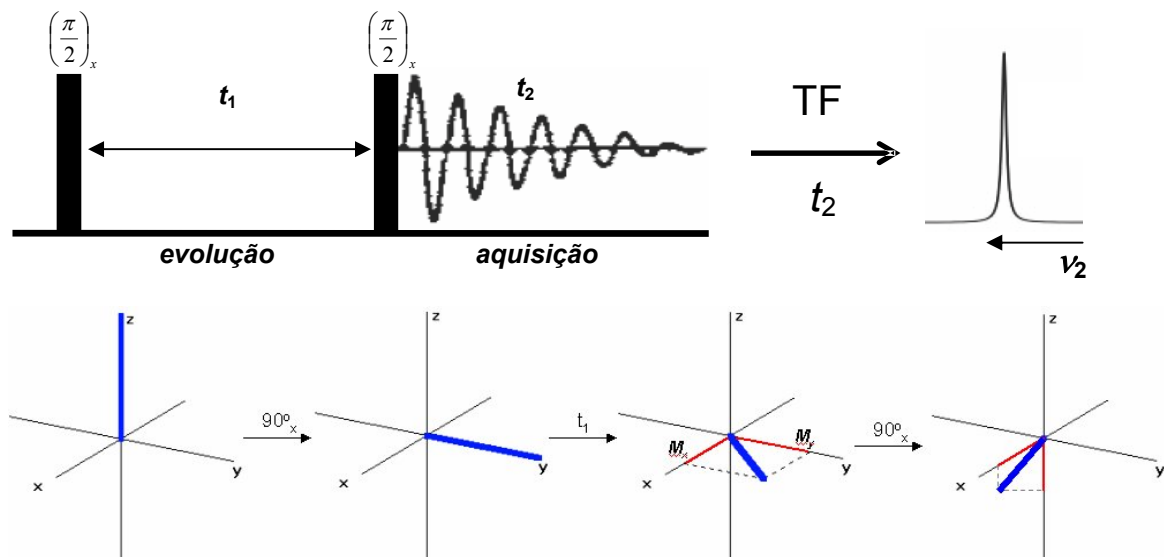


Figura 1.6 – Representação vetorial das magnetizações após seqüência  $90^\circ_x$ -evolução- $90^\circ_x$ -detecção.

Percebe-se que no final é detectada apenas a componente em  $x$  da magnetização transversal, pois a componente em  $y$  é enviada ao eixo  $z$  pelo segundo pulso de  $90^\circ$ . O que se observa é que a magnitude e fase do sinal detectadas ao longo do eixo  $x$ , irá justamente depender do tempo  $t_1$ , no qual se permite a evolução magnetização transversal após o primeiro pulso de  $90^\circ$ .

Considere-se então, a aquisição de diversos espectros, seguindo-se essa seqüência, todavia se implementando para cada um, pequenos incrementos no valor de  $t_1$ . Isso levaria aos vários espectros apresentados na Figura 1.7 (p. 28) onde se observa inicialmente uma intensidade próxima de 0, pois a componente transversal da magnetização estaria próxima a  $y$ , a qual iria atingir um máximo positivo quando evoluísse até  $x^+$  e um máximo negativo quando estivesse em  $x^-$ .

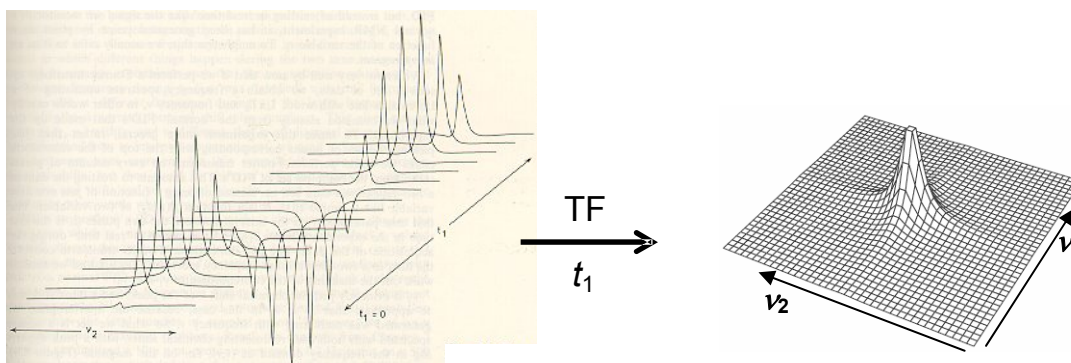


Figura 1.7 – Espectros de RMN adquiridos em  $t_2$  e modulados em  $t_1$ . Seguindo-se aplicação de Transformada de Fourier na dimensão de  $t_1$ , obtém-se o espectro bidimensional em função das frequências  $\nu_1$  e  $\nu_2$  de evolução da magnetização durante  $t_1$  e  $t_2$ , respectivamente (Figura retirada da referência Derome, 1985).

Percebe-se então um comportamento senoidal na seqüência do sinal dos espectros da Figura 1.7. Considerando-se então a perda de coerência de fase da magnetização transversal devido à relaxação spin-spin, percebe-se também que a amplitude dessas oscilações irá diminuir com o aumento de  $t_1$ , de forma a se obter para esse sinal um decaimento conforme o descrito por um FID. O que é então representado na Figura 1.7, é o sinal de uma ressonância com frequência  $\nu_2$  (detectado em  $t_2$ ) e modulado pelo tempo de evolução em  $t_1$ , que apresenta decaimento típico de um FID. Assim, aplicando-se também a transformada de Fourier nos domínios de  $t_1$ , obtém-se como resultado uma correlação que associa as frequências  $\nu_1$  (associada à evolução em  $t_1$ ) e  $\nu_2$ . Como foram levadas em consideração as frequências de Larmor dos núcleos para evolução em  $t_1$  e para detecção do sinal em  $t_2$ , obtém-se um sinal que pode ser representado como uma curva de níveis que conecta os valores de frequências.

Dessa forma são obtidos os picos diagonais em um mapa de contornos de RMN. Todavia o real interesse nesse tipo de um experimento (por exemplo, COSY ou NOESY), está associado às propriedades (por exemplo, acoplamentos escalares ou dipolares) de pares de núcleos não equivalentes, de forma que os pulsos façam com que, uma magnetização que precesse com frequência  $\nu_1$  durante a evolução, passe a precessar com frequência  $\nu_2$  durante a detecção, sendo então originados os picos cruzados (Kessler *et al.*, 1988).



Nos vários experimentos de RMN 2D a serem aqui discutidos, serão encontrados dois parâmetros que terão atuação significativa na duração dos experimentos. Um desses parâmetros é o número de transientes (*ns*) a serem acumulados em um FID para cada valor específico de  $t_1$ . Daí conclui-se que um grande número de transientes leva a um maior tempo de experimento. Outro fator a ser decidido é o número de incrementos  $\Delta t_1$  a serem acrescentados no valor inicial de  $t_1$ . A escolha de pequenos incrementos levaria a uma modulação mais precisa dos sinais em  $F2$  (dimensão de frequências do mapa de contornos associada a  $\nu_2$  – Figura 1.7, p. 28) originando um mapa de contornos com alto grau de resolução em  $F1$  (dimensão de frequências do mapa de contornos associada a  $\nu_1$ ). Todavia, quanto menores os valores de  $\Delta t_1$ , maiores os tempos dos experimentos, pois para cada valor de  $t_1$ , adquire-se um espectro que leva o tempo associado à aquisição do número de transientes. O incremento  $\Delta t_1$  está associado ao “número de pontos” em  $F1$ . Quanto mais pontos em  $F1$ , maior o número de incrementos aplicados durante a evolução e, portanto, maior a resolução do mapa de contornos (maior tempo de experimento).

Dessa forma, parece perfeitamente plausível se estabelecerem experimentos com apenas um transiente e então se aumentar o número de pontos em  $F1$ . Todavia, nem sempre um único transiente é suficiente para fornecer um espectro com boa qualidade, como exemplo, em casos de baixa abundância isotópica e de pequena quantidade de amostra (o que é muito comum em RMN de macromoléculas em solução). Outro detalhe é que, em muitos casos, é necessário um número mínimo de transientes, a fim de eliminarem artefatos na RMN, sendo tal processo conhecido como ciclagem de fase (Kingsley, 1995; Shriver, 1992; Derome, 1987; Bodenhausen *et al.*, 1984). Uma solução para essa questão pode ser encontrada na aplicação de pulsos de gradiente de campo, que, muitas das vezes, podem substituir tais ciclagens (ver seção 1.5.5, p. 38).

### **1.5.2 – Supressão do sinal do solvente – Pré-saturação**

Em experimentos de RMN de compostos orgânicos, os solventes normalmente utilizados têm os átomos de  $^1\text{H}$  substituídos por  $^2\text{H}$ . Utilizam-se

solventes deuterados a fim de se obter o chaveamento do campo (*lock*), além do que, a substituição de  $^2\text{H}$  por  $^1\text{H}$  no solvente, faz com que os espectros adquiridos apresentem sinais com intensidades relativas maiores ou próximas às dos sinais de  $^1\text{H}$  residuais do solvente (salvo casos de ínfimas quantidades de amostras, que serão de difícil detecção). Todavia, em amostras de interesse biológico, é muito comum o interesse em sinais de hidrogênios envolvidos em ligações lábeis, como os hidrogênios amídicos de peptídeos e, caso se empreguem solventes como  $\text{D}_2\text{O}$ , ter-se-ia (instantaneamente ou com o passar do tempo) a substituição dos hidrogênios envolvidos em ligações lábeis por deutério. Em situações como essa, é comum o emprego de soluções contendo 90 a 95% de  $\text{H}_2\text{O}$  e 10 a 5% de  $\text{D}_2\text{O}$  (Wüthrich, 1986), sendo essa introdução de deutério necessária a fim de se obter o chaveamento do campo (*lock*).

O uso da água não deuterada acarreta sérios problemas para os espectros e mapas de contornos de RMN. Uma solução aquosa contém uma concentração de 110 mol / L de hidrogênios do solvente em solução, contra uma concentração bem inferior (no caso 0,004 mol / L) de átomos de hidrogênios não equivalentes de soluto (Claridge, 1999). A principal razão para se suprimir o sinal intenso do solvente em casos como esse, é que os sinais do soluto em estudo (bem menos intensos que o do solvente) devem estar dentro da faixa dinâmica (*dynamic range*)<sup>Δ</sup> do receptor de sinal e do conversor analógico digital (ADC). Além disso, sinais tão intensos geram outros problemas como distorções de linha de base e ruídos de  $t_1$  ( $t_1$ -noise) em experimentos 2D (Derome, 1987; Kessler *et al.*, 1988). Um outro sério problema é que sinais muito intensos induzidos na bobina do receptor geram correntes não negligenciáveis, provocando assim um campo magnético de reação que tende a levar a magnetização da água para seu estado de equilíbrio, causando um decaimento mais rápido do sinal e um conseqüente alargamento desse (*radiation damping*) (Barjat *et al.*, 1999; Claridge, 1999). Tal

---

<sup>Δ</sup> A razão entre o sinal mais intenso e um possível sinal menos intenso detectável define a faixa dinâmica do digitalizador. *E.g.*, um digitalizador de 16 bits é capaz de representar valores de  $\pm 32767$  ( $2^{15}-1$ ). A razão entre os sinais mais intenso e menos intenso detectável é, nesse caso, 32767/1. Assumindo-se um ganho do receptor (*receiver gain*) de maneira que o sinal mais intenso preencha completamente o digitalizador em cada transiente, o menor sinal que pode ser registrado tem intensidade relativa igual a 1.

alargamento pode encobrir sinais com deslocamentos químicos próximos ao do hidrogênio do solvente. Todos esses fatores tornam a supressão do sinal do solvente imprescindível nesses casos.

As amostras utilizadas neste trabalho foram preparadas com TFE- $d_2$  e  $H_2O$ , tendo sido o chaveamento do campo possível devido aos deutérios na posição 1 do TFE. Entretanto, a supressão de sinal é imprescindível, devido à presença dos hidrogênios dos grupos hidroxila da água e do TFE.

A técnica de supressão de sinal utilizada neste trabalho foi a pré-saturação (Claridge, 1999). Tal técnica está relacionada à aplicação de uma irradiação contínua na frequência de ressonância do sinal a ser suprimido, sendo tal irradiação efetuada antes do pulso de excitação (Figura 1.8). Isso faz com que os spins de  $^1H$  do solvente estejam saturados (diferença entre populações de diferentes estados de spin nula) e não gerem sinais nos espectros.



Figura 1.8 – Experimento simples de pré-saturação e aquisição

### 1.5.3 – Espectroscopia Total de Correlação (TOCSY)

Um experimento de RMN já bem conhecido e que tem a propriedade de correlacionar núcleos de  $^1H$  que apresentam acoplamento escalar, é a espectroscopia de correlação ou COSY. Esse tipo de experimento, quando conduzido na sua forma clássica, correlaciona apenas núcleos fortemente acoplados (normalmente  $^2J$ ,  $^3J$  e, eventualmente  $^4J$ ), tendo-se normalmente a determinação de hidrogênios separados por duas ou três ligações (Bax, 1985; Bax & Freeman, 1981). Com a introdução de intervalo de tempos (*delays*) na seqüência de pulsos, chegou-se aos experimentos de RELAYED-COSY (*Relayed-Correlation Spectroscopy*) e DOUBLE-RELAYED-COSY (*Double-*

*Relayed-Correlation Spectroscopy*), nos quais é possível se detectarem acoplamentos a maiores ordens de ligação, todavia tendo-se a diminuição das intensidades entre as núcleos mais fortemente acoplados, além do que, tendo-se a necessidade de maiores tempos de aquisição (Kessler, 1988; Bax, 1985; Bax & Freeman, 1981). Em trabalhos antigos realizados com proteínas e peptídeos, essas técnicas de espectroscopia de correlação eram bastante utilizadas, como pode se notar na obra clássica de Kurt Wüthrich, intitulada “*NMR of Proteins and Nucleic Acids*”, publicada em meados da década de 80 (Wüthrich, 1986). Entretanto, essas técnicas de RELAYED-COSY foram completamente substituídas no estudo de peptídeos/proteínas, pelo emprego da técnica conhecida como TOCSY, ou, espectroscopia total de correlação (*Total Correlation Spectroscopy*). Essa técnica se dá por transferência de magnetização de um núcleo de hidrogênio A para um vizinho B, que por sua vez transfere ao vizinho C, então para D e assim por diante, desde que haja acoplamento escalar homonuclear entre os hidrogênios vizinhos, de forma a se ter a propagação da transferência da magnetização. Dessa forma, o TOCSY é muito útil no estudo de moléculas como oligossacarídeos e peptídeos, que são constituídos de unidades formadoras definidas (como açúcares e resíduos de aminoácidos), nas quais se deseja determinar as conectividades. Em casos muito complexos, é ainda comum se utilizarem em conjunto as técnicas de COSY e TOCSY simultaneamente, todavia o TOCSY se tornou uma ferramenta quase que imprescindível na análise de estrutura de peptídeos por RMN 2D.

A chave para a transferência de magnetização em rede é a eliminação das contribuições do efeito Zeeman  $H_zA$  e  $H_zX$  ou fazê-las idênticas. Para tal, as seqüências de pulsos de TOCSY fazem uso de uma técnica conhecida como chaveamento de spin, ou *spinlock*, que foi originalmente desenvolvida para a técnica de polarização cruzada para a RMN em fase sólida, mas foi posteriormente aplicada à RMN em solução (Günther, 1998; Bax, 1985; Bertrand *et al.*, 1978; Pines *et al.*, 1973). Essa técnica de chaveamento de spin pode ser entendida pela aplicação inicial de um pulso de  $90^\circ_x$  (representado por  $B_1$ ), seguindo-se o deslocamento de  $B_1$  para o eixo  $y$  (Figura 1.9).

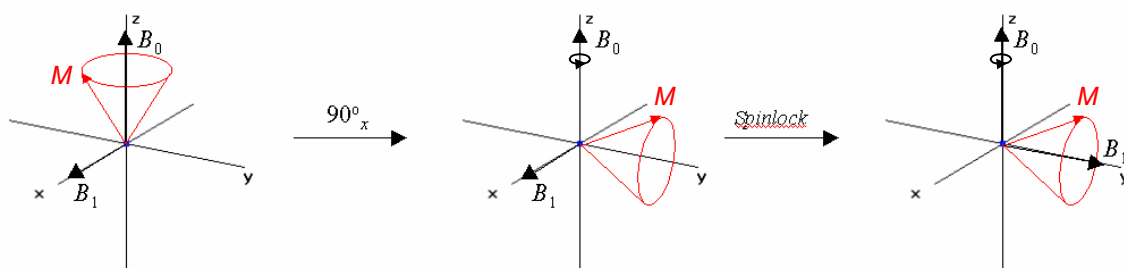


Figura 1.9 – Chaveamento de campo – *spinlock* (adaptado de Günther, 1998).

Nesse instante tem-se que a magnetização precessa em torno de  $B_1$ , como anteriormente precessava em torno de  $B_0$ . Pode-se entender  $B_1$  como uma série de pulsos de  $180^\circ_y$ , igualmente espaçados por períodos de tempo infinitesimais, de forma que os efeitos de evolução por deslocamento químico são refocalizados (Levitt, 2006). Isso indica que não haverá evolução em  $\delta$  (deslocamento químico) durante todo o tempo de mistura, de forma que se diz que os *spins* estão chaveados (*spinlock*) ao longo do eixo  $y$  durante o tempo de mistura. Dessa forma, tem-se que os núcleos apresentam um mesmo deslocamento químico durante o *spinlock* no referencial rotatório, todavia, tem-se que as magnetizações continuam a evoluir em  $J$  quando existe acoplamento escalar entre os núcleos (Farrar, 1990a; Farrar, 1990b; Harris, 1987).

Quando núcleos de  $^1\text{H}$  apresentam deslocamentos químicos muito próximos (ou idênticos) e estão acoplados entre si, tem-se sistemas do tipo AB (ou  $A_2$ ) (Homans, 1995; Gil & Geraldes, 2002; Harris, 1987). Nesses casos, diz-se que os núcleos estão fortemente acoplados e esses perdem suas independências (sistemas fora da primeira ordem) ou se tornam indistinguíveis. Quando isso ocorre, não se podem considerar as interações de um núcleo B acoplado a um terceiro núcleo C, completamente independentes do núcleo A. Essa condição imposta durante o *spinlock* está associada ao mecanismo pelo qual as coerências podem ser compartilhadas pelos núcleos presentes no sistema de *spins*. Dessa forma, enquanto houverem carbonos hidrogenados consecutivos em uma molécula (e  $^3J \neq 0$ ), ter-se-ão correlações no TOCSY, que indicam esse

compartilhamento de coerência (desde que se tenha um tempo de chaveamento de *spin* compatível).

Uma das seqüências de pulsos mais utilizada para promover o *spinlock* no TOCSY é o MLEV-17 (Bax & Davis, 1985). A técnica MLEV-17 é derivada da MLEV-16, consistindo essa última de uma série de dezesseis pulsos compostos, ditados segundo a série ABBA BBAA BAAB AABB, sendo A e B pulsos compostos de  $180^\circ$  ( $A = 90^\circ_{-y} - 180^\circ_x - 90^\circ_{-y}$  e  $B = 90^\circ_y - 180^\circ_{-x} - 90^\circ_y$ ). A seqüência de MLEV-17 repete a seqüência de MLEV-16 seguida pela aplicação de um pulso de  $180^\circ_x$ , que é muito eficiente na remoção de imperfeições de pulsos que ocorrem durante o ciclo de MLEV-16. Esse pulso extra de  $180^\circ_x$  inverte a fase dos erros acumulados, de tal maneira que, a cada par de ciclos MLEV-17, esses erros sejam compensados.

Conforme comentado na seção 1.5.2 (p. 29), tem-se a necessidade de suprimir o sinal do solvente e a técnica escolhida para tal foi a pré-saturação, que é efetuada durante o intervalo de tempo para relaxação (*d1*).

A seqüência de pulsos TOCSY usada neste trabalho (*mlevphpr* – programa de pulsos da Bruker) é muito similar à seqüência utilizada no trabalho original em que se propôs o MLEV-17 (Figura 1.10) (Bax & Davis, 1985).

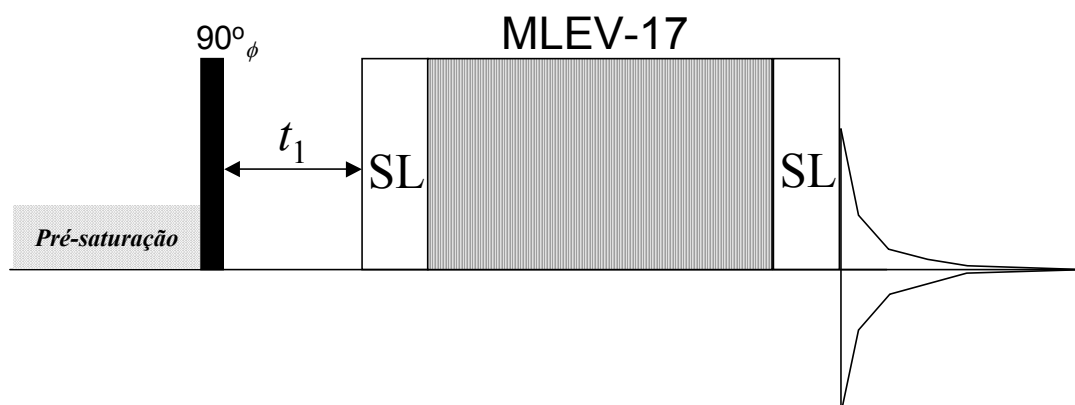


Figura 1.10 – Seqüência de pulsos de TOCSY com pré-saturação (adaptado de Bax & Davis, 1985).

Outra particularidade dessas seqüências, é o emprego de dois pulsos de poda (*trim pulses* – SL) durante o tempo de mistura: um imediatamente antes do

ciclo MLEV-17 e o outro logo após. Esses pulsos de poda têm como papel principal defasar qualquer componente de magnetização de água que tenha relaxado durante a evolução, uma vez que a pré-saturação foi aplicada somente durante  $d1$  (Bax & Davis, 1985).

#### **1.5.4 – Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (NOESY)**

NOESY, ou seja, Espectroscopia de Efeito Nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) é um experimento associado, conforme sugere o próprio nome, ao efeito  $nOe$  (Carver & Slichter, 1956; Carver & Slichter, 1953; Overhauser, 1953), relacionando-se portanto, ao processo de relaxação cruzada, fornecendo assim informações sobre a vizinhança espacial entre núcleos, independentemente do número de ligações que os separe. Esse efeito não está associado ao acoplamento escalar, conforme o COSY, mas sim ao mecanismo dipolar de relaxação. Dessa forma, um mapa de contornos NOESY pode ser muito útil na elucidação estrutural de substâncias, bem como pode fornecer idéias sobre as conformações adotadas por grupos nas moléculas (Silverstein, *et al.*, 2006; Resende, 2004; Resende, 2003). Em certas classes de moléculas, como peptídeos e ácidos nucleicos, é muito comum se tomarem relações de proporcionalidade entre a intensidade de uma correlação de  $nOe$  e a distância entre núcleos de hidrogênio, extraíndo-se daí relações semi-quantitativas de distâncias internucleares em moléculas. Esse tipo de correlação já levou à elucidação de inúmeras estruturas de proteínas e tal fato faz do NOESY, juntamente com o TOCSY, um dos principais experimentos para a RMN em solução de peptídeos (Lula *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2004; Wüthrich *et al.*, 1986).

De forma análoga à seqüência de pulsos de TOCSY discutido na seção 1.5.3 (p. 31), escolheu-se para este trabalho uma seqüência de pulsos de NOESY em que se aplica pré-saturação na freqüência de ressonância do solvente. O programa de pulsos utilizado é o *noesyprst*, sendo sua seqüência apresentada a seguir na Figura 1.11.

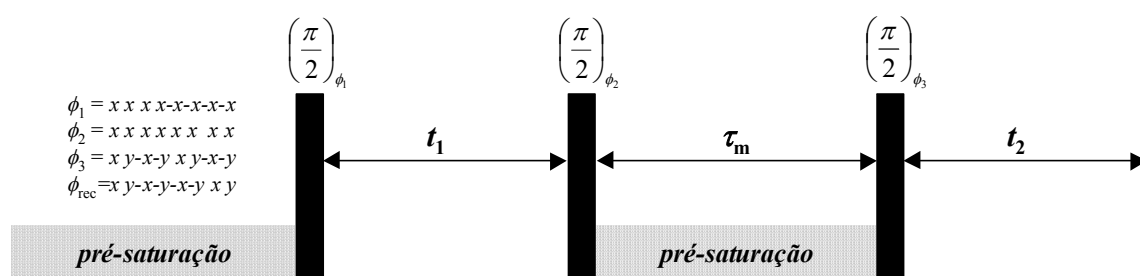


Figura 1.11 – Seqüência de pulsos NOESY com pré-saturação.

A fim de se removerem artefatos de COSY e picos axiais, é necessário se introduzirem oito etapas de ciclagem de fase para os pulsos ( $\phi_1$ ,  $\phi_2$ , e  $\phi_3$ ) e receptor ( $\phi_{rec}$ ).

A seqüência de pulsos de NOESY pode ser compreendida pelo formalismo vetorial clássico – Figura 1.12 (Claridge, 1999; Homans, 1995).

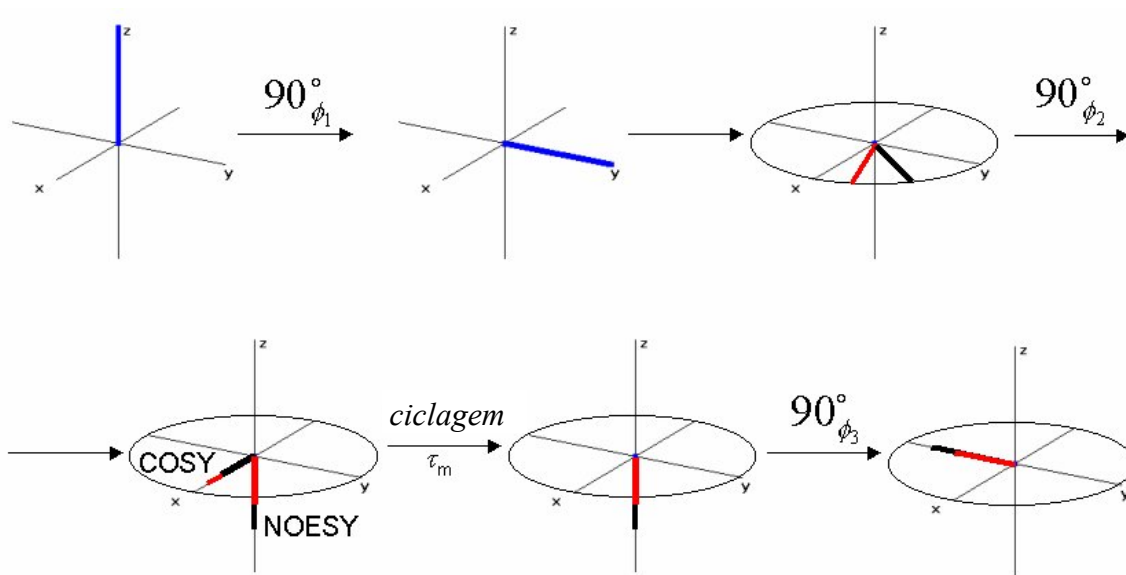


Figura 1.12 – Comportamento das magnetizações de dois núcleos nas seqüência de pulsos NOESY.

Considere-se para tal dois núcleos  $A$  e  $B$ , que não possuem acoplamento escalar. Tem-se, inicialmente, as componentes das magnetizações desses núcleos em azul ao longo do eixo  $z$ . Inicia-se então a seqüência com um pulso de  $90^\circ$ , que cria uma componente transversal de magnetização ao longo do eixo  $y$ . Segue-se um período de evolução  $t_1$ , no qual as magnetizações dos núcleos evoluem com



suas frequências de precessão e têm, portanto, suas respectivas frequências marcadas na dimensão  $F1$  (as componentes das magnetizações evoluem com frequências diferentes – ver componentes em preto e em vermelho). Após a evolução, aplica-se um segundo pulso de  $90^\circ$ , que faz com que parte das magnetizações sejam enviadas ao eixo  $z$ , enquanto que parte delas permanece no plano transversal. Quanto a essa fração de magnetização que permanece no plano transversal e que viria a gerar artefatos de COSY no mapa de contornos, ela é dissipada pelas diversas etapas de ciclagem de fase (Figura 1.11, p. 36). Voltando-se as atenções para as componentes longitudinais das magnetizações durante o tempo de mistura  $\tau_m$ , tem-se então o mecanismo que confere ao NOESY o seu nome. Durante esse tempo de mistura, ocorre o processo de relaxação longitudinal dos núcleos, de forma que as componentes  $z$  das magnetizações são trocadas devido a efeitos de relaxação cruzada, sendo a proximidade espacial entre os núcleos pré-requisito a tal processo de relaxação (Wink, 1989; Breitmeier *et al.*, 1975). Terminado o tempo de mistura, é aplicado um terceiro pulso de  $90^\circ$ , que promove a criação de uma componente transversal da magnetização que é detectada durante  $t_2$ . Note-se que as magnetizações que participaram do processo de relaxação cruzada são detectadas com a frequência de ressonância de um núcleo (por exemplo  $A$ ) durante  $t_1$  e com a frequência de ressonância do outro núcleo (por exemplo  $B$ ) durante  $t_2$ , de tal forma a serem gerados os picos cruzados no mapa de contornos. As magnetizações que não são trocadas durante o tempo de mistura, dão origem aos picos diagonais (Kessler *et al.*, 1988).

Deve-se ressaltar que o processo envolvido por trás do NOESY, se trata de um processo incoerente, ou seja, não está associado à transferência de coerência, como no caso de experimentos como o HSQC e o COSY, mas está sim associado à transferência de magnetização entre os núcleos durante o tempo de mistura (Claridge, 1999; Kessler *et al.*, 1988).

As correlações provenientes de  $nOe$  positivo, irão gerar sinais com fase oposta à da diagonal no mapa de contornos. É estabelecido, no processamento de mapas de contornos NOESY, o ajuste de fase de modo que os picos diagonais

apresentem fase negativa, enquanto que as correlações cruzadas provenientes de  $nOe$  positivo apresentam fase positiva. Em casos onde o  $nOe$  é negativo (como para macromoléculas), os picos cruzados provenientes de  $nOe$  irão apresentar a mesma fase que a diagonal, e ambas as fases serão ajustadas em modo positivo (Claridge, 1999; Homans, 1995). Existem situações dependentes do tamanho da molécula e de sua dinâmica, nas quais o  $nOe$  tende a zero. Nesses casos é recomendado o uso da técnica ROESY (*Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*), que fornece informações análogas às do NOESY, entretanto, por se tratar de um outro mecanismo (dependente do tempo de relaxação spin-rede no referencial rotatório), pode ser a solução para tal classe de moléculas (Claridge, 1999; Homans, 1995).

### 1.5.5 – Pulsos de gradiente de campo na RMN

Um dos grandes desafios na construção de espectrômetros de RMN é a necessidade de se obterem campos magnéticos os mais homogêneos possíveis, a fim de se adquirirem espectros mais resolvidos, uma vez que a não homogeneidade do campo leva a um alargamento extra de sinais, uma vez que núcleos que estejam em posições diferentes em um tubo de RMN, sentirão campos magnéticos de diferentes magnitudes (Norwood, 1994). Deve-se relatar que em algumas técnicas de RMN, como medições de  $T_2$ , são empregados artifícios para minimizar esses efeitos de não homogeneidade do campo magnético externo, sendo tais artifícios encontrados no *eco de spin* (Farrar, 1990a; Farrar, 1990b).

Dessa forma, sempre é um pouco estranho para os químicos imaginarem como poderiam pulsos de gradiente de campo (PGC) auxiliar na aquisição de experimentos de RMN. Esse paradoxo é discutido abaixo, onde é apresentado um resumo da atuação dos PGC na RMN.

Na arquitetura de seqüências de pulso de RMN, a ciclagem de fase (alternâncias de fases de pulsos e do receptor de sinal), muitas das vezes, é necessária à eliminação de artefatos em experimentos, sejam esses provenientes de efeitos de imprecisões nos pulsos, ou subprodutos de coerências indesejadas.

Entretanto, essas ciclagens apresentam alguns problemas. O primeiro deles é a necessidade da aplicação de um número mínimo de transientes, para que o processo se complete. Um segundo problema está associado à necessidade da aplicação de novos pulsos, e, uma vez que esses apresentam algumas imperfeições, os resultados nem sempre são os esperados. Um outro detalhe, é que a ciclagem de fase é baseada na soma construtiva dos sinais desejados e no cancelamento dos artefatos, sendo portanto, esse método, baseado na espectroscopia de diferença. Uma vez que esses processos de subtração e adição apresentam imperfeições, podem ainda ser detectados resquícios dos artefatos nos mapas de contornos (Claridge, 1999; Zhu, 1995; Norwood, 1994).

Para resolver esses problemas associados às ciclagens de fase, surgem justamente os PGC, que apresentam a característica de selecionar apenas o sinal (ou coerência) desejado em cada transiente. Para entender tal seleção, é necessário que se compreenda inicialmente como um PGC atua em uma componente transversal da magnetização.

Imagine-se uma seqüência que comece com um pulso de  $90^\circ_x$  (Figura 1.13, p. 40) o qual é capaz de criar um componente de magnetização transversal com completa coerência de fase ao longo do eixo  $y$  (considere-se um núcleo de  $^1\text{H}$  que não esteja acoplado e que apresente frequência de precessão igual à do referencial rotatório e desconsidere-se efeitos de relaxação transversal). Segue-se então, após um tempo  $t$  qualquer, um pulso de gradiente de campo (PGC) com uma certa amplitude ( $G$ ) e tempo de duração ao longo do eixo  $z$ . Tal pulso faz com que os núcleos que se apresentem em coordenadas verticais diferentes em um tubo de RMN sintam campos magnéticos ligeiramente diferentes, de forma que esses irão precessar com frequências diferentes e será provocada a perda aparente da coerência de fase da magnetização transversal. A aquisição de um espectro de RMN nesse momento levaria à ausência absoluta do sinal de ressonância, pois a coerência de simples quantum criada anteriormente, fora aparentemente defasada pelo PGC.

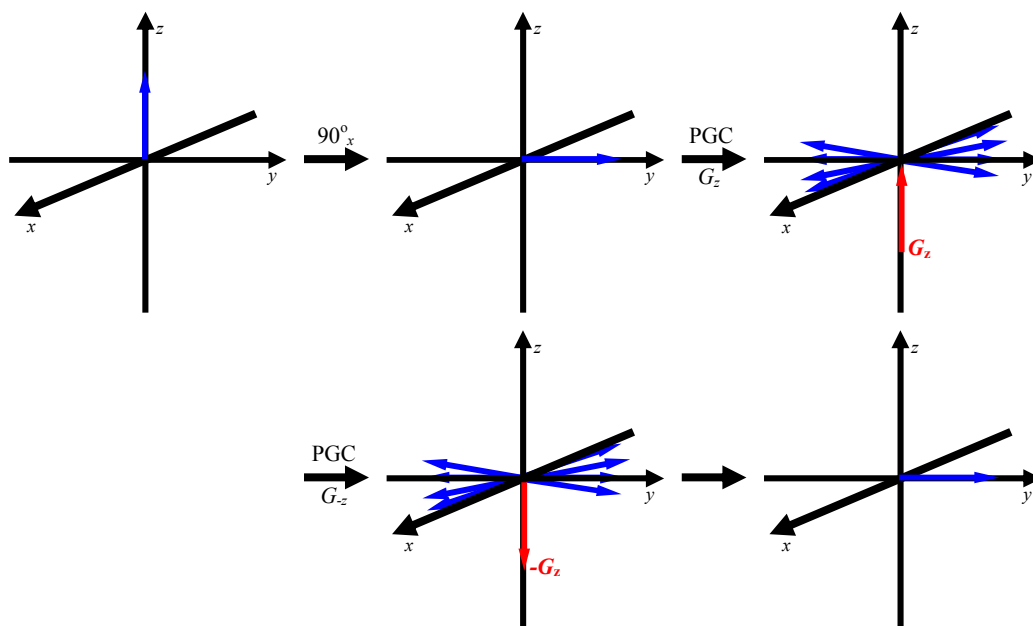


Figura 1.13 – Ação de PGC na desfocalização e refocalização seletiva de uma componente de magnetização.

Considere-se então a aplicação de um segundo pulso de gradiente (Figura 1.13), com a mesma amplitude e tempo, porém com polaridade oposta ( $-G$ ). Após realizado tal processo, a aquisição de um FID e sua transformação levariam a um espectro que apresentaria o sinal exato da ressonância do núcleo em questão. Isso indica que o pulso reverso é capaz de refocalizar a magnetização novamente ao longo do eixo  $y$ , ou seja, tal pulso reverso é capaz de recuperar a coerência de simples quantum, originalmente gerada pelo pulso de  $90^\circ$ . Dessa forma, percebe-se como os PGC são capazes de desfocalizar e refocalizar as coerências em RMN. Resta-se agora discutir como esses pulsos podem refocalizar seletivamente apenas a coerência desejada.

Considerando o referencial rotatório, pode-se imaginar  $\nu_L = 0$ , de tal maneira que a magnetização se manteria estática ao longo do eixo  $y$ . Entretanto, após a aplicação de um PGC ao longo do eixo  $z$ , tem-se uma alteração na frequência de Larmor, devida à atuação de uma componente  $B_z$ , a qual seria dependente da posição do núcleo ao longo do eixo  $z$ . Tal componente faria com que o vetor magnetização específico girasse por um ângulo dependente do tempo de duração  $\tau_g$  do pulso de gradiente. Sabe-se, entretanto, que essa fase é também dependente da ordem da coerência  $p$  ( $p$  igual a zero significa coerência de zero

quantum,  $p$  igual a um coerência de simples quantum e assim por diante) e da razão giromagnética  $\gamma$  do núcleo em questão. Essa relação é apresentada a seguir na eq. 1.1 (Claridge, 1999; Zhu, 1995; Norwood, 1994).

$$\Phi_z = p\gamma B_z \tau_g \quad \text{eq. 1.1}$$

Baseando-se nessa equação, percebe-se que diferentes tipos de coerência apresentam diferentes sensibilidades aos PGC. Por exemplo, percebe-se que coerências de zero quantum são insensíveis aos PGC, enquanto que as coerências de simples e duplo quanta são sensíveis, sendo inclusive esta última duas vezes mais sensível que a primeira. Baseando-se justamente nessa diferença de sensibilidade, os PGC são aplicados de forma a refocalizarem seletivamente as ordens de coerência desejadas (Claridge, 1999; Zhu, 1995; Norwood, 1994).

Considere por exemplo, o caso da Figura 1.14 apresentada a seguir.

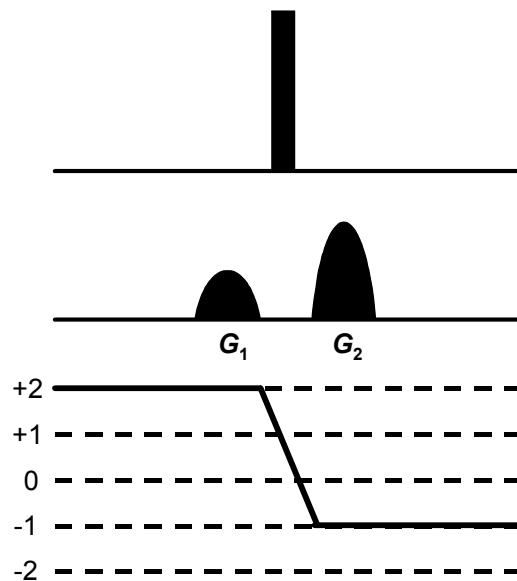


Figura 1.14 – Atuação dos PGC na refocalização seletiva de uma ordem de coerência (adaptada de Claridge *et al.*, 1999).

Uma coerência de duplo quanta experimenta um PGC  $G_1$ , com amplitude  $B_{g1}$  e com tempo de duração  $\tau_1$ , que confere a essa coerência uma dependência de fase igual a  $\Phi_1 = 2\gamma B_{g1} \tau_1$ . Após esse PGC, um pulso de RF transforma essa coerência dependente da fase em uma coerência de simples quantum ( $p = -1$ ) que

experimenta então um segundo PGC  $G_2$ , com amplitude  $B_{g2}$  e com tempo de duração  $\tau_2$ , que confere a essa coerência uma dependência de fase igual a  $\Phi_2 = -\gamma B_{g2} \tau_2$  (Claridge *et al.*, 1999).

Para que essa coerência tenha eliminada a sua dependência espacial da fase, é necessário que  $\Phi_1 + \Phi_2 = 0$ . Para que se satisfaça tal condição, basta se empregar o mesmo tempo de duração para ambos os PGC ( $\tau_1 = \tau_2$ ) e fazer com que a amplitude de  $G_2$  seja o dobro da de  $G_1$  ( $B_{g2} = 2 B_{g1}$ ). Deve-se ressaltar que quaisquer outros tipos coerências de simples quantum, provenientes de outras coerências após o pulso de RF, que não fosse da ordem de  $p = -2$ , não teriam eliminadas suas dependências espaciais da fase, de forma que o tal “artefato em potencial”, não seria detectado no experimento de RMN (Claridge, 1999; Zhu, 1995; Norwood, 1994).

### **1.5.6 – Uma introdução sobre detecção inversa**

Conforme comentado na seção 1.5.3 (p. 31), as técnicas de RMN 2D COSY e TOCSY fornecem correlações baseadas em acoplamentos homonucleares, de forma a apresentarem grande utilidade na determinação de conectividades em uma molécula. Muito interessante aos químicos, seriam também técnicas, que viessem a fornecer informações sobre acoplamentos heteronucleares, de forma a poder se atribuírem as conectividades diretas entre hidrogênios e carbonos, bem como a proximidade desses pela ordem de um certo número de ligações. Surgiram então duas técnicas 2D para tais finalidades, sendo elas o HETCOR e o COLOC. Essas técnicas podem fornecer respectivamente, baseando-se no acoplamento heteronuclear, as conexões diretas entre carbonos e hidrogênios e a informação sobre carbonos que se apresentam distanciados de hidrogênios por algumas ligações (duas ou três, por exemplo) (Kessler, 1988; Breitmeier & Voelter, 1986; Fribolin, 1998).

Tais técnicas se apresentaram promissoras, entretanto alguns problemas inerentes a elas podiam ser notados. O primeiro problema era associado à detecção do FID no canal do núcleo menos sensível. Considerando-se os casos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , significaria a detecção no canal de  $^{13}\text{C}$ . Essa questão da sensibilidade é

um fator crucial, pois se sabe que a aquisição de dados em experimentos bidimensionais se baseia na obtenção de vários espectros unidimensionais (seção 1.5.1. p. 26). Assim, aliando-se esses dois fatores, seriam consumidos enormes tempos de máquina na aquisição desses experimentos. Maiores problemas surgiriam para casos onde fossem disponíveis pequenas quantidades de amostra ou para amostras pouco solúveis, o que é bem comum na RMN de macromoléculas.

Uma solução para tais problemas de detecção de núcleos pouco sensíveis na RMN 1D foi encontrada em técnicas como o INEPT e DEPT, nas quais ocorrem transferência de polarização do núcleo sensível para o insensível. Isso acarreta em um aumento significativo nas intensidades dos sinais dos núcleos insensíveis, os quais são posteriormente detectados em seu respectivo canal (Bendall & Pegg, 1983; Doddrell, *et al.*, 1982; Morris & Freeman, 1979).

Posteriormente foi apresentada uma solução ainda mais eficiente, a qual é empregada em diversas técnicas de RMN 2D. Essa solução se trata da detecção inversa de núcleos pouco sensíveis, sendo possível um processo de detecção de sinais bem mais eficaz. A regra geral para tais técnicas é se iniciar as seqüências com pulsos de excitação nos canais dos núcleos sensíveis, de tal maneira a se ter a subsequente transferência de polarização para os núcleos insensíveis (situação análoga aos casos do INEPT e DEPT). Em seguida, tem-se a parte mais engenhosa desse tipo de técnica, que é o emprego de uma combinação de pulsos que faz com que a magnetização retorne para os núcleos sensíveis e seja então detectada no canal desses núcleos. Esse último processo leva a uma intensificação extra dos sinais (Tolman & Prestegard, 1995; Muller, 1979).

Dáí surge uma pronta diferença entre as técnicas 2D baseadas em acoplamentos heteronucleares. Nas técnicas de detecção direta, as frequências dos núcleos sensíveis são marcadas durante o período de evolução  $t_1$ , enquanto que as frequências de ressonância dos núcleos insensíveis são marcadas durante o período de detecção  $t_2$ . Isso levaria, por exemplo, a um mapa de contornos HETCOR (técnica de detecção direta do núcleo pouco sensível) com valores de  $\delta$  de  $^1\text{H}$  na dimensão  $F1$  e de  $^{13}\text{C}$  na dimensão  $F2$  (seção 1.5.1). Como essa

marcação é oposta para a detecção inversa de núcleos pouco sensíveis, as dimensões são também invertidas. Entretanto essa diferença não altera em nada as informações fornecidas por ambos tipos de técnicas, de forma que as técnicas de detecção inversa tomaram o lugar das de detecção direta, sendo amplamente utilizadas, devido à sua maior sensibilidade.

Duas técnicas de detecção inversa muito empregadas, que indicam o acoplamento heteronuclear entre núcleos diretamente ligados (portanto análogas ao HETCOR) são o HMQC e o HSQC. Neste trabalho fez-se uso dessa última técnica, a qual é descrita na próxima seção.

Deve-se ainda ressaltar uma importante diferença entre sondas apropriadas para detecção direta e inversa. As sondas de detecção direta são normalmente projetadas de maneira que a bobina associada à detecção dos núcleos insensíveis fique mais próxima à amostra, de forma a compensar a questão da menor sensibilidade. Em contrapartida, as sondas de detecção inversa são projetadas de modo que a bobina para a detecção do núcleo sensível fique mais próxima à amostra, uma vez que ela detecta sinais desse tipo de núcleo.

Assim, experimentos que envolvem detecção direta de núcleos insensíveis, como espectros de  $^{13}\text{C}$  e subespectros de DEPT, apresentam melhores resultados quando conduzidos em sonda para detecção direta. Por outro lado, experimentos como HMQC e HSQC apresentam melhores resultados quando conduzidos em sondas próprias para detecção inversa. Como neste trabalho, na parte associada à RMN em solução, foram realizados apenas experimentos homonucleares de  $^1\text{H}$  e experimentos de detecção inversa para núcleos pouco sensíveis de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ , utilizou-se uma sonda de tripla ressonância de 5 mm ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) de detecção inversa em todas as aquisições.<sup>Δ</sup>

---

<sup>Δ</sup> Vale ressaltar que um experimento de detecção inversa pode ser efetuado em sondas diretas. Apesar da detecção ocorrer na bobina mais distante, ele apresenta maior sensibilidade que os experimentos análogos de detecção direta (exemplo HMQC mais sensível que HETCOR).



### 1.5.7 – Coerência Heteronuclear de Simples quantum (HSQC)

Discute-se nesta seção, a técnica de detecção inversa HSQC, ou Coerência Heteronuclear de Simples quantum (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). Os núcleos a serem detectados são correlacionados via acoplamento escalar da uma ordem de uma ligação, ou seja, o hidrogênio diretamente ligado a um  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ . Essa técnica se torna muito útil na atribuição de ressonâncias de núcleos de  $^1\text{H}$  em peptídeos, devido à pequena região de  $\delta$  de  $^1\text{H}$  e às freqüentes, ou melhor, quase inevitáveis, sobreposições de sinais. Tais experimentos podem ser considerados como técnicas chaves em atribuições de alguns tipos de ressonâncias particulares (deslocamentos químicos e fases de sinais particulares de alguns núcleos de  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  de alguns resíduos de aminoácidos) e podem ser utilizadas como pontos de partida em assinalamentos de sinais de hidrogênios (tanto ligados a carbonos quanto nitrogênios), os quais terão suas respectivas cadeias intra-resíduo assinaladas no mapa de contornos TOCSY e finalmente, traçar-se-ão as subseqüentes conexões inter-resíduos pelo NOESY (ver seção 3.3.1, p. 83).

A Figura 1.15 (p. 46), apresentada a seguir, retrata uma seqüência de HSQC que emprega PGC. Ao se analisar a seqüência de pulsos do HSQC, percebe-se o motivo do seu nome, uma vez que estão envolvidas apenas coerências de simples quantum de  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  durante a evolução. Com relação a isso, percebe-se ainda a principal vantagem do HSQC sobre o HMQC. Durante a evolução no HSQC, a coerência de  $^1\text{H}$  é de zero quantum, não ocorrendo assim evolução em  $J_{\text{H-H}}$  durante esse período. No HMQC, a coerência de  $^1\text{H}$  é de simples quantum durante  $t_1$ , ocorrendo então a evolução em  $J_{\text{H-H}}$ , tendo-se um alargamento das correlações em  $F1$  em tal experimento (Becker, 2000; Claridge, 1999; Tolman & Prestegard, 1995).

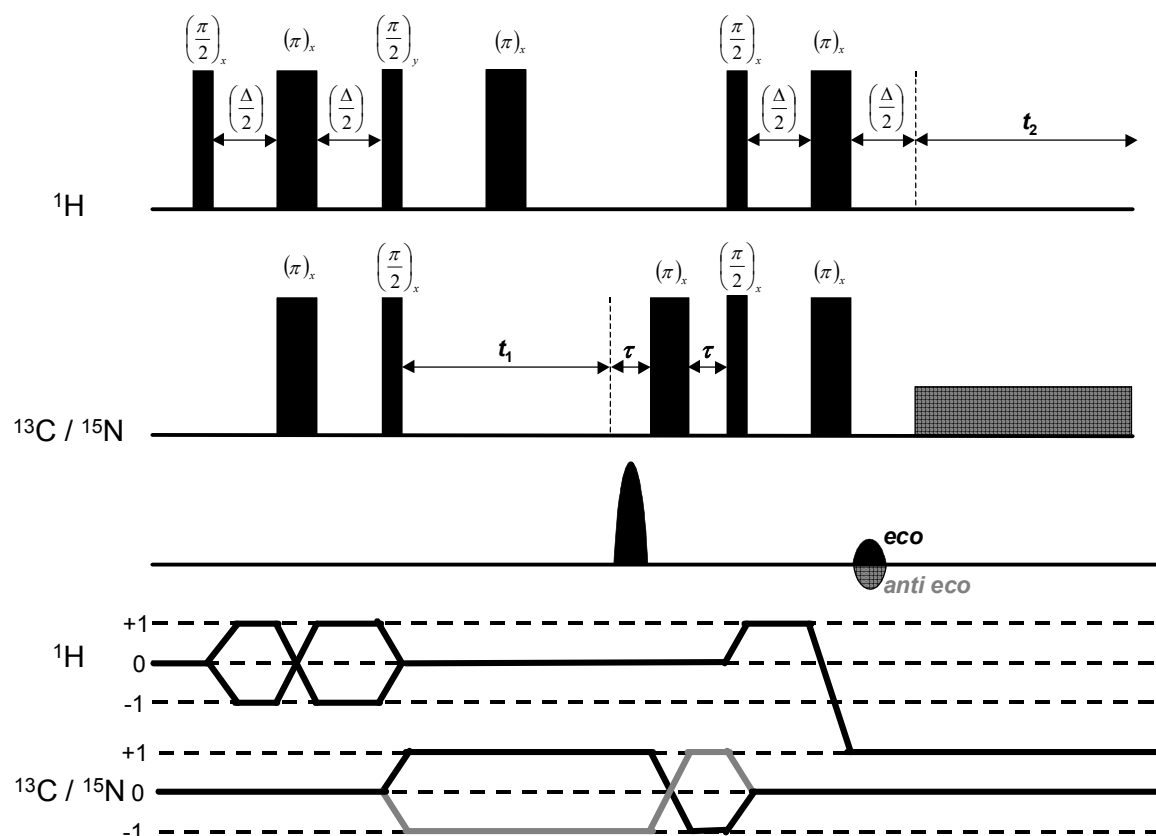


Figura 1.15 – Seqüência de pulsos HSQC com PGC para seleção (adaptada de Claridge, 1999).

Observando-se essa seqüência, nota-se que ela se inicia com uma seqüência de INEPT, de forma que os três primeiros pulsos no canal do  $^1\text{H}$  e os dois primeiros no canal do  $^{13}\text{C}$  são responsáveis pela transferência de população do núcleo mais sensível para o menos sensível. Após essa seqüência INEPT, tem-se a evolução da coerência de simples quantum de  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  durante  $t_1$ , sendo ainda aplicado, na metade desse período, um pulso de  $180^\circ$  no canal de  $^1\text{H}$ , de forma a eliminar o efeito do acoplamento  $^1\text{H}-^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  durante a evolução. Tem-se, por fim, uma seqüência de INEPT reversa, de tal maneira que ocorre a transferência da polarização para o  $^1\text{H}$ , o qual finalmente é detectado durante  $t_2$ , com o simultâneo desacoplamento no canal de  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (Becker, 2000; Claridge, 1999; Tolman & Prestegard, 1995; Kessler *et al.*, 1988).

Os PGC apresentados na seqüência da Figura 1.15, são de extrema importância para o experimento. Isso porque a seleção de coerência é crucial no HSQC, pois devem ser eliminadas as coerências associadas a núcleos de  $^1\text{H}$

ligados a  $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ , lembrando-se que isso significa eliminar cerca de 98,89% / 99,63% da magnetização de  $^1\text{H}$ . Na seqüência mostrada, os PGC apresentam a mesma duração, tendo, todavia, para  $^{13}\text{C}$  as proporções de 4:1 e 4:-1 (10:1 e 10:-1 para  $^{15}\text{N}$ ) para as seleções de *eco* e *anti eco*, respectivamente, devido à proporção entre as razões giromagnéticas desses núcleos.

Deve-se ressaltar que as seqüências de pulsos utilizadas na aquisição dos mapas de contornos HSQC, tanto para  $^{13}\text{C}$  quanto para  $^{15}\text{N}$ , são mais aprimoradas que a apresentada na Figura 1.15. Utilizaram-se os programas de pulsos *invietgp* para o experimento de  $^{15}\text{N}$  e o *inviedetgp* para o experimento de  $^{13}\text{C}$ . Nesses programas, emprega-se um pulso de poda no canal do  $^1\text{H}$  (*p3*) que remove as coerências indesejadas provenientes de imperfeições do pulso durante a primeira seqüência de INEPT (Berger & Braun, 2004). A seqüência de pulsos usada para  $^{13}\text{C}$  tem ainda, ajustada na seqüência de DEPT reverso, um intervalo de tempo (*delay*) de forma a se obter a edição do mapa de contornos (Wilker *et al.*, 1993). Escolheram-se valores que fornecessem CH e CH<sub>3</sub> com fase positiva e CH<sub>2</sub> com fase negativa, todavia uma diferente escolha poderia levar a outro tipo de edição, como, por exemplo, CH -, CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> +.

### 1.5.8 – Polarização Cruzada (CP)

A polarização cruzada, ou CP (*Cross Polarization*) é uma técnica muito utilizada na RMN em fase sólida para aumentar a sensibilidade na detecção de sinais de núcleos com baixa abundância isotópica natural, como o  $^{13}\text{C}$ , bem como para o aumento da sensibilidade na detecção de núcleos pouco sensíveis, como  $^{15}\text{N}$  ( $\gamma^1\text{H} \sim 10 \cdot \gamma^{15}\text{N}$ ) (Stejskal & Memory, 1994; Pines *et al.*, 1973). Obtém-se o aumento da sensibilidade por dois motivos. O primeiro deles está associado ao fato de que a diferença de populações de núcleos com diferentes estados de spin para a espécie pouco sensível é aumentada. Segundo, o intervalo de tempo entre os pulsos (intervalo de tempo para relaxação) é diminuído, por que esse intervalo entre pulsos será dependente do tempo de relaxação da espécie sensível,  $^1\text{H}$ , que é normalmente menor que o da espécie menos sensível ( $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ ).

A idéia por trás da polarização cruzada pode ser vista pelo modelo termodinâmico que envolve o conceito de “temperatura de spin” (Redfield, 1969; Redfield, 1955), de forma que o sistema de spins abundante é colocado em uma temperatura artificialmente baixa. Promove-se então o contato térmico entre os spins pouco abundantes com o sistema frio de spins abundantes. O calor flui do sistema de spins pouco abundantes para o sistema de spins abundantes e o resultado é uma diminuição enorme da temperatura de spin do sistema pouco abundante (segundo o modelo, a capacidade calorífica do sistema abundante é bem superior à do sistema pouco abundante). O fenômeno associado ao decaimento da temperatura de spin dos núcleos pouco abundantes equivale a um aumento na diferença de população de núcleos com estados de spin de menor e maior energia, o que leva, portanto, ao aumento da sensibilidade no experimento de RMN (Stejskal & Memory, 1994; Pines *et al.*, 1973).

O processo de troca de polarização entre os sistemas de spin abundante e pouco abundante é iniciado pela aplicação de um pulso rápido de  $90^\circ$  no canal do núcleo sensível, seguindo-se o processo de chaveamento de campo (Figuras 1.16 e 1.17) desse sistema de spins promovido por um pulso longo (irradiação contínua) no canal desse núcleo.

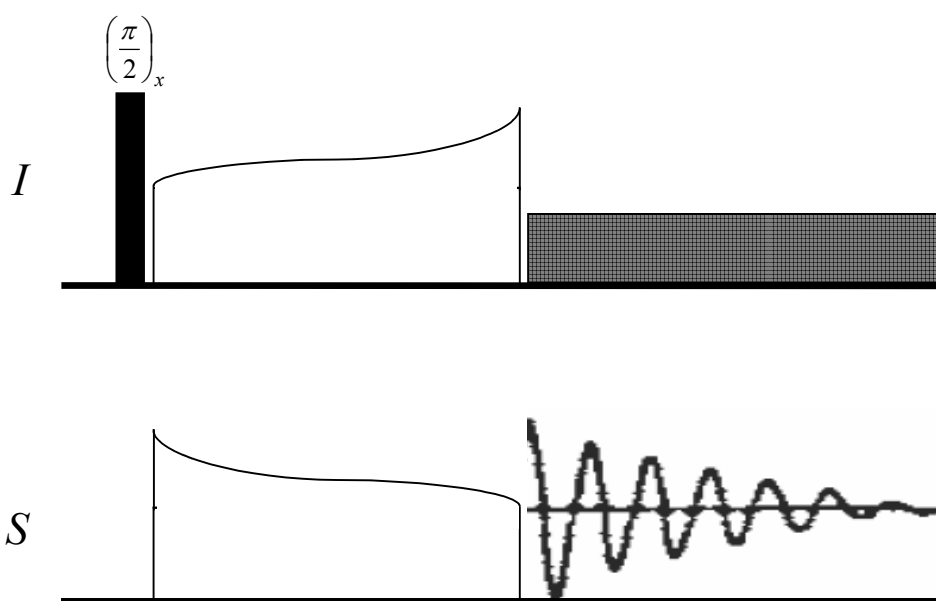


Figura 1.16 – Seqüência de pulsos de polarização cruzada com passagem adiabática pela condição de Hartmann-Hahn.

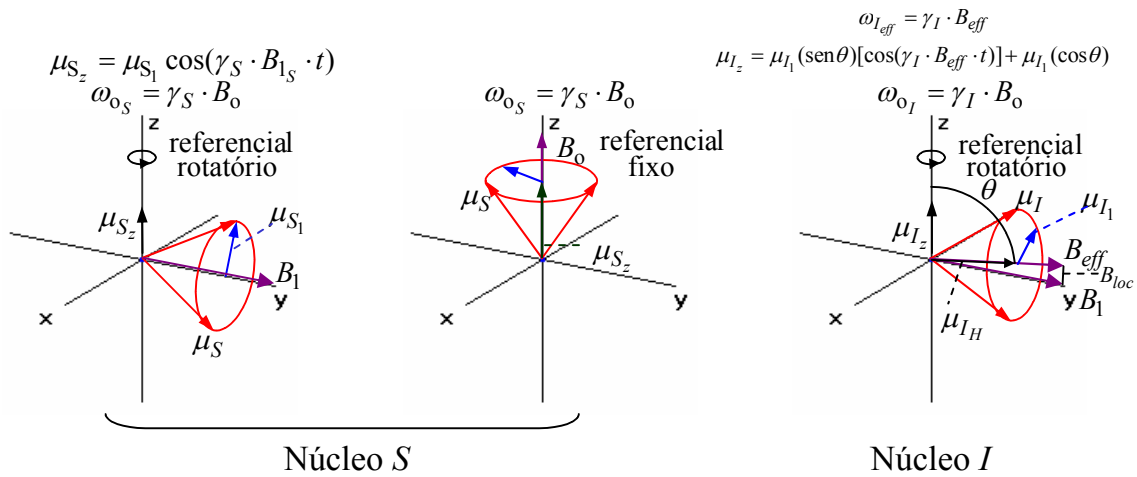


Figura 1.17 – Comunicação entre sistema de spins abundantes (*I*) e pouco abundantes (*S*). *S* é apresentado com e sem a irradiação de radiofrequência e *I* é irradiado na presença de um campo local pequeno (adaptado de Stejskal & Memory, 1994).

A magnetização do núcleo abundante (*I*) irá agora decair com uma constante de tempo  $T_{1\rho}$  (tempo de relaxação spin-rede no referencial rotatório). O que se terá é a precessão da magnetização chaveada em torno de um campo magnético efetivo ( $B_{eff}$ ) e uma temperatura da magnetização de spins  $T_s$  para o grupo de spins abundante *I*, que será bem pequena. Nesse caso do estado de chaveamento de campo no referencial rotatório, a proporção entre a população de núcleos com estado de spin de maior e menor energia é dado pela relação abaixo:

$$N_\beta / N_\alpha = \exp[-\eta\gamma_I B_{eff} / (kT_S)] \quad \text{eq. 1.4}$$

O valor de  $T_s$  é pequeno, uma vez que a magnetização é proporcional ao excesso de núcleos no estado de menor energia segundo o efeito do campo magnético externo  $B_o$  (eq. 1.5):

$$N_\beta / N_\alpha = \exp[-\eta\gamma_I B_o / (kT_L)] \quad \text{eq. 1.5}$$

onde  $T_L$  é a temperatura da rede.

Ao se compararem as duas equações acima, conclui-se que  $T_S \ll T_L$ , uma vez que esses parâmetros são correlacionados pela eq. 1.6 e  $B_{eff} \ll B_o$ .

$$T_S / T_L = B_{eff} / B_o \quad \text{eq. 1.6}$$

Tem-se então uma significativa magnetização do sistema de spins abundante chaveada no eixo  $y$ , que precessa com frequência  $\omega_I$  e que possui uma temperatura de spin muito menor que a da rede.

A outra parte do processo da polarização cruzada está associada à promoção do contato térmico entre os sistemas de spins abundante  $I$  e pouco abundante  $S$ . A interação principal, que promove essa comunicação entre esses sistemas de spins em fase sólida, é a interação magnética dipolar entre os núcleos. Para que o processo ocorra, aplica-se ao sistema de spins pouco abundante  $S$  uma radiação na sua própria frequência de ressonância  $\omega_0 = \gamma_S B_0$ . O pulso aplicado é contínuo, de forma que a magnetização de  $S$  precessa com velocidade  $\omega_{1S}$  em torno de  $B_{1S}$  no referencial rotatório ( $\omega_{1S} = \gamma_S B_{1S}$ ), tendo-se então, simultaneamente ao o chaveamento de campo de  $S$ , o chaveamento da magnetização de  $I$  no canal desse núcleo (Figura 1.17, p. 49).

A probabilidade de transição para a promoção de troca de energia entre os sistemas de spins é bem maior quando as frequências naturais desses sistemas são colocadas próximas umas das outras e então o contato térmico entre os dois sistemas é substancialmente aumentado. Esse ajuste de frequências ( $\omega_{1S} = \omega_{1I}$ ) é obtido pelo controle das amplitudes dos campos oscilatórios aplicados, que devem satisfazer a relação abaixo conhecida como condição de Hartmann-Hahn:

$$\gamma_S B_{1S} = \gamma_I B_{1I} \quad \text{eq. 1.7}$$

O mecanismo de contato térmico entre os dois sistemas de spin irá levar ao aquecimento (muito leve, devido a sua alta capacidade calorífica) do sistema de spins abundante e a um considerável resfriamento do sistema de spins pouco abundante, representado na eq. 1.8:

$$T_S^{CP} = T_I = (B_{1I} / B_0) T_L = (\gamma_S / \gamma_I) (B_{1S} / B_0) T_L \quad \text{eq. 1.8}$$

Uma vez que a temperatura de spin para núcleos  $S$ , que seria alcançada pelo chaveamento de campo direto dos spins  $S$ , seria  $T_S = (B_{1S} / B_0) T_L$ , tem-se uma diminuição de  $T_s$  por um fator igual a  $\gamma_S / \gamma_i$  que, no caso da interação de núcleos de  $^1\text{H}$  com núcleos de  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  equivale, respectivamente a 1/4 ou

1/10. Segundo a equação 1.5, esse resultado significa um aumento significativo na intensidade do FID detectado para o núcleo *S*.

A seqüência de pulsos de CP utilizada neste trabalho é bem similar à apresentada na Figura 1.16 (p. 48). Conforme comentado acima, o processo se inicia pela aplicação de um pulso de 90° no canal do (*I*). Segue-se a aplicação de dois pulsos formatados longos no processo de chaveamento de campo, nos canais de ambos os núcleos (*I* e *S*). Os pulsos utilizados durante o processo de chaveamento de campo possuem formas adiabáticas. A passagem adiabática pela condição de Hartmann-Hahn tem mostrado resultados experimentais que levam a maior eficiência na transferência de polarização do que a condição clássica de Hartmann-Hahn (Hediger *et al.*, 1995; Hediger *et al.*, 1994).

### 1.5.9 – Eco Quadrupolar

Na RMN em fase sólida, a interação quadrupolar existente em núcleos com momento angular de spin 1, como em núcleos de <sup>2</sup>H, leva à formação de dupletos com linhas em  $\omega_0 \pm \Omega$ , sendo tais sinais conhecidos como dupletos de Pake (Stejskal & Memory, 1994; Davis *et al.*, 1976; Pake, 1948). A constante de desdobramento quadrupolar é dependente da orientação do tensor do <sup>2</sup>H com relação ao campo magnético externo, de forma que espectros de sólidos anisotrópicos levam a formação de dupletos largos devido ao caráter anisotrópico do sistema (Stejskal & Memory, 1994; Davis *et al.*, 1976). Por outro lado, no caso de amostras orientadas, bem como em situações onde se tem meios parcialmente anisotrópicos, dupletos bem definidos podem ser obtidos e utilizados na determinação de orientações preferenciais dos sistemas em estudo (Seelig, 1977; Davis *et al.*, 1976).

A RMN de <sup>2</sup>H em padrão de pó, normalmente fornece espectros muito largos (100-200 kHz). Não obstante, em sistemas parcialmente isotrópicos, como em bicamadas lipídicas, sinais relativamente largos (80 kHz) podem ser obtidos o que sugere que grande parte da informação está contida na parte inicial do FID (Seelig, 1977; Davis *et al.*, 1976). Dessa forma, a aquisição de espectros após a aplicação de um pulso de 90° levaria a uma perda significativa de informação

dessas componentes largas, devido ao tempo morto existente no experimento entre a aplicação do pulso e a detecção do FID (Davis *et al.*, 1976). Uma solução encontrada para esse problema é a utilização da seqüência de eco quadrupolar (Figura 1.18) (Stejskal & Memory, 1994; Davis *et al.*, 1976).

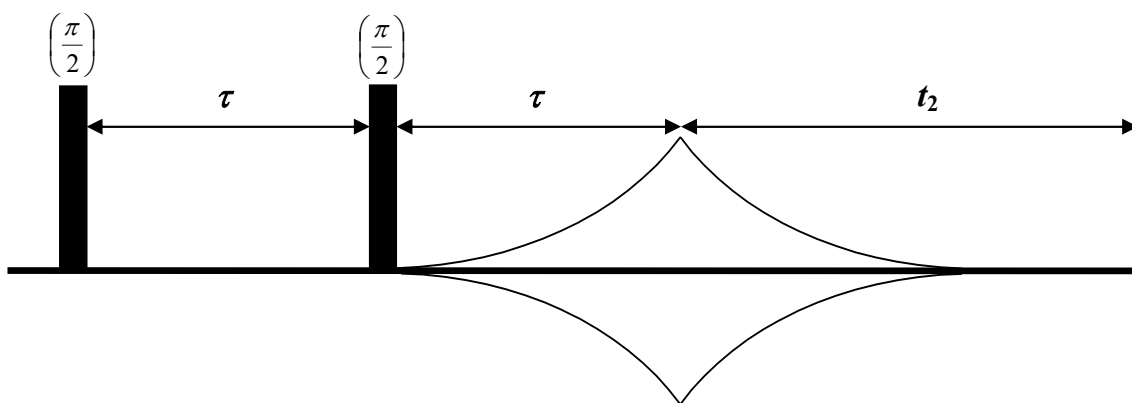


Figura 1.18 – Seqüência de eco quadrupolar de spin.

Essa seqüência de pulsos consiste na aplicação de um segundo pulso de  $90^\circ$  após um intervalo de tempo  $\tau$ , sendo que, após um segundo intervalo de tempo  $\tau$ , tem-se um eco de spin quadrupolar, devido à refocalização da magnetização nuclear (Stejskal & Memory, 1994; Davis *et al.*, 1976).

Uma vez que a magnetização é refocalizada, pode-se escolher um valor apropriado de  $\tau$  e de tempo morto, de maneira a se começar a coleta do sinal antes do ponto de máximo do eco. Com a escolha apropriada do intervalo entre os pontos no FID (*dwell time*), é possível iniciar a transformada de Fourier a partir do ponto de máximo do eco pelo deslocamento do FID antes da aplicação da transformada. Um ajuste cuidadoso da ciclagem de fase e o processamento do espectro a partir do ponto de máximo do eco levam a um espectro, no qual não é necessária a correção da fase (Davis *et al.*, 1976). No caso de uma aquisição direta de um espectro de RMN de  $^2\text{H}$  após a aplicação de um pulso de  $90^\circ$ , é comum se observar uma distorção aparente do espectro obtido, devido à informação perdida durante o tempo morto e à necessidade de ajustes de fase



extra, que acabam levando a resultados incorretos. Portanto, esse tipo de seqüência de eco quadrupolar tem sido muito usada em estudos de RMN de bicamadas lipídicas (Mason *et al.*, 2007; Fu & Cross, 1999; Davis *et al.*, 1976) e de peptídeos inseridos em bicamadas lipídicas (Aisenbrey *et al.*, 2007).

## 2 – METODOLOGIA

### 2.1 – Síntese de peptídeos

Planejaram-se as sínteses para um rendimento máximo que fornecesse até 300 mg dos peptídeos. As quantidades de reagentes foram então estipuladas para 0,149 mmol para o PS-1, 0,142 mmol para o PS-2 e 0,154 mmol para o PS-3.

O suporte escolhido para as sínteses foi a resina amídica RAM da Tentagel, com um grau de substituição de 0,27 mmol/g. Essa resina é originalmente protegida com grupo Fmoc (Esquema 1.1, p. 12).

Todos os Fmoc-aminoácidos utilizados (com cadeias laterais protegidas ou não) foram adquiridos da Novabiochem. Segue abaixo a Tabela 2.1 que lista os aminoácidos utilizados nas sínteses e suas respectivas massas molares.

**Tabela 2.1 – Aminoácidos utilizados nas sínteses das PS-1, PS-2 e PS-3**

<b>Aminoácido</b>	<b>Aminoácido Modificado</b>	<b>MM do Modificado / (g/mol)</b>
Alanina	Fmoc-Ala-OH	311,3
Asparagina	Fmoc-Asn(Trt)	596,7
Fenilalanina	Fmoc-Phe-OH	387,4
Glicina	Fmoc-Gly-OH	297,3
Histidina	Fmoc-His(Trt)-OH	619,7
Isoleucina	Fmoc-Ile-OH	353,4
Leucina	Fmoc-Leu-OH	353,4
Lisina	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6
Prolina	Fmoc-Pro-OH	337,4
Serina	Fmoc-Ser( <i>t</i> Bu)-OH	383,4
Treonina	Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH	397,5
Valina	Fmoc-Val-OH	339,4

### **2.1.1 – Preparação da resina para acoplamento do primeiro aminoácido**

Pesaram-se inicialmente as respectivas quantidades de resina (551 mg, 526 mg e 572 mg, para PS-1, PS-2 e PS-3), as quais foram transferidas para os respectivos frascos de síntese. A seguir, adicionaram-se ao frasco (processo de dilatação da resina) aproximadamente 7 mL de DCM (diclorometano), agitando-se manualmente o sistema para remover bolhas e deixando-o então em repouso por 20 min. Na seqüência, o DCM era removido com auxílio de bomba de vácuo. A seguir foi feita a lavagem da resina por uma série alternada de três vezes 5 mL de DMF (dimetilformamida) e 5mL de API (álcool isopropílico) e, posteriormente, duas lavagens com 5 mL DCM (em todos os processos de lavagem o solvente foi retirado por sistema de vácuo) (Chan & White, 2000).

Efetuiu-se então a etapa de desproteção da resina (retirada do grupo Fmoc – seção 1.2.1, p. 13) por adição de solução de piperidina a 20% (v/v) em DMF e agitação mecânica do frasco (uma agitação de 2 min, e duas de 10 min). Posteriormente, lavou-se por três vezes a resina com uma série alternada de DMF e AIP (aproximadamente 5 mL de cada), a qual foi finalmente lavada duas vezes com DCM (aproximadamente 5 mL). Uma alíquota da resina era então retirada para se realizar o teste de Kaiser (seções 1.2.4 e 2.1.5, p. 16 e 58, respectivamente) para se confirmar a desproteção da resina. Caso o resultado do teste fosse negativo, repetiam-se as lavagens com solução de piperidina, seguidas de lavagens com DMF/AIP e DCM, até que o resultado do teste fosse positivo. Após confirmação da desproteção, a resina estava pronta para o acoplamento do primeiro aminoácido protegido (Chan & White, 2000).

### **2.1.2 – Acoplamento do primeiro aminoácido à resina**

Pesou-se em frasco separado, um excesso estequiométrico de quatro vezes (*i.e.* 5 equivalentes) de Fmoc-aminoácido e HOBT (1-hodróxi-benzotriazol). Adicionou-se então aproximadamente 5 mL de DMF. Seguiu-se a adição de DIC (1,3-di-isopropilcarbodiimida) em excesso estequiométrico de duas vezes (*i.e.* 3 equivalentes). Agitou-se a mistura por aproximadamente um minuto com auxílio

de um vórtex e deixou-se o sistema em repouso para ativação por aproximadamente dez minutos. Adicionou-se DMAP em quantidade catalítica (aproximadamente 2 mg) e uma gota de TRITON (detergente) e agitou-se o sistema com auxílio de um vórtex por aproximadamente um minuto. Transferiu-se essa mistura reacional para o frasco de síntese contendo a resina preparada segundo o item 2.1.1 (p., 55) e se deixou o sistema em agitação por aproximadamente 12 h. Retirou-se então a solução da mistura reacional com auxílio de uma bomba de vácuo e lavou-se a peptidil-resina resultante no frasco de síntese por três vezes com uma série alternada de 5 mL de DMF e 5mL de AIP e finalmente por duas vezes com aproximadamente 5 mL de DCM (Chan & White, 2000).

### **2.1.3 – Acoplamento dos demais aminoácidos à peptidil-resina**

Procedeu-se inicialmente, a desproteção da peptidil-resina pela remoção do grupo Fmoc (seção 1.2.1, p. 13). Esse processo de inicia por agitação mecânica da peptidil-resina com 5 mL de uma solução de piperidina em DMF a 20% (v/v), contendo uma gota de TRITON. Procedeu-se inicialmente uma agitação rápida de um minuto e duas subseqüentes agitações de dez minutos, seguidas de lavagem da peptidil-resina com três séries alternadas de 5 mL de DMF/AIP e duas lavagens posteriores com 5mL de DCM. Efetuou-se a seguir o teste de Kaiser (seções 1.2.4 e 2.1.5, p. 16 e 58, respectivamente) e, em caso positivo, tinha-se a peptidil-resina pronta para o acoplamento. Em casos onde se obtiveram resultados do teste duvidosos, ou negativos, procedeu-se a desproteção com uma solução piperidina a uma maior concentração, ou ainda aumentou-se o tempo da desproteção (à medida que o tamanho das cadeias foi aumentando e a desproteção não foi sendo completamente efetiva, aumentou-se gradativamente a concentração da solução de piperidina até 40% quando necessário, e, quando ainda necessário, aumentou-se o número de lavagens (Chan & White, 2000).

Uma vez confirmada a desproteção, preparava-se a solução para um novo acoplamento (ver seção 1.2.2, p. 14). Em um frasco separado, o respectivo Fmoc-

aminoácido e HOBt foram pesados em excesso estequiométrico de duas vezes (*i.e.* 3 equivalentes) e foram solubilizados em aproximadamente 5 mL de DMF. Adicionou-se, a seguir, DIC em excesso estequiométrico de duas vezes à mistura. Essa mistura foi agitada por aproximadamente um minuto com auxílio de um vórtex e deixou-se o sistema em repouso para ativação por aproximadamente dez minutos. Adicionou-se então uma gota de TRITON e procedeu-se a agitação durante um minuto com auxílio de um vórtex. Finalmente adicionou-se a mistura à peptidil-resina contida no frasco de síntese e deixou-se o sistema em agitação mecânica durante 1h 30min a 2h, para que ocorresse a reação de acoplamento. Após a reação de acoplamento, submeteu-se pequena alíquota da peptidil-resina resultante ao teste de Kaiser. Em caso positivo, procederam-se novos acoplamentos com reagentes novos, até que fosse obtido resultado negativo. Quando se obtinha resultado negativo, submetia-se a peptidil-resina resultante a uma nova desproteção e ao subsequente acoplamento. Repetiu-se o processo cíclico até o acoplamento do último resíduo de aminoácido à peptidil-resina.

Com o aumento na extensão da cadeia polipeptídica no decorrer da síntese, é comum que se tenham maiores dificuldades nas reações de acoplamento. Quando tais problemas começaram a ocorrer, efetuou-se o aumento dos tempos dos acoplamentos iniciais (até 4 h), bem como dos reacoplamentos e aumentaram-se também os excessos estequiométricos dos reagentes (até quatro vezes, *i.e.* 5 equivalentes) em relação à peptidil-resina.

#### **2.1.4 – Clivagem do peptídeo da peptidil-resina e isolamento do peptídeo bruto**

Inicialmente removeu-se o grupo Fmoc como descrito no item 2.1.3 (p. 56) e procederam-se as subsequentes lavagens (três séries alternadas de 5 mL de DMF e AIP e três vezes subsequentes com 5mL de DCM). A seguir, secou-se a peptidil-resina obtida com auxílio de uma linha de vácuo e pela passagem de gás nitrogênio, a qual foi então transferida para um tubo falcon, onde se sucederia a clivagem. A seguir, adicionou-se ao tubo falcon 10 mL de solução de clivagem, constituída de TFA:TIS:água na proporção de 95,0:2,5:2,5 (v/v) e deixou-se o

sistema sob agitação mecânica durante 3 h (etapa de clivagem). Filtrou-se para um novo tubo falcon, a solução contendo o peptídeo clivado da resina com o auxílio de uma seringa equipada com filtro e fez-se a lavagem da resina com 3 mL de solução análoga à usada para a clivagem. Seguiu-se a evaporação da solução de clivagem, pelo borbulhento de gás nitrogênio. A seguir, foi efetuada a lavagem do peptídeo pela adição lenta de 10 mL de éter gelado (resfriado com nitrogênio líquido) e posterior centrifugação (processo efetuado quatro vezes). A fase etérea foi guardada e secou-se o peptídeo obtido com auxílio de gás nitrogênio. Dissolveu-se o peptídeo em 10 mL de água e algumas gotas de acetonitrila e a solução foi liofilizada (Chan & White, 2000; Fmoc resin cleavage and deprotection – Protocolo de clivagem da Novabiochem).

### **2.1.5 – Teste de Kaiser**

A peptidil-resina foi lavada por três vezes com uma série alternada de 5 mL de DMF e 5 mL de AIP e depois lavada duas vezes a resina com 5 mL de DCM. Secou-se a resina com auxílio de uma bomba de vácuo e transferiu-se uma pequena alíquota de resina para um tubo de ensaio. Adicionou-se a esse tubo de ensaio uma gota de solução de ninidrina a 5 % em etanol, duas gotas de solução de 80 % de fenol em etanol e uma gota de solução de KCN/água em piridina (2 mL de solução 0,001 mol / L de KCN em 98 mL de piridina). Deixou-se então o tubo sob aquecimento a 120 °C entre 4 a 6 minutos (Chan & White, 2000).

### **2.1.6 – Purificação dos peptídeos por CLAE e análise por EM**

Esta etapa do trabalho foi realizada pelos colaboradores Maura V. Prates e Nathália C. C. R. Mundim da EMBRAPA em Brasília.

As purificações foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu com duas bombas LC10-ADvp. Empregou-se uma coluna Vydac C18 10 $\mu$ m, 22mmX250mm, 300A (218TP1022). As amostras foram pesadas em alíquotas de 5mg e ressuspendidas em 500 $\mu$ L de água mili-Q, seguindo-se agitação em

vórtex. Como fase móvel, foram utilizados os solventes água mili-Q (solvente A) e acetonitrila nível cromatográfico da J. T. Baker (solvente B), ambos contendo TFA cromatográfico a 0,1 %. Utilizou-se um fluxo constante de 8 mL / min. Iniciou-se a eluição nos primeiros 5 min com 100 % do solvente A. A seguir introduziu-se o solvente B em gradiente linear, com sua concentração variando de 0 a 100 % no período entre 5 min e 65 min, fazendo-se ainda a eluição até 80 min com 100 % do solvente B. Coletaram-se em torno de vinte frações para as diferentes amostras. Em cada um dos casos, a fração de interesse foi concentrada em evaporador rotatório, liofilizada e então analisada por EM.

Procederam-se as análises de EM em espectrômetro híbrido, *Q-TOF Ultima* (Micromass). Acrescentou-se às amostras de 20µl de água milli-Q, procedendo-se então a homogeneização por aproximadamente 1 minuto em agitador *Vortex-Genie2* (Scientific Industries Inc.), seguindo-se centrifugação a 6000RPM por 30s em centrífuga *Nanofuge* (Hofer, Scientific Instruments). Retirou-se 10µl e acrescentou-se 100µl de solução de água com 50% de metanol e 0,1% de ácido acético, os quais foram homogeneizados e injetados no equipamento separadamente. Obtiveram-se os espectros com o equipamento ESI Q-TOF operando em modo V. Utilizou-se fluxo de 2µL/min e estabeleceram-se as voltagens do capilar e do cone como 2,8 kV e 30 V, respectivamente.

## **2.2 – Dicroísmo circular**

A fim de se obterem informações sobre a estrutura dos peptídeos em meios que mimetizam membrana biológicas, realizaram-se experimentos de CD em misturas de TFE:água, bem como em vesículas.

Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-810 acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco PFD-425S. Os espectros foram adquiridos e processados com o software Spectra Manager da JASCO. Os espectros processados foram analisados pelo software CDPro (Sreerama & Woody, 2004; Sreerama & Woody, 2000).

*Misturas de TFE:água* – preparam-se soluções a 0,1mg/mL dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3, bem como dos respectivos brancos, com as proporções de TFE:água de 0:100, 10:90, 30:70 e 60:40. Essas soluções foram tamponadas a pH 7,0 com tampão fosfato a 10 mM. As amostras foram transferidas para uma cubeta com caminho ótico de 1 mm e os espectros foram obtidos a 20°C entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, utilizando-se os seguintes parâmetros de aquisição: velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup>, coleta de dados 0,2 nm, 1 s de resposta, 1 nm de largura de banda e 8 acumulações. Após registrados, os espectros das amostras contendo peptídeo foram subtraídos dos espectros dos respectivos brancos para correção de linha de base.

*Vesículas* – Utilizou-se na preparação das vesículas, uma mistura de lipídeos POPC:POPS na proporção de 3:1. A quantidade correta de lipídio era dissolvida em diclorometano e o peptídeo era dissolvido em TFE. As duas soluções foram misturadas e o solvente era evaporado em fluxo de nitrogênio gasoso. Após, a mistura peptídeo-lipídios foi deixada sob vácuo durante 15 horas a fim de se removerem traços ainda remanescentes de solvente. LMV (Large Multilamellar Vesicles) eram formadas após a adição de solução aquosa de tampão fosfato (5,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH= 7,0) ao filme seco de lipídio-peptídeo e agitação com vórtex. As amostras eram então submetidas a sonicação (Bandelin, Sonorex super RK 514 BH) e a posteriores três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. As SUV (*Small Unilamellar Vesicles*) eram então preparadas por extrusão através de filtros de policarbonato com poros de 50 nm (Avestin Inc.). As soluções de SUV foram preparadas para uma concentração de 0,09mg/mL de peptídeo com uma proporção peptídeo:lipídio de 1:55 para os peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3. Essas soluções foram tamponadas a pH 7,0 com tampão fosfato a 5 mM. Foram também preparadas soluções de brancos nas mesmas condições das amostras. As amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm e os espectros foram gravados a 20°C, entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm, utilizando-se os seguintes parâmetros de aquisição: velocidade de varredura de 50 nm.min<sup>-1</sup>, coleta de dados 0,2 nm, 1 s de resposta, 1 nm de



largura de banda e 20 acumulações. Após registrados, os espectros das amostras contendo peptídeo foram subtraídos dos espectros do branco para correção de linha de base.

## 2.3 – RMN em solução

Experimentos bidimensionais de RMN em solução foram adquiridos com objetivo de se obter a estrutura tridimensional dos peptídeos.

Foram preparadas amostras dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3 a concentrações de 4,0 mM em mistura de TFE- $d_2$ /H<sub>2</sub>O (60:40%, v/v). Ajustou-se o pH para 7,0 pela adição de tampão fosfato para uma concentração final de 20,0 mM. Foram utilizados TFE- $d_2$  da Cambridge Isotope Laboratories e água com padrão de pureza mili-Q no preparo das soluções. O 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) a uma concentração de 1 mmol / L foi utilizado como padrão interno de referência para ressonâncias de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

Os experimentos de TOCSY, NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC e <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC foram adquiridos a 20°C em um espectrômetro Bruker *AVANCE* DRX 600 pertencente ao Centro Nacional de RMN Jiri Jonas no Rio de Janeiro. Uma sonda de 5 mm de tripla ressonância (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>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 (Berger *et al.*, 2004; Claridge, 1999 – ver seção 1.5.2, p. 29). Procedeu-se a otimização da homogeneidade do campo (*shimming*), bem como a sintonia da sonda nas frequências de <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, a fim de se terem otimizadas a resolução e a detecção de sinais. Foram ainda realizados, antes da aquisição dos experimentos de interesse direto, experimentos unidimensionais de <sup>1</sup>H com pré-saturação do sinal do solvente, a fim de se calibrarem os pulsos de radiofrequência, bem como se determinar a potência do pulso de pré-saturação. O software *X-WIN-NMR*<sup>®</sup> da Bruker foi utilizado durante a aquisição dos experimentos e os espectros obtidos foram processados com a suíte de programas NMRPipe<sup>®</sup> (*NMRPipe Spectral Processing and Analysis System*<sup>®</sup>) (Delaglio *et al.*, 1995), desenvolvida no *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (Estados Unidos da América). Os

sinais dos espectros de RMN obtidos foram analisados e atribuídos com auxílio do software NMRView<sup>®</sup>, versão 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994), desenvolvido pela *One Moon Scientific, Inc.* Os experimentos de DQF-COSY foram adquiridos a 20°C em um espectrômetro Bruker *AVANCE* DRX 400 pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução da UFMG, Belo Horizonte. Nos experimentos de DQF-COSY, procedeu-se a supressão do sinal de água pela filtragem de duplo-quantum (Piatini *et al.*, 1982), seqüência Watergate (Piotto *et al.*, 1992) e pelo emprego de pré-saturação durante o intervalo de relaxação.

Experimentos de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) foram adquiridos usando-se a seqüência de pulsos MLEV-17 (Bax & Davis, 1985 – ver seção 1.5.3, p. 31). Utilizou-se uma janela espectral de 6900 Hz, sendo que 512 incrementos em  $t_1$  com 8 transientes de 4096 pontos foram coletados para cada FID.

Experimentos de NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*– Kumar *et al.*, 1980 – ver seção 1.5.4, p. 35) foram adquiridos para tempos de mistura de 100, 150, 200, 300 e 400 ms com o objetivo de se checar difusão de *spin*. Utilizou-se uma janela espectral de 6900 Hz, sendo que 512 incrementos em  $t_1$  com 16 transientes de 4096 pontos foram coletados para cada FID.

Experimentos de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 27160 Hz e 8993 Hz respectivamente. 400 incrementos em  $t_1$  foram coletados com 56 transientes de 1024 pontos para cada FID. O experimento foi adquirido em modo editado de forma que as correlações de CH e CH<sub>3</sub> apresentam fase positiva enquanto que as de CH<sub>2</sub> fase negativa (Berger *et al.*, 2004; Wilker *et al.*, 1993 – ver seção 1.5.7, p. 45).

Experimentos de <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 27160 Hz e 8993 Hz respectivamente. 80 incrementos em  $t_1$  foram coletados com 400 transientes de 1024 pontos para cada FID (Berger *et al.*, 2004; Wilker *et al.*, 1993 – ver seção 1.5.7, p. 45).

Espectros de DQF-COSY (Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy) foram adquiridos com janelas espectrais de 4005 Hz, tendo sido adquiridos 1024 incrementos em  $t_1$  com 32 transientes de 4096 pontos para cada FID (Piantini *et al.*, 1982; Derome & Williamson, 1990).

Empregaram-se o método States-TPPI (Marion *et al.*, 1989) para detecção de quadratura em  $F1$  nos experimentos homonucleares e o método de seleção de eco-antieco (Davis *et al.*, 1992) para os experimentos heteronucleares.

## 2.4 – Estruturas das filoseptinas a partir de dados de *nOe*

Uma vez obtidos os mapas de contornos de RMN, realizaram-se as atribuições de várias ressonâncias de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  para as filoseptinas (ver seção 3.3.1, p. 83). Durante esse processo, foram atribuídos os vários sinais no mapa de contornos NOESY, os quais são indicadores de vizinhança espacial entre os núcleos correlacionados (Claridge, 1999; Derome, 1987). Consideradas as devidas aproximações, é possível se correlacionarem as intensidades dos picos do NOESY com as distâncias relativas entre os núcleos de  $^1\text{H}$ , o que torna tal experimento muito interessante para análise conformacional de macromoléculas de interesse biológico, como peptídeos e ácidos nucleicos (Wüthrich, 1986; Williamson *et al.*, 1985).

Com os propósitos de análise conformacional acima discutidos, as correlações de *nOe* obtidas no mapa de contornos NOESY tiveram suas intensidades convertidas em restrições de distâncias, as quais foram calibradas segundo algoritmos propostos por Hyberts e co-autores (Hyberts *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<sup>®</sup> (Johnson & Blevins, 1994). Cálculos da estruturas dos peptídeos foram realizados com o software Xplor-NIH, versão 2.17.0 (Schwieters *et al.*, 2003). Partindo-se da estrutura estendida, 200 estruturas eram geradas utilizando-se um protocolo de *annealing* simulado. Procederam-se 18000 passos de simulação de *annealing* a 1000K, com o subsequente decréscimo na temperatura em 9000

passos no primeiro estágio de processo de resfriamento. O controle estereoquímico das estruturas mais estáveis geradas foi realizado com o programa PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996). A manipulação, a visualização e a análise das estruturas tridimensionais obtidas foram realizadas com auxílio do programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

## 2.5 – RMN em fase sólida

### 2.5.1 – Preparação das amostras

Com o objetivo de se analisar o grau de ordenamento da bicamada lipídica em amostras de bicamadas contendo os peptídeos da série PS, decidiu-se preparar amostras com variadas relações de peptídeo:lipídio para estudos de RMN de  $^{31}\text{P}$ . Foram preparadas misturas de peptídeo:lipídio com concentrações de 0,0 mol%, 0,5 mol%, 1,0 mol%, e 2,0 mol % para uma massa final de lipídio (POPC) de 10 mg. Dissolveram-se o peptídeo, bem como o lipídio, em TFE e o naftaleno ( $n_{\text{naftaleno}}=n_{\text{lipídio}}+n_{\text{peptídeo}}$ ) em clorofórmio. O naftaleno é utilizado com a finalidade de se obter um maior grau de orientação da amostra (Hallock *et al.*, 2002). Após, as três soluções foram misturadas e a mistura resultante sonicada por cinco minutos e, em seguida, a mistura era concentrada com fluxo nitrogênio gasoso e então o volume resultante era espalhado em sete placas de vidro ultra-finas ( $9 \times 22 \text{ mm}^2$ , Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha). Deixaram-se então as amostras secarem a temperatura ambiente por aproximadamente 24 h e em seguida elas eram submetidas a vácuo por quatro dias a fim de se eliminar o naftaleno utilizado nas preparações. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma câmara de hidratação com umidade relativa de 93% e foram deixadas a hidratar por seis dias. Finalmente, as placas de vidro foram empilhadas e seladas com fita de teflon e plástico.

Para os estudos de RMN de  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$  dos peptídeos da série PS, prepararam-se amostras dos peptídeos a uma concentração de 1% em 200 mg de lipídio. Utilizou-se POPC como lipídeo e, novamente, o naftaleno foi empregado na preparação das amostras ( $n_{\text{naftaleno}}=n_{\text{lipídio}}+n_{\text{peptídeo}}$  – Hallock *et al.*, 2002). Para o PS-2, foi também testada uma mistura de POPC:POPS na proporção de 3:1. O

pH medido das amostras foi de 5,5. Não obstante, foram também preparadas amostras com os peptídeos PS-1 e PS-2 a pH 8,0 a fim de se testar a possível existência de algum efeito de pH (Bechinger, 1996), uma vez que esses peptídeos possuem três resíduos de aminoácido que podem suportar carga em meio neutro ou ligeiramente ácido (Tabela 2.2, p. 65). A preparação dessas amostras foi feita de maneira similar à descrita na página anterior, entretanto 27 placas de vidro ultra-finas foram utilizadas e diclorometano foi usado para a dissolução do POPS. Nas amostras com pH 8, foi adicionada solução de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> para se alcançar o pH desejado. Foram utilizados, na preparação dessas amostras, peptídeos isotopicamente marcados conforme indicado na Tabela 2.2. Esses peptídeos foram obtidos pela incorporação de resíduos de aminoácidos marcados na seqüência primária via estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, conforme descrito nas seções 1.2 e 2.1 (p. 9 e 54, respectivamente).

Tabela 2.2 – Seqüência primária dos peptídeos isotopicamente marcados utilizados nos estudos de RMN em fase sólida

PS-1	FLSLI PHAIN <u>AV</u> S <u>AI</u> AKHN-NH <sub>2</sub>
PS-2	FLSLI PH <u>AI</u> N AVST <u>L</u> VHHF-NH <sub>2</sub>
PS-3	FLSLI PHAIN <u>AV</u> S <u>AL</u> ANHG-NH <sub>2</sub>

- a) Sítios marcados com <sup>15</sup>N estão sublinhados  
 b) Sítios marcados com resíduos de 3,3,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> Ala estão duplamente sublinhados

## 2.5.2 – Experimentos

Experimentos de RMN de <sup>31</sup>P desacoplados de hidrogênio das amostras de bicamadas lipídicas orientadas foram realizados a 162.0 MHz em um espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore*, utilizando-se uma sonda comercial estática de dupla ressonância para RMN no estado sólido. Medidas foram efetuadas para a orientação da normal da membrana paralela ao campo magnético externo. Uma seqüência de pulsos de eco de Hahn foi empregada (Rance *et al.*, 1983). Os seguintes parâmetros foram utilizados: janela espectral de 75 kHz, tempo de aquisição de 13,6 ms, 2048 pontos, pulsos de 90<sup>0</sup> com largura de 2.5 μs, intervalo de tempo de eco 40 μs, intervalo de tempo de espera

5 s e 64 transientes para amostras com 200 mg de lipídio ou 128 transientes para as amostras com 10 mg de lipídio (seção 2.5.1, p. 64). Uma solução de ácido fosfórico a 85% foi utilizada como referência externa (0 ppm). Uma multiplicação exponencial correspondente a um alargamento de linha de 20 Hz foi aplicada antes da transformada de Fourier.

Experimentos de RMN de  $^{15}\text{N}$  desacoplados de hidrogênio foram adquiridos a 40 MHz em um espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore*, utilizando-se uma sonda comercial de dupla ressonância para RMN no estado sólido modificada (Bechinger & Opella., 1991). Medidas foram conduzidas para duas diferentes orientações: normal da membrana paralela e perpendicular (bobina invertida) ao campo magnético externo. Uma seqüência de polarização cruzada com pulsos adiabáticos formatados nos canais de  $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  foi utilizada (Hediger *et al.*, 1995; Hediger *et al.*, 1994 – ver seção 1.5.8, p. 48). Os seguintes parâmetros foram empregados: pulsos de  $90^\circ$  com largura de 8  $\mu\text{s}$ , tempo de chaveamento de campo de 700  $\mu\text{s}$ , intervalo de tempo de espera de 3,5 s, 512 pontos de domínio de tempo, 18000 aquisições (30000 para a bobina invertida) e janela espectral de 33 kHz. O  $\text{NH}_4\text{Cl}$  foi utilizado como referência externa (41.5 ppm).

Espectros de RMN de  $^2\text{H}$  em fase sólida foram obtidos em um espectrômetro Bruker *AVANCE DSX-500 wide-bore*, utilizando-se uma sonda estática comercial de tripla ressonância. Medidas foram realizadas para duas diferentes orientações: normal da membrana paralela e perpendicular (bobina invertida) ao campo magnético externo. Utilizou-se uma seqüência de eco quadrupolar (Davis *et al.*, 1976 – ver seção 1.5.9, p. 51) com os seguintes parâmetros:  $^2\text{H } B_1$  de 50 kHz, tempo de eco de 40  $\mu\text{s}$ , janela espectral de 100 kHz, 4096 pontos, 80000 transientes e intervalo de tempo de repetição de 1 s. Os espectros foram calibrados com relação à  $^2\text{H}_2\text{O}$  (0 ppm). Uma função exponencial de apodização correspondente a um alargamento de linha de 100 Hz foi aplicada antes da transformada de Fourier.

O experimento de RMN bidimensional PISEMA (Wu *et al.*, 1994) foi adquirido para a amostra do PS-3 incorporado em bicamadas lipídicas de POPC.

O espectro foi gravado para a orientação da amostra com a normal da membrana paralela ao campo magnético externo. Esse experimento foi adquirido em um espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore*, utilizando-se uma sonda comercial de dupla ressonância para RMN no estado sólido modificada (Bechinger & Opella., 1991). Os seguintes parâmetros foram empregados: pulsos de 90° com largura de 7,9 μs, tempo de chaveamento de campo de 800 μs, potência da radiofrequência de chaveamento de 45 kHz em ambos os canais, intervalo tempo de espera de 3,5 s, janelas espectrais F1 e F2 de 22502 Hz e 33335 Hz, respectivamente, tendo sido gravados 26 incrementos em  $t_1$  com 512 pontos para 12288 aquisições cada. O NH<sub>4</sub>Cl foi utilizado como referência externa (41.5 ppm) de <sup>15</sup>N.

### 2.5.3 – Simulação de parâmetros da RMN em fase sólida e determinação da topologia dos peptídeos em bicamadas lipídicas

À temperatura ambiente, o grupo metila de resíduos de alanina exhibe rápido movimento rotacional ao redor da ligação C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>. Isso faz com que os três núcleos de <sup>2</sup>H de resíduos de 3,3,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> Ala sejam magneticamente equivalentes e que o tensor resultante da interação quadrupolar do deutério seja paralelo ao vetor da ligação C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>.

No caso de peptídeos orientados em bicamadas lipídicas, em situações nas quais se têm uma rápida difusão rotacional em torno da normal da membrana, o desdobramento quadrupolar de deutério  $\Delta\nu_Q$  observado pode ser descrito pela equação 2.1,

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \times \left( \frac{e^2 q Q}{h} \right) \times \left( \frac{3 \cos^2 \Theta - 1}{2} \right) \times \left( \frac{3 \cos^2 \Omega - 1}{2} \right) \quad \text{eq. 2.1}$$

onde  $e^2 q Q/h$  é a constante de acoplamento quadrupolar (Seelig, 1977),  $\Theta$  o ângulo entre o vetor da ligação C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> e a normal da membrana e  $\Omega$  o ângulo entre a normal da membrana e o campo magnético externo (Aisenbrey & Bechinger 2004a&b). Por uma rápida inspeção da equação 2.1, conclui-se que

espectros registrados para orientações de amostras com a normal da membrana perpendicular a  $B_0$  ( $\Omega = 90^\circ$ ) fornecem desdobramentos quadrupolares duas vezes menores que os espectros obtidos para orientações que apresentem a normal da membrana perpendicular a  $B_0$  ( $\Omega = 0^\circ$ ).

O valor observado para o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  é dado pela equação 2.2, sendo os termos  $\sigma_{11}$ ,  $\sigma_{22}$  e  $\sigma_{33}$  os deslocamentos químicos dos respectivos tensores principais de blindagem e os termos  $\phi$  e  $\theta$  são os ângulos de Euler que representam, respectivamente, rotações em torno dos eixos  $z$  e  $y'$  (Bechinger & Sizun 2003).

$$\sigma_{zz} = \sigma_{11}\text{sen}^2\theta \cos^2\phi + \sigma_{22}\text{sen}^2\theta \text{sen}^2\phi + \sigma_{33} \cos^2\theta \quad 2.2$$

Para se determinarem as topologias das filoseptinas em bicamadas lipídicas, usaram-se, como dados de entradas para simulações dos parâmetros  $\sigma_{zz}$  e  $\Delta\nu_Q$ , as estruturas 3D desses compostos obtidas por RMN em solução (seção 3.3.2, p.95). Cada geometria molecular foi previamente alinhada (Goldstein, 1959) de maneira a se ter o átomo marcado com  $^{15}\text{N}$  (N-Ala-14 para a PS-1, N-Leu-15 para a PS-2 e N-Val-12 para a PS-3) localizado na origem do sistema de coordenadas atômicas, sendo então o eixo  $z$  definido por um segundo átomo (o N do esqueleto da His-7 para a PS-1, o N da Ala-8 para a PS-2 e o C carbonílico da Leu-4 para a PS-3) de maneira a se ter  $z$  disposto paralelamente em relação ao eixo principal de rotação da hélice. Finalmente, o sistema de coordenadas internas foi definido ao se posicionar o carbono carbonílico da ligação peptídica que envolve o sítio marcado com  $^{15}\text{N}$  (C-Ser-13 para a PS-1, C-Thr-14 para a PS-2 e C-Ala-11 para a PS-3) no plano  $xz$ , de forma a se ter o eixo  $y$  ortogonalmente disposto com relação ao plano da ligação peptídica marcada com  $^{15}\text{N}$ .

Após definido o sistema de coordenadas interno, as estruturas dos peptídeos foram sucessivamente giradas (180 x 180 passos) em torno do eixo principal da hélice e do eixo  $y$ , sendo os valores de  $\Delta\nu_Q$  e  $\sigma_{zz}$  calculados para cada orientação obtida, ou seja, ambos parâmetros foram obtidos em função do ângulo de inclinação (rotação em torno do eixo  $y$ ) e do ângulo polar de rotação



interna (rotação em torno do eixo principal da hélice).  $\sigma_{zz}$  foi obtido a partir da equação 2.2, corrigida por dois termos que representam pequenas rotações angulares em torno dos eixos  $x$  e  $y$ , de forma a se ter um perfeito alinhamento do sistema de coordenadas local com o sistema de eixos principal, uma vez que se sabe que  $\sigma_{33}$  está disposto em um plano que cobre um ângulo de  $18^\circ$  com relação ao vetor da ligação N-H (Bechinger & Sizun, 2003). As coordenadas dos  $C_\alpha$  e  $C_\beta$  dos sítios marcados com  $3,3,3\text{-}^2\text{H}_3$  Ala foram utilizadas para se obter o valor de  $\cos^2\Theta$  e então os valores de  $\Delta\nu_Q$  são obtidos segundo a equação 2.1 (p. 67).

No caso da PS-3, o valor do desdobramento dipolar H-N, obtido a partir do experimento de PISEMA, foi também calculado para as várias possíveis orientações do peptídeo na bicamada lipídica. A equação 2.3 define o desdobramento dipolar H-N ( $D_{\text{HN}}$ ), onde  $\mu_0\gamma_1\gamma_2\hbar/4\pi$  representa a constante de acoplamento dipolar H-N,  $r_{\text{HN}}$  o comprimento da ligação H-N e  $\Psi$  o ângulo entre o vetor da ligação H-N e o campo magnético externo (Straus, *et al.*, 2003).

$$D_{\text{HN}} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \times \left(\frac{\gamma_1\gamma_2\hbar}{r_{\text{HN}}^3}\right) \times (3\cos^2\Psi - 1) \quad \text{eq. 2.3}$$

As coordenadas do H e do N da ligação H-N do sítio marcado com  $^{15}\text{N}$  no PS-3 foram utilizadas na obtenção do valor de  $\cos^2\Psi$  e então os valores de  $D_{\text{HN}}$  foram obtidos em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna pela equação 2.3.

As etapas de alinhamentos geométricos, bem como as simulações dos parâmetros espectrais  $\Delta\nu_Q$ ,  $\sigma_{zz}$  e  $D_{\text{HN}}$  foram realizadas com um programa escrito em linguagem FORTRAN.

## 2.6 – Estrutura e constantes de blindagem da PS-2 a partir de cálculos quânticos

Tal fase do trabalho tem como objetivo a produção de estruturas de peptídeos, via métodos mais acurados que os de dinâmica molecular (desconsiderando-se o uso de restrições de *nOe*, no caso).

Diversas metodologias de cálculos de estruturas eletrônicas têm sido utilizadas para a determinação teórica de sistemas moleculares simples ou de dimensões maiores. Dentre os métodos *ab-initio*, o mais simples é o método de Hartree-Fock (HF), que faz uso de uma função de onda para o sistema de  $N$ -elétrons construída como um determinante de Slater de  $n$  orbitais de um elétron. O método de HF contempla as repulsões elétron-elétron apenas na média através do chamado potencial de Hartree-Fock  $v^{\text{HF}}(\mathbf{r})$ . O potencial  $v^{\text{HF}}(\mathbf{r})$  é construído pela soma dos termos eletrostáticos de repulsão coulombiana clássica  $J(\mathbf{r})$  e o potencial de troca,  $K(\mathbf{r})$ , que ocorre devido ao princípio de exclusão de Pauli, pela seleção de uma função de onda eletrônica antissimétrica com relação à permuta das coordenadas espaciais e de *spin* de dois elétrons quaisquer do sistema (Wittel & McGlynn, 1977).

Métodos de cálculos de estruturas eletrônicas mais elaborados são formulados considerando a possibilidade de diversas configurações eletrônicas, dando origem a um particular estado eletrônico de um átomo ou molécula. Tais métodos, como o da mistura de configurações (CI) ou perturbativos (MP2, MP3, MP4, etc), corrigem gradativamente os erros inerentes à aproximação de Hartree-Fock, que considera as repulsões elétron-elétron na média, e são chamados de métodos correlacionados. A inclusão dos efeitos de correlação eletrônica é, via de regra, crucial para a produção de valores teóricos acurados de energias, estruturas moleculares e propriedades de átomos e moléculas. Mais recentemente, o método da teoria do funcional densidade (DFT) tem atraído interesse para a determinação de propriedades de sistemas moleculares. Isso porque a estrutura das equações DFT que devem ser resolvidas, tem uma forma equivalente à das equações do método HF e, portanto, pode ser explorada para o tratamento de sistemas moleculares de grande porte (Jansík, 2004).

O método do funcional densidade (DFT) tem bases teóricas firmes no teorema de Hohenberg e Kohn, que estabelece que um sistema eletrônico qualquer tem a energia do estado fundamental determinada, conhecendo-se apenas a sua densidade eletrônica (Hohenberg & Kohn, 1964). O grande problema para a implementação prática desse resultado é que a densidade exata

de um sistema de elétrons não é conhecida. Entretanto, aproximações podem ser consideradas e a implementação da teoria do funcional densidade devido a Kohn e Sham para aplicações em sistemas moleculares faz uso do potencial de correlação e troca  $V_{xc}(\mathbf{r})$  parametrizados adequadamente (Kohn & Sham, 1965). A equação de Kohn-Sham (KS) difere formalmente da equação de Hartree-Fock, pela substituição do potencial de Hartree-Fock  $v^{HF}(\mathbf{r})$  pelo potencial de correlação de troca  $V_{xc}(\mathbf{r})$  (Kohn *et al.*, 1996).

Neste trabalho, os cálculos de otimização de estruturas moleculares foram conduzidos com o método DFT. Tal método emprega a técnica da expansão dos orbitais moleculares em um conjunto de orbitais atômicos. Os coeficientes lineares dessa expansão são determinados iterativamente na forma de um procedimento cujo campo de potencial é determinado auto-consistentemente, portanto a denominação de um algoritmo do tipo de campo auto-consistente ou SCF (*Self-Consistent Field*) (Levine, 1983). Nesse método, as equações íntegro-diferenciais fundamentais a serem resolvidas, a equação de Fock ou a equação de Kohn-Sham, com o operador de Fock construído inicialmente para um conjunto de funções *spin*-orbitais (funções de um único elétron) adequadamente selecionado; o novo conjunto de *spin*-orbitais resultantes dessa solução é então utilizado para a construção de um novo operador de Fock e as equações de Fock ou Kohn-Sham são novamente resolvidas, gerando um terceiro conjunto de *spin*-orbitais. Esse processo de reconstrução do operador de Fock e solução das equações íntegro-diferenciais problema prossegue até que o conjunto de *spin*-orbitais da (i-1)-ésima iteração coincide, dentro de um erro prescrito, com a solução da i-ésima iteração. Neste momento a auto-consistência é alcançada para o erro pré-determinado (Levine, 1983; Wittel & McGlynn, 1977).

Devido à magnitude do sistema molecular em análise, foi utilizado o conjunto de funções de bases atômicas 6-31G\*\*, que foi otimizado por Pople e co-autores e se trata de um conjunto de base compacto [10s4p1d|3s2p1d]. Tal conjunto representa o orbital *1s* de átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio pela combinação linear de seis funções gaussianas e os orbitais de valência *2s* e *2p* são representados por um conjunto de bases duplo-*zeta*, sendo os menores orbitais

representados pela combinação linear de três funções gaussianas e o maior por uma única função gaussiana, tendo-se ainda a inclusão de um orbital de polarização  $d$  representado por uma única função gaussiana. O átomo de hidrogênio tem o orbital  $1s$  também representado por um conjunto de bases duplo- $zeta$ , além de se ter um orbital de polarização  $p$  (Frisch *et al.*, 1984).

Finalmente, foi utilizado o funcional híbrido B3LYP que consiste de uma combinação linear dos funcionais de Dirac (Slater, 1951), Becke (Becke, 1988), LYP (Lee *et al.*, 1988), e VWN (Vosko *et al.*, 1980) e inclui parcialmente o termo de troca exato de Hartree-Fock. Os funcionais de Dirac e Becke são utilizados para descrever a interação de troca eletrônica, enquanto que os funcionais VWN e LYP descrevem as contribuições da correlação eletrônica.

Dentre os métodos de cálculos correlacionados, os cálculos DFT são os processados mais rapidamente, tendo sido esse um dos motivos de sua escolha para este trabalho. Entretanto, o cálculo de uma estrutura peptídica da magnitude da PS-2 é ainda muito dispendiosa. Baseando-se nisso, decidiu-se subdividir o peptídeo em quatro fragmentos, tomando-se o cuidado para serem consideradas as interações mais importantes que estabilizam a estrutura secundária. Levando-se em conta uma possível estrutura helicoidal, teve-se o cuidado em se preservarem todas as interações de ligação de hidrogênio CO $\cdots$ HN para o intervalo  $i, i+4$  (Wüthrich, 1986). Para que esse tipo de interação seja garantida, procederam-se as amidações das pseudo-carboxilas terminais, bem como as acilações das pseudo-aminas terminais (exceto a amina terminal original). Os fragmentos peptídicos estudados são apresentados a seguir na Tabela 2.3 (p. 73), sendo os resíduos destacados em negrito, os referenciados por todas as possíveis interações de ligação de hidrogênio no intervalo  $i, i+4$  dentro de uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal ideal. Apresentam-se também nessa Tabela o número de átomos e elétrons envolvidos nos cálculos de cada um dos fragmentos. Ressalta-se que nas execuções dos cálculos foram levados em conta os estados neutros e protonados dos resíduos de histidina, uma vez que esse tipo de resíduo normalmente é parcialmente protonado em pH 7,0 (Nelson & Cox, 2004; Markley, 1975).

Tabela 2.3 – Fragmentos da PS-2 usados nos cálculos DFT de estruturas e constantes de blindagem

Fragmento	Resíduos	Número de (Átomos:H:C:N:O:e <sup>-</sup> )
F1	<b>FLSLIPHAI</b>	153:81:50:12:10:544
F2	LIPHAINAV	145:76:45:13:11:524
F3	HAINAVSTLV	153:79:46:14:14:564
F4	AVSTLVHHF	148:74:48:14:12:554

Resíduos em negrito contemplam ligações de H CO...HN no intervalo até i, i+4 na molécula original.

A construção das estruturas iniciais dos fragmentos citados na Tabela 2.3 para o cálculo DFT foram obtidas da seguinte maneira. Inicialmente foi construída uma estrutura helicoidal ideal para o peptídeo PS-2, sobre a qual se procedeu um processo de otimização via mecânica molecular, utilizando-se um campo de força AMBER. Para tal processo foi usado o programa Hyperchem<sup>®</sup> (HyperChem TM Professional, Hypercube, Inc.). Posteriormente editou-se o arquivo de geometria resultante, de forma a se obterem os fragmentos F1, F2, F3 e F4, sendo, quando necessário, apenas adicionados um átomo de hidrogênio nas frações pseudo-amino terminal e pseudo-carboxila terminal, a fim de se garantirem a acilação e a amidação dessas respectivas frações.

Os cálculos de otimização das estruturas de F1, F2, F3 e F4 foram conduzidos no nível DFT/B3LYP/6-31G\*\*, empregando-se técnicas analíticas de gradiente molecular. Para tal, foi utilizado o programa PC GAMESS (US) (Schmidt *et al.*, 1993). Utilizou-se a versão 7.d (2005) desenvolvida e mantida por A. A. Granovsky na Moscow State University. A aproximação DFT/B3LYP/6-31G\*\* foi também utilizada nos cálculos das constantes de blindagem dos núcleos dos fragmentos F1, F2, F3 e F4, tendo sido a técnica GIAO (*Gauge Independent Atomic Orbitals*) empregada para corrigir a invariância do *gauge* magnético (Schindler & Kutzelnigg, 1983; Ditchfield, 1974). O programa DALTON (Helgaker *et al.*, 2005), versão 2.0, foi utilizado nos cálculos das constantes de blindagem.

## 3 – Resultados

### 3.1 – Síntese de Peptídeos

A Tabela 3.1 (p. 75) apresenta as informações das diversas etapas de acoplamento nas sínteses dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3.

Como pode se observar, os primeiros acoplamentos são todos bem sucedidos para reações que duram de 1h 30 min a 2 h. Tem-se, entretanto, para o sexto acoplamento na síntese da PS-1, a necessidade do primeiro reacoplamento. Percebeu-se que, apesar da alta similaridade entre os peptídeos, as três sínteses apresentaram graus de dificuldades bem diferentes. A síntese da PS-1 foi a mais complicada, tendo sido necessárias várias etapas de reacoplamento. Por outro lado, a síntese da PS-3 foi relativamente simples, tendo sido necessárias etapas de reacoplamento apenas nas incorporações do 14<sup>o</sup> e do 17<sup>o</sup> resíduos de aminoácidos.

Foram obtidas as seguintes massas dos peptídeos brutos após clivagem e leofilização:  $m_{PS-1} = 135$  mg,  $m_{PS-2} = 162$  mg,  $m_{PS-3} = 191$  mg. Esses valores correspondem a um rendimento bruto de: 45 % para PS-1, 54 % para PS-2 e 63 % para PS-3. Tais valores correspondem a um rendimento médio por acoplamento de aminoácido de 95,9 % para PS-1, 96,8 % para PS-2 e 97,6 % para PS-3. A confirmação da obtenção dos produtos foi efetuada por análise de ESI+/EM, antes da purificação. Nessas análises detectaram-se picos como os de  $m/z = M+1$ ,  $(M+2)/2$  e  $(M+3)/3$ , os quais se apresentavam bem mais intensos nos espectros que os outros picos com  $m/z$  similares, dando indícios de que as sínteses foram bem sucedidas.

São a seguir apresentados, nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3 (p. 76, 78 e 79, respectivamente), os cromatogramas e espectros de massas dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3, respectivamente.

**Tabela 3.1 – Dados relativos às etapas de acoplamento nas sínteses dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3**

Ac <sup>a</sup>	PS-1			PS-2			PS-3		
	AA <sup>b</sup>	Tac(eq) <sup>c</sup>	Treac(eq) <sup>d</sup>	AA <sup>b</sup>	Tac(eq) <sup>c</sup>	Treac(eq) <sup>d</sup>	AA <sup>b</sup>	Tac(eq) <sup>c</sup>	TReac(eq) <sup>d</sup>
1	N	12:00 (4)		F	12:00 (4)		G	12:00 (4)	
2	H	1:30 (3)		H	2:00 (3)		H	2:00 (3)	
3	K	2:00 (3)		H	2:00 (3)		N	3:00 (4)	
4	A	2:00 (3)		V	2:00 (3)		A	2:00 (3)	
5	I	2:00 (3)		L	2:00 (3)		L	2:00 (3)	
6	A	2:30 (3)	1:40 (3)	T	2:30 (3)		A	2:20 (3)	
7	S	2:30 (3)	2:00 (3)	S	2:30 (3)		S	2:30 (3)	
8	V	3:30 (5)		V	2:20 (3)		V	2:30 (3)	
9	A	3:30 (5)		A	2:20 (3)		A	2:15 (3)	
10	N	3:00 (5)	1:30 (5)	N	3:00 (4)	1:30 (4)	N	3:30 (4)	
11	I	2:45 (5)	2:40 (5); 2:15 (5); 2:00 (5)	I	2:30 (5)		I	2:00 (3)	
12	A	3:30 (5)	3:10 (5); 2:00 (5)	A	2:30 (5)	2:00 (5)	A	2:20 (3)	
13	H	4:00 (5)		H	3:00 (5)		H	3:30 (3)	
14	P	4:00 (5)		P	3:00(5)		P	3:00 (3)	1:00 (5)
15	I	3:30 (5)	1:00 (5)	I	3:00 (5)	1:30 (5)	I	3:00 (5)	
16	L	3:50 (5)	1:10 (5)	L	3:00 (5)		L	3:00 (5)	
17	S	4:00 (5)	1:00 (5)	S	3:30 (5)	1:30 (5)	S	3:20 (5)	1:30 (5)
18	L	3:50 (5)	3:30(5)	L	3:30 (5)	1:30 (5)	L	3:00 (5)	
19	F	4:00 (5)	1:30 (5)	F	3:30 (5)	1:30 (5)	F	3:20 (5)	

a) Ac = Número do acoplamento; b) AA = aminoácido; Tac = Tempo de reação de acoplamento em horas:minutos / (eq) = equivalentes de Fmoc-aminoácidos entre parênteses; d) Treac = Tempo de re-acoplamento em horas:minutos / (eq) = equivalentes de Fmoc-aminoácidos entre parênteses.





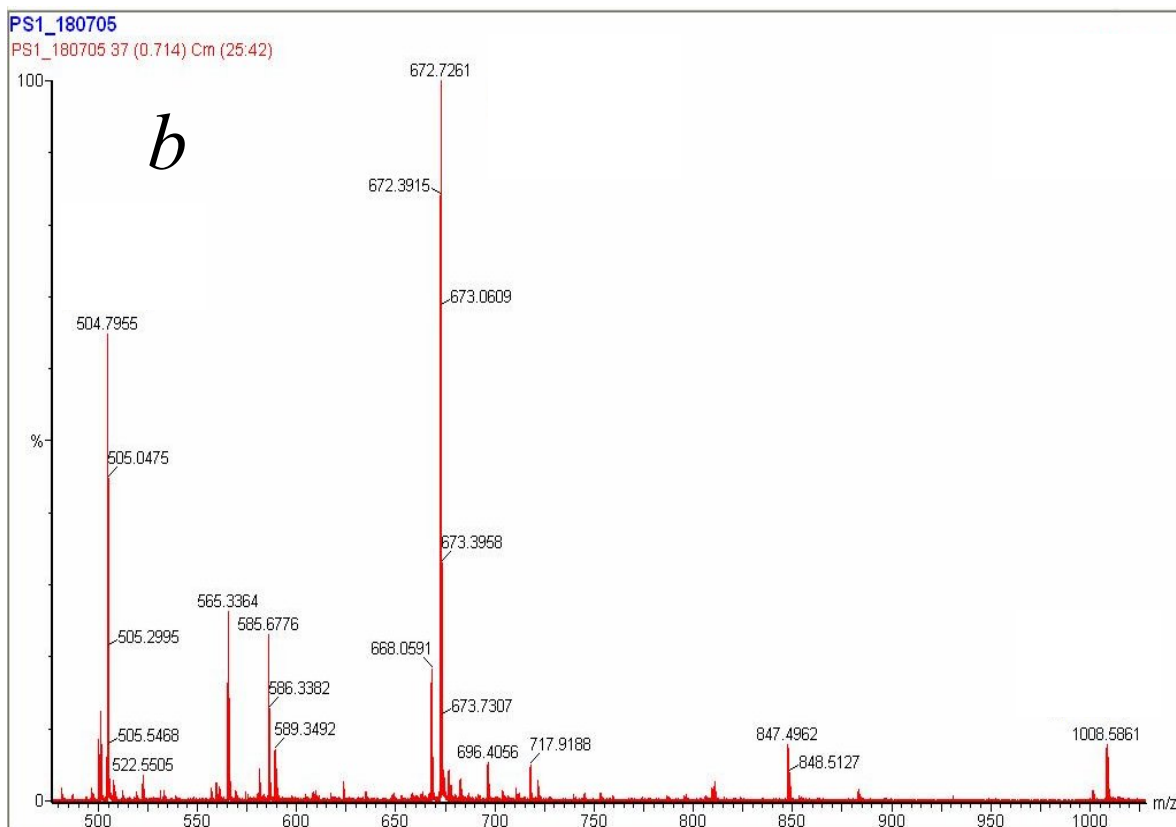
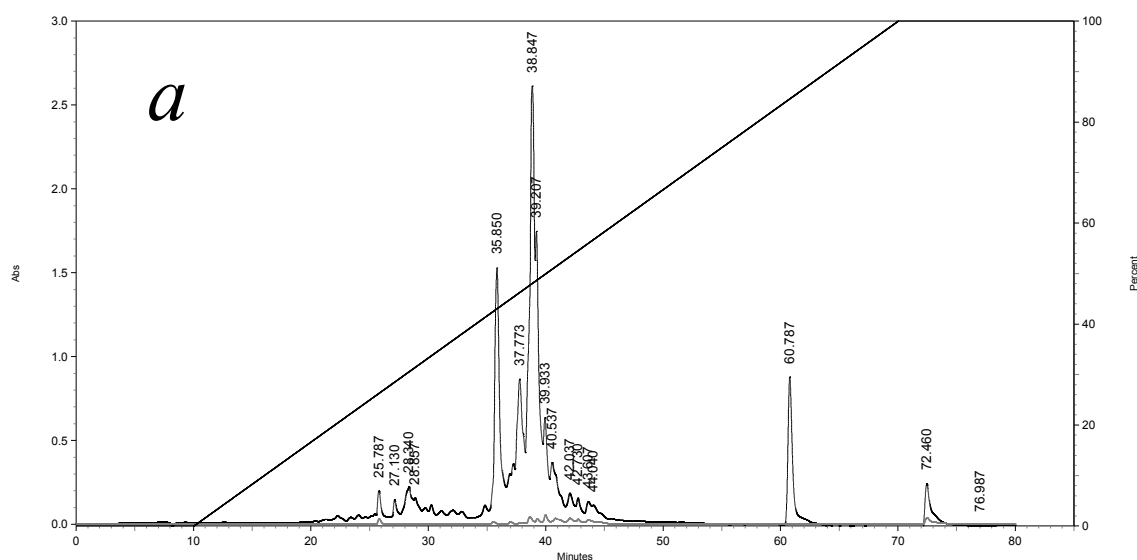
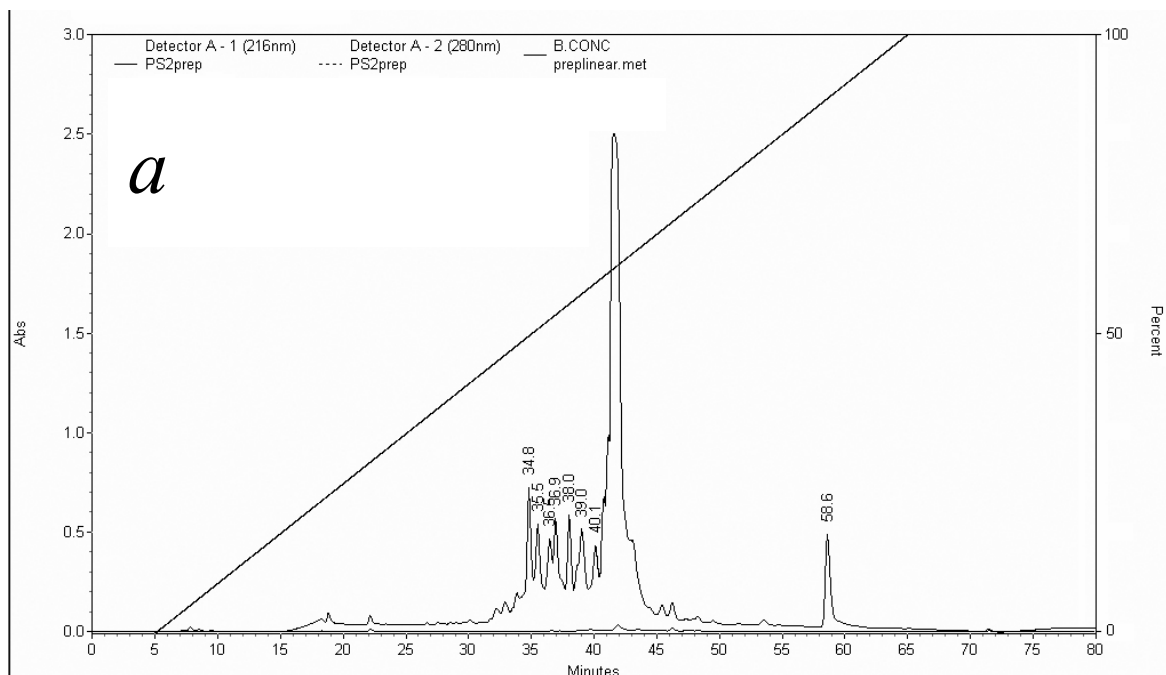


Figura 3.1 – PS-1 sintético: *a*) cromatograma obtido com uso de coluna Vydac C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m, 22mmX250mm, 300A (218TP1022) com fase móvel de água mili-Q (solvente A) e acetonitrila nível cromatográfico (solvente B), ambos contendo TFA cromatográfico a 0,1 % para um fluxo constante de 8 mL / min.; *b*) espectro de massas TOF eletro-spray +.

Quanto à purificação da PS-1, observa-se que sua fração apresentou um tempo de retenção igual a 38,8 min na análise de CLAE (Figura 3.1a). O pico obtido nesse tempo de eluição é o mais intenso. Essa fração foi então coletada e finalmente submetida a análise por espectrometria de massas, podendo ser o resultado acima visualizado na Figura 3.1b. Nesse espectro podem ser observados importantes sinais que confirmam a síntese e o isolamento do produto desejado. Tais sinais estão associados aos íons nas razões  $m/z$  de 1008,6  $((M+2)/2)$ , 672,4  $((M+3)/3)$  e 504,8  $((M+4)/4)$ . Esses resultados indicam um valor de  $M+1$  igual a 2016,18. Esse valor é bem próximo ao esperado (2015,17) e o pequeno erro observado (aproximadamente 1 dalton) é atribuído a um problema de calibração do aparelho.

A seguir é apresentada a Figura 3.2 (p. 78), com dados associados à síntese da PS-2. Na Figura 3.2a, tem-se o cromatograma do PS-2, que foi coletado na fração correspondente ao tempo de retenção igual a 41,6 min (sinal mais intenso), a qual apresentou, no espectro de massas da Figura 3.2b, íons intensos com razões  $m/z$  iguais a 1058,6  $((M+2)/2)$ , 706,1  $((M+3)/3)$  e 530,0  $((M+4)/4)$ , confirmando-se a síntese desse composto. Esses resultados indicam um valor de  $M+1$  igual a 2116,19. Esse valor é bem próximo ao esperado (2115,18) e o pequeno erro observado (aproximadamente 1 dalton) é atribuído a um problema de calibração do aparelho.

Finalmente, é apresentada a Figura 3.3a (p. 79), que retrata o cromatograma do peptídeo PS-3, o qual foi eluído a 36,1 min (o sinal o mais intenso no cromatograma). O espectro de massas da fração coletada em torno de 36,1 min é apresentado na Figura 3.3b (p. 79). São constatados nesse espectro, os íons com razão  $m/z$  iguais a 1945,1  $(M+1)$ , 973,0  $((M+2)/2)$  e 649,0  $((M+3)/3)$ , que confirmam a obtenção do produto planejado. Esses resultados indicam um valor de  $M+1$  igual a 1945,28. Esse valor é bem próximo ao esperado (1944,07) e o pequeno erro observado (aproximadamente 1 dalton) é atribuído a um problema de calibração do aparelho.



PS2PREP17\_020605 Nathalia

02-Jun-2005 16:12:03

PS2PREP17\_020605 15 (0.293) Cn (Cen,4, 80.00, Ar); Sm (SG, 2x3.00); Sb (5,40.00); Cm (5:16)

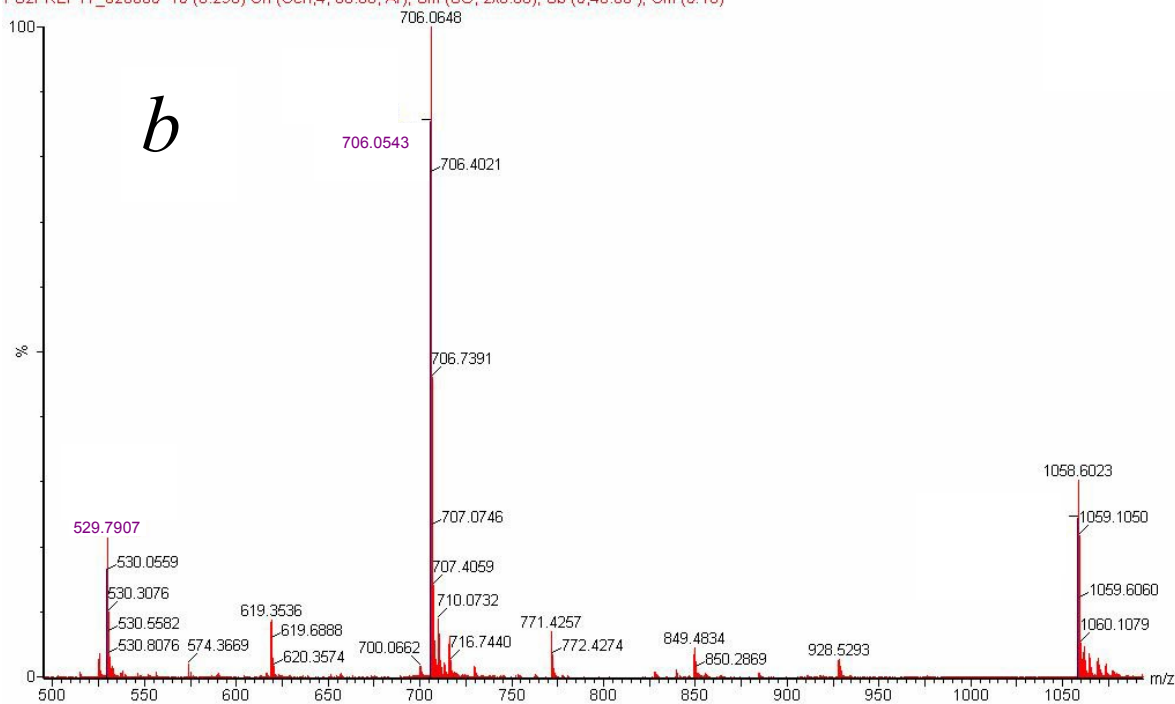


Figura 3.2 – PS-2 sintético: *a*) cromatograma obtido com uso de coluna Vydac C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m, 22mmX250mm, 300A (218TP1022) com fase móvel de água mili-Q (solvente A) e acetonitrila nível cromatográfico (solvente B), ambos contendo TFA cromatográfico a 0,1 % para um fluxo constante de 8 mL / min.; *b*) espectro de massas TOF eletro-spray +.

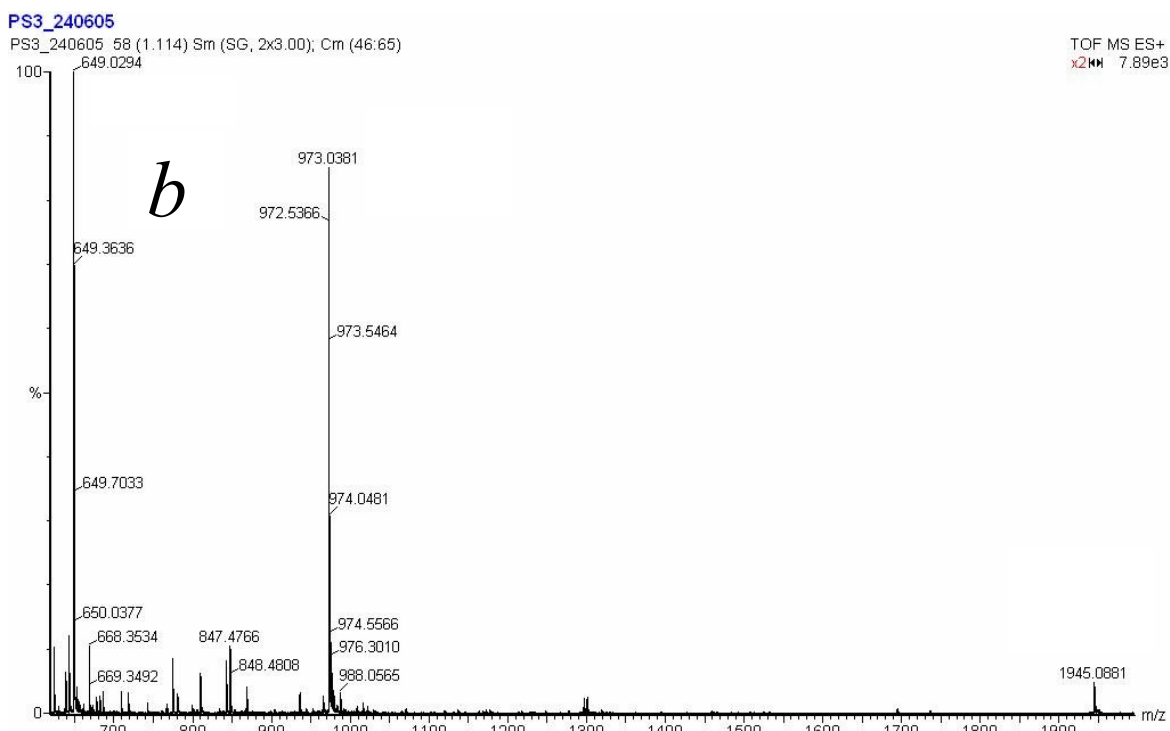
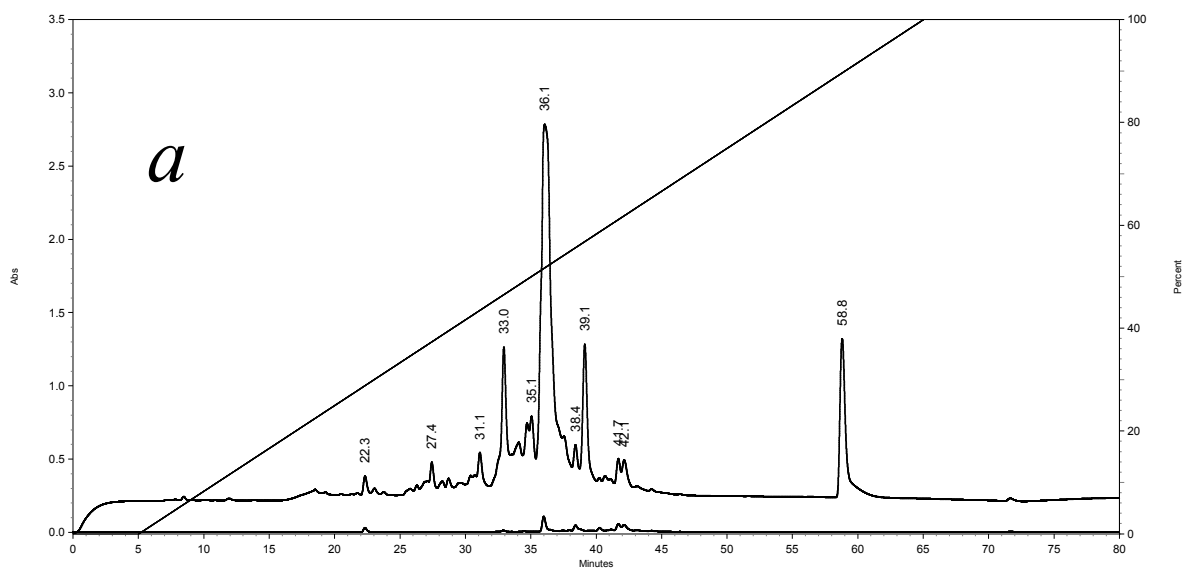


Figura 3.3 – PS-3 sintético: *a*) cromatograma obtido com uso de coluna Vydac C<sub>18</sub> 10 $\mu$ m, 22mmX250mm, 300A (218TP1022) com fase móvel de água mili-Q (solvente A) e acetonitrila nível cromatográfico (solvente B), ambos contendo TFA cromatográfico a 0,1 % para um fluxo constante de 8 mL / min.; *b*) espectro de massas TOF eletro-spray +.

### 3.2 – Dicroísmo circular

Várias classes de peptídeos antimicrobianos catiônicos têm apresentado interações com membranas biológicas, onde eles têm mostrado atividades formadoras de poros e de penetração na célula (Bechinger & Lohner, 2006;

Bechinger, 1999). Portanto, as estruturas dos peptídeos filoseptina 1, 2 e 3 foram investigadas por CD em diferentes misturas de TFE:H<sub>2</sub>O e em vesículas, que representam meios que mimetizam o ambiente de membranas (Buck, 1998; Ding *et al.*, 2002).

A seguir são apresentados os espectros de dicroísmo circular (CD) gravados na região do ultravioleta distante para diferentes amostras dos peptídeos PS-1 (Figura 3.4), PS-2 (Figura 3.5) e PS-3 (Figura 3.6). Nessas figuras são apresentados espectros de titulações com TFE e com vesículas de POPC:POPS.

Os espectros obtidos para as soluções dos três peptídeos em tampão (espectros em preto), claramente mostram padrão típico de compostos não estruturados (Chen *et al.*, 1974), indicando a ausência de estruturação em meio aquoso para essas substâncias. Quando se tem 10% de TFE (espectros em verde), observa-se um pequeno deslocamento do mínimo nos espectros das PS-1 e PS-3, mas o padrão é ainda bem similar ao de compostos não estruturados. A 10% de TFE se observa uma modificação significativa no padrão do espectro da PS-2, a qual pode ser indicativa de algum equilíbrio entre diferentes arranjos

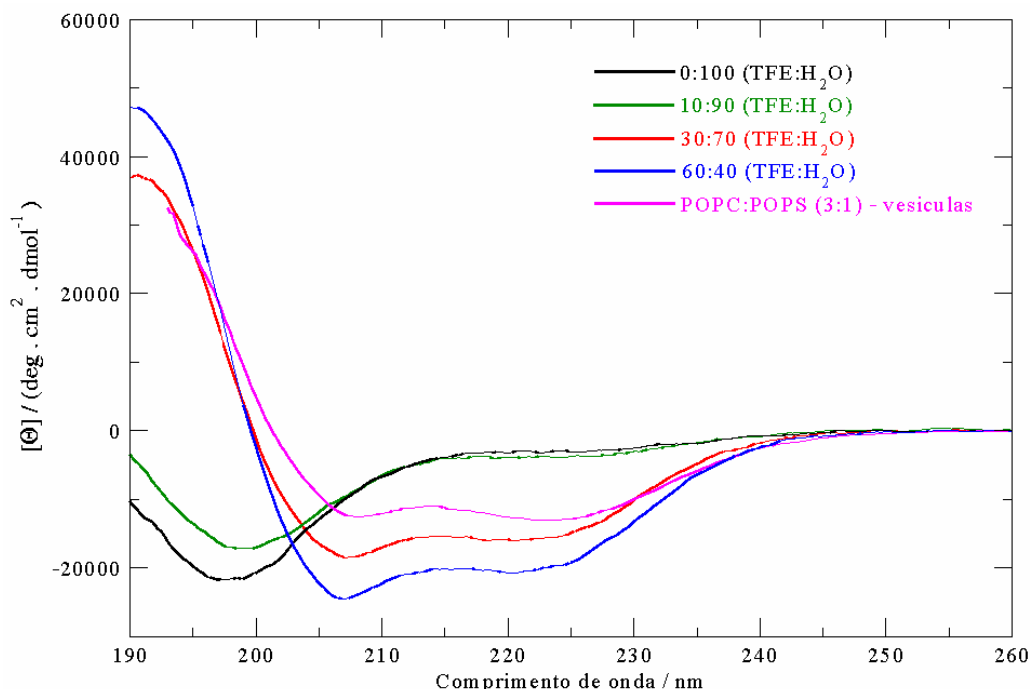


Figura 3.4 – Espectros de CD da PS-1 em diferentes razões de TFE:água (10,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH= 7,0) e em vesículas de POPC:POPS 3:1 (5,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH= 7,0).

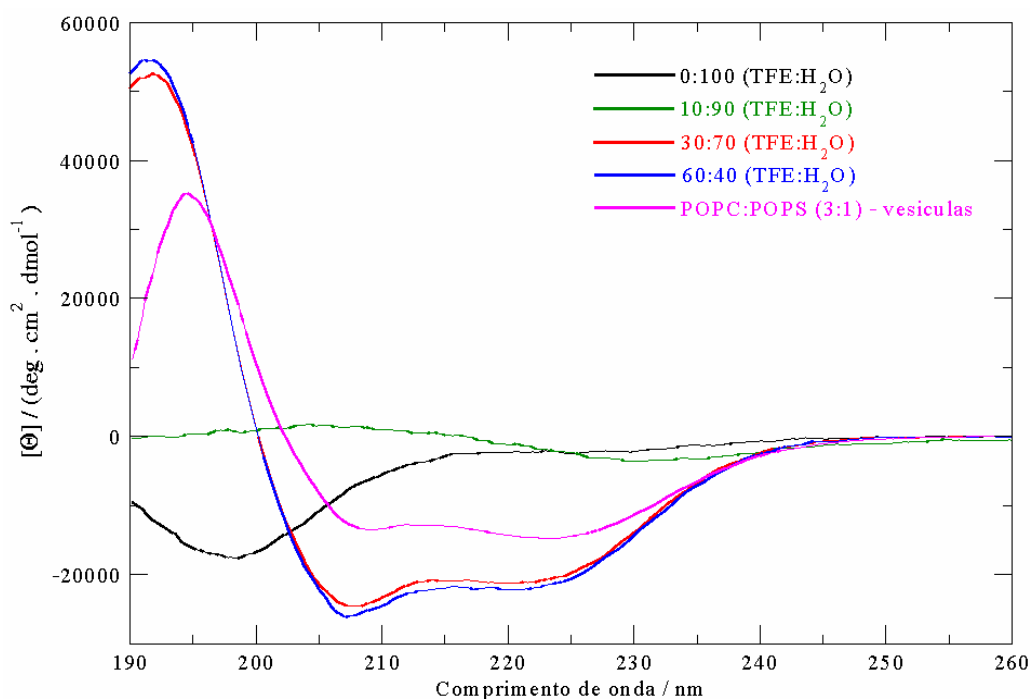


Figura 3.5– Espectros de CD da PS-2 em diferentes razões de TFE:água (10,0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH= 7,0) e em vesículas de POPC:POPS 3:1 (5,0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH= 7,0).

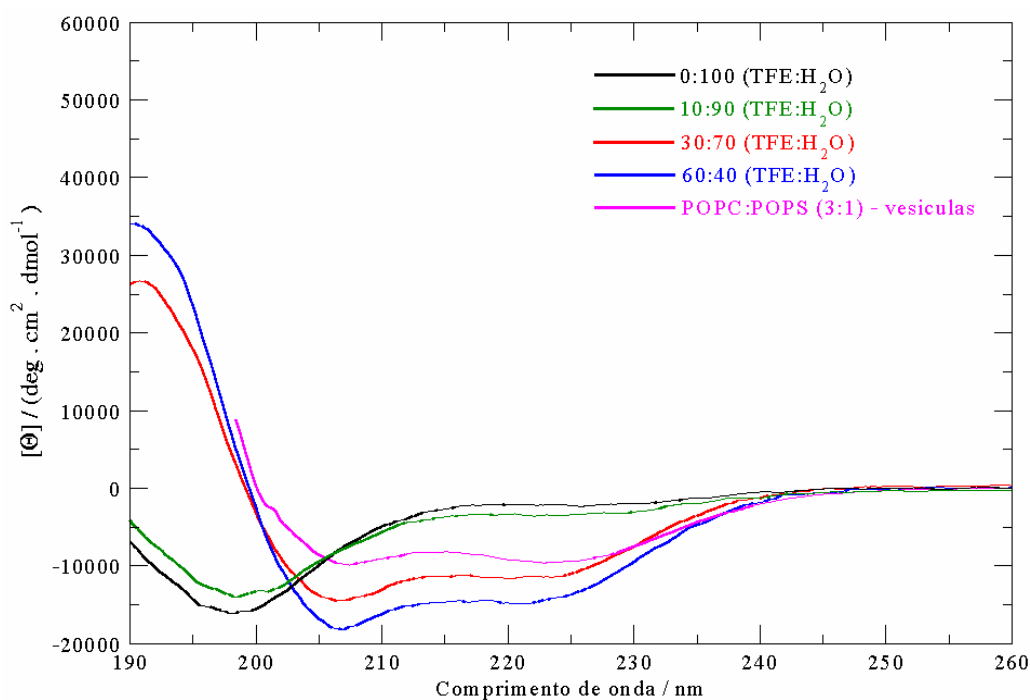


Figura 3.6– Espectros de CD da PS-3 em diferentes razões de TFE:água (10,0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH= 7,0) e em vesículas de POPC:POPS 3:1 (5,0 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH= 7,0).

conformacionais e compostos não estruturados. Por outro lado, quando a concentração de TFE é aumentada até 30% (espectros em vermelho), é possível se observarem dois mínimos locais bem definidos em 208 e 222 nm, que são bem característicos de estruturas peptídicas helicoidais (Chen, *et al.* 1974). Finalmente, quando a chega a 60% de TFE (espectros em azul), observa-se ainda a existência desses mínimos locais característicos de hélices peptídicas, todavia, os aumentos associados às intensidades dessas bandas negativas sugerem um aumento no ordenamento helicoidal desses peptídeos em relação às soluções contendo 30% de TFE.

Com o objetivo de realizar uma análise semi-quantitativa dos espectros discutidos acima, foram conduzidas deconvoluções dos espectros de CD com o software CDPro (Sreerama & Woody, 2004; Sreerama & Woody, 2000). Foram então obtidos conteúdos helicoidais de 53%, 75% e 41% a 30% TFE e de 70%, 78% e 53% a 60% TFE para o PS-1, PS-2 e PS-3, respectivamente. Os valores obtidos indicam que as filoseptinas, em 60% TFE, realmente possuem um índice de estrutura helicoidal ligeiramente superior ao apresentado nas soluções em 30% de TFE, entretanto essa diferença é muito sutil para a PS-2. Apesar do alto grau de homologia entre as três cadeias peptídicas, observa-se que a fração helicoidal da PS-3 é significativamente inferior às respectivas frações dos peptídeos PS-1 e PS-2. Quando comparados os resultados obtidos para a PS-1 e PS-2 a 60% de TFE, observa-se que a PS-2 apresenta um arranjo helicoidal ligeiramente superior ao da PS-1, entretanto se compararem as diferenças entre os teores de hélices para cada um dos peptídeos obtidos a 30% e 60% de TFE, conclui-se que a PS-2 é mais propensa a se estruturar em meios que mimetizam o ambiente de membranas.

Na presença de vesículas de POPC:POPS (3:1) (espectros em rosa), os espectros das três filoseptinas são também característicos da ocorrência de conformações helicoidais, embora as contribuições para esse tipo de estrutura secundária sejam reduzidas em comparação com os respectivos espectros obtidos em 60% de TFE (diminuição das intensidades dos mínimos locais). Isso provavelmente ocorre devido a um processo de troca rápida envolvendo espécies

peptídicas associadas à membrana (estruturas helicoidais) e espécies peptídicas solúveis em água (moléculas não estruturadas). Tal fenômeno de troca e rearranjo conformacional já foi observado previamente para outros peptídeos antimicrobianos catiônicos (Duclohier *et al.*, 1989 & Marion *et al.*, 1988). Deve-se ainda ressaltar que os graus relativos de estruturação observados nas misturas de TFE, ou seja PS-2 > PS-1 > PS-3, são reproduzidos nos espectros desses peptídeos na presença de vesículas, o que permite inferir a existência de diferentes graus de estruturação desses peptídeos quando em contato com membranas biológicas.

Os resultados obtidos por espectroscopia de dicroísmo circular indicam que as filoseptinas estudadas não apresentam estruturas definidas quando em meio aquoso, por outro lado estruturas helicoidais são obtidas em meios com menor constante dielétrica (misturas TFE:H<sub>2</sub>O), bem como quando esses compostos se encontram associados a vesículas. Esse tipo de comportamento é comumente observado em peptídeos antimicrobianos, os quais desestruturados em meio aquoso, adotam estruturas bem definidas na interface das membranas biológicas e exercem assim suas funções perturbadoras e de formação de poros nas membranas, o que leva à atividade biológica desses compostos (Bechinger & Lohner, 2006; Strandberg & Ulrich, 2004; Bechinger, 1999). Portanto, os resultados de CD obtidos podem ser indicativos que as três filoseptinas exercem suas atividades antifúngicas e biológicas pelo ataque à membrana celular.

### **3.3 – Experimentos de RMN em solução**

#### **3.3.1 – Atribuição dos sinais de RMN**

Os experimentos de TOCSY, NOESY, HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C e HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N foram realizados para as amostras dos três peptídeos (seção 2.3, p. 60). Os dados de RMN obtidos foram todos processados com o NMRPipe<sup>®</sup> (Delaglio *et al.*, 1995) e então todos os mapas de contornos convertidos para o formato do NMRView<sup>®</sup> (Johnson & Blevins, 1994), com qual se procedeu a análise e atribuição dos sinais de ressonância.



Os assinalamentos foram realizados pela análise simultânea de todos os mapas de contornos, de forma a se extrair o maior número de informações sobre determinado sinal e então correlacioná-lo a um resíduo de aminoácido específico situado dentro da cadeia polipeptídica. O espectro de TOCSY apresenta um papel crucial no assinalamento dos sinais, por conectar o sistema de spins como um todo, ou em partes separadas, para cada resíduo de aminoácido. Dessa forma, diferentes sistemas de spins, característicos de certos grupos de resíduos de aminoácidos (Wüthrich, 1986), podem ser prontamente reconhecidos pela análise de um mapa de contornos TOCSY. Um típico resíduo, a partir do qual pode ser interessante se iniciar o assinalamento de uma cadeia polipeptídica, é a alanina, devido a seu sistema de spins  $A_3X-NH$ , o qual apresenta no TOCSY, na região de  $\delta$  amídico, apenas duas correlações: HN-HA e HN-HB (HN representa o H amídico envolvido na ligação peptídica, HA representa  $H\alpha$  e HB  $H\beta$  – Figura 3.7a, p. 85). Outro resíduo de aminoácido que apresentaria apenas duas correlações nessa região seria a glicina, que possui dois HA, mas o deslocamento químico dos HB da alanina ( $\delta_{\text{medio}} 1,38$ ) proporcionaria a perfeita distinção entre esses dois sistemas de spins. Dessa forma, pode ser interessante se iniciar a análise de uma cadeia polipeptídica a partir de resíduos de alanina ou glicina. Durante o assinalamento dos sinais, além das análises dos sistemas de spins em questão, foi utilizada a tabela de deslocamentos químicos do *Biological Magnetic Resonance Data Bank* para fins de comparação com os resultados experimentais ([http://www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/statsel.htm](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm)).

Uma vez atribuídos os sistemas de spins, baseando-se nas equivalências e conectividades nucleares intra-residuais e deslocamentos químicos dos núcleos, segue-se a atribuição da posição desses sistemas de spins na cadeia peptídica através das conectividades inter-residuais obtidas pelas correlações no mapa de contornos NOESY (Wüthrich, 1986). A seguir é apresentada a Figura 3.7, que exemplifica a representação adotada para análise dos átomos em resíduos de aminoácidos (Figura 3.7a – exemplo para o resíduo de leucina), bem como exemplifica a representação das correlações entre hidrogênios inter-resíduos que

podem ser encontradas em mapas de contornos NOESY de peptídeos (Figura 3.7a).

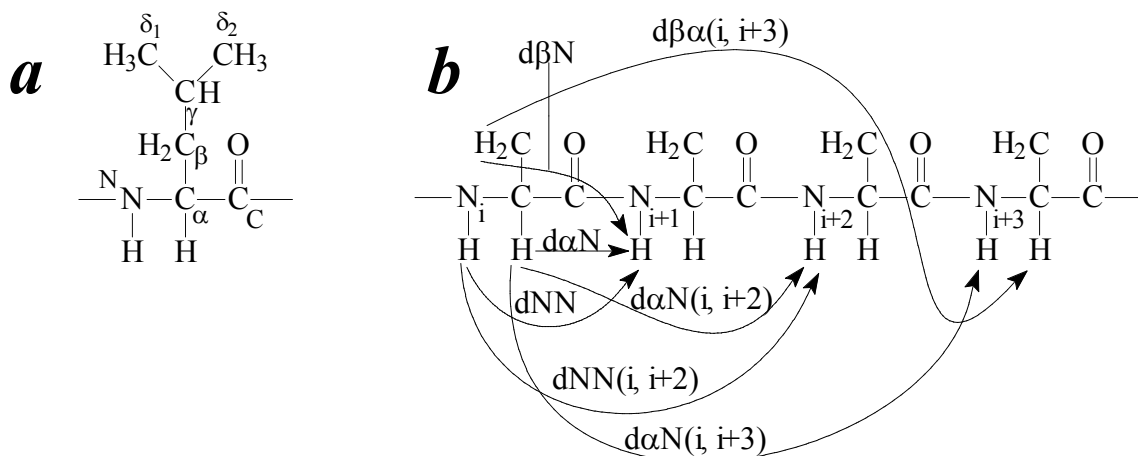


Figura 3.7 – a) Representação utilizada para átomos em resíduos de aminoácidos – exemplificado para um resíduo de leucina – e b) exemplo de nomenclatura utilizada para definir correlações inter-residuais entre H em mapas de contornos NOESY.

Como apresentado na Figura 3.7a, os átomos de nitrogênio e hidrogênio amídicos são representados respectivamente por N e HN. A seguir se tem os H $\alpha$  e C $\alpha$  (que podem ser tratados também como HA e CA), e os demais átomos da cadeia lateral do resíduo que são denotados, segundo suas posições, por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , etc (ou , respectivamente, por A, B, G, D, E, etc.). A Figura 3.7b indica a representação de correlações entre hidrogênios inter-residuais para discussões de dados provenientes de mapas de contornos NOESY. Por exemplo, a correlação do H $\alpha$  do  $i$ -ésimo resíduo de aminoácido, com o HN do segundo resíduo subsequente, é denotada por  $d\alpha N(i, i+2)$ . As correlações do tipo  $(i, i+1)$  têm seus índices eliminados, por uma questão de simplificação: por exemplo  $d\alpha N(i, i+1)$  é representado somente por  $d\alpha N$ .

Um bom exemplo dessa estratégia de assinalamento é observada para o peptídeo PS-2, que possui dois resíduos de alanina. Pela análise do seu mapa de contornos TOCSY, foram identificados os dois sistemas de spins que apresentavam o padrão esperado (HN, HA, HB:  $\delta$  8,23, 4,15, 1,50 e  $\delta$  8,26, 4,11,

1,53). Para o assinalamento específico desses sinais, bem como para determinar as conectividades inter-resíduos, empregou-se a técnica de análise simultânea TOCSY-NOESY (Wüthrich, 1986). Essa estratégia consiste no assinalamento de conectividades  $d\alpha N$  (Figura 3.7b), que indica a existência de  $nOe$  entre HA de um determinado resíduo, e o HN do resíduo seguinte. Esse tipo de conectividade é exemplificado a seguir na Figura 3.8.

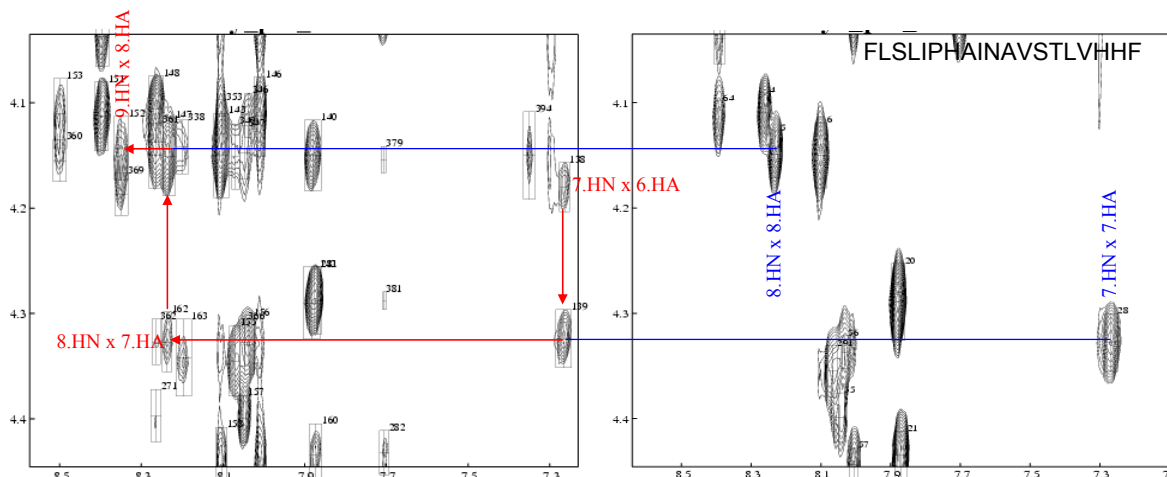


Figura 3.8 – Mapas de contornos parciais NOESY (à esquerda) e TOCSY (à direita) da PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

Parte-se, por exemplo, da correlação atribuída no mapa de contornos TOCSY entre 8.HN x 8.HA. Remete-se então tal correlação à análoga (linha azul) no mapa de contornos NOESY. Percebe-se, no mapa de contornos NOESY, que essa correlação tem o  $\delta$  de HN conectado a outro HA que, no caso, remete ao 7.HA, caracterizando uma conexão do tipo  $d\alpha N$ . Observa-se também no NOESY (a partir da correlação caracterizada no TOCSY), a conexão de 8.HA com o sinal de HN em  $\delta$  8,34, tendo-se estabelecida mais uma conexão do tipo  $d\alpha N$  e, conseqüentemente, o valor de  $\delta$  9.HN, bem como a subsequente atribuição dos respectivos sinais do resíduo de isoleucina 9 no mapa de contornos TOCSY e seus  $nOe$  intra-resíduos no mapa de contornos NOESY. Deve-se ressaltar que o estabelecimento de uma determinada conectividade do tipo  $d\alpha N$  só é confirmada quando se tem a identificação do sistema de spins de ambos o resíduos envolvidos no TOCSY, pois, conforme será posteriormente discutido, podem ser

também observadas correlações do tipo  $d\alpha N(i,i+j)_{j=2,3,4}$ . Quando se tem algum outro mapa de contornos, como o HSQC, é interessante se realizarem consultas simultâneas nesse mapa para a confirmação das conectividades. Deve-se ainda tomar cuidado, pela possibilidade de existência de conectividades similares em seqüências do tipo XXZ (ou outras), como exemplo VHH, segundo encontrado no PS-2. Nesse tipo de circunstância devem ser analisadas conectividades adicionais, bem como devem ser observadas as intensidades dos picos de *nOe* nas atribuições. Ressalta-se ainda que a região de correlações HN x HA é considerada a principal região nos estudos de peptídeos por RMN, tanto no TOCSY e COSY, como no NOESY, pois essas correlações podem fornecer valiosas informações sobre estruturas secundárias e terciárias de peptídeos/proteínas. Tal região desses mapas de contornos é denominada de “impressão digital” (Wüthrich, 1986).

Uma outra forma de se confirmarem as conectividades entre os núcleos é pelos assinalamentos de conexões dNN (Figura 3.7b, p. 85). Percebe-se por exemplo, na Figura 3.9 (mapa de contornos NOESY parcial – parte superior – p. 88), as correlações 7.HN x 8.HN, 8.HN x 9.HN e 10.HN x 11.HN, 11.HN x 12.HN, as quais possibilitam confirmar de forma inequívoca o assinalamento dos hidrogênios amídicos dos resíduos de alanina 8 e 11. No caso de resíduos de prolina, os quais não possuem hidrogênio amídico, devem ser determinadas conexões análogas, levando-se em conta o HD. No presente trabalho, foram detectadas as correlações 5.HN x 6.HD e 6.HD x 7.HN no NOESY, tendo-se então a seqüência peptídica estabelecida.

Por fim, vale ainda ressaltar que uma análise simultânea de mapas de contornos TOCSY-NOESY permite a caracterização de picos de *nOe* como correlações intra ou inter-residuais (Wüthrich, 1986).

Uma ferramenta importante que pode também ser utilizada como ponto de partida em uma etapa estratégica do assinalamento, é o mapa de contornos HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ . Um fator interessante pode ser notado na caracterização de resíduos de asparagina. A Figura 3.9, mostrada a seguir, apresenta um mapa de contornos HSQC  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  (parte inferior), que correlaciona simultaneamente dois sinais de

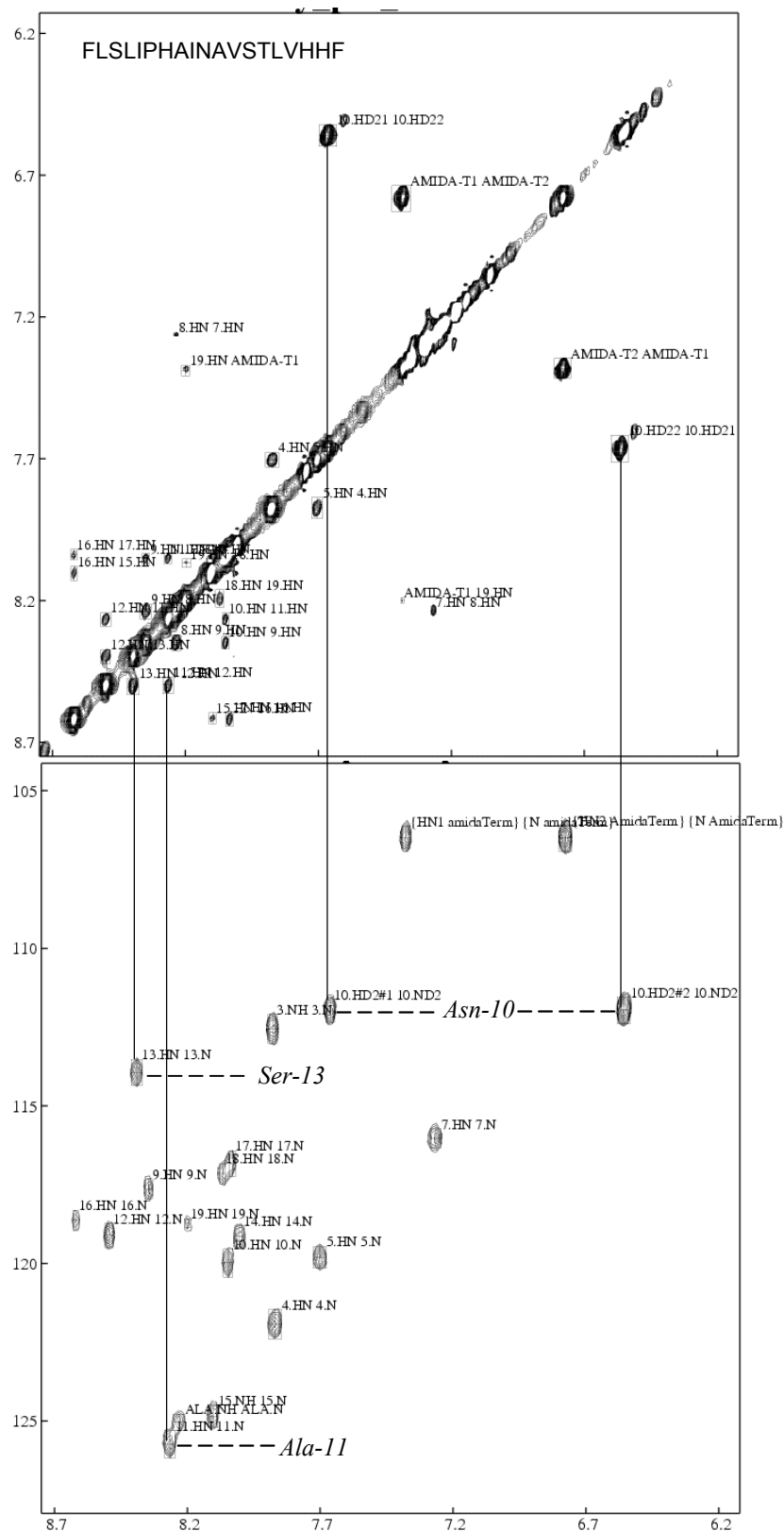


Figura 3.9 – Mapas de contornos parcial NOESY (acima) e mapa de contornos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (abaixo) da PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$  (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

hidrogênios com um mesmo sinal de nitrogênio, o que indica a existência de um grupo NH<sub>2</sub>, que no caso, só pode ser atribuído aos HD e ND do único resíduo de asparagina na posição 10. Dessa forma, faz-se a ligação desses sinais ao mapa de contornos NOESY (linhas na Figura 3.9, p. 88), tendo-se então a detecção dos hidrogênios HD da asparagina nesse último mapa de contornos. Vale a pena ressaltar que os ND de resíduos de asparagina tendem a ressonar em deslocamentos químico inferiores ( $\delta_{\text{medio}}$  112,92) aos hidrogênios amídicos envolvidos em ligações peptídicas, sendo tal fator outro indício importante para o assinalamento indireto dos HD de asparagina no HSQC <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N. Esse mapa de contornos pode também ser utilizado para identificação de outros resíduos de aminoácidos que tendem a apresentar deslocamentos químicos mais característicos de HN envolvidos em ligações peptídicas. Por exemplo, N de resíduos de serinas tendem a ressonar em frequências relativamente mais baixas ( $\delta_{\text{medio}}$  116,22) que outros nitrogênios envolvidos em ligações peptídicas e, por outro lado, N de resíduos de alaninas tendem a ressonar em frequências relativamente maiores ( $\delta_{\text{medio}}$  123,12). Exemplos podem ser notados no mapa de contornos HSQC para os resíduos de serina 3 e 13 e de alanina 8 e 11, sendo os sinais 13 e 11 conectados por linhas a respectivos sinais de HN no mapa de contornos NOESY (ver Figura 3.9).

Apresenta-se também, de forma extremamente útil à atribuição dos sinais de RMN, o mapa de contornos HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Devido à ampla complexidade e a sobreposições de sinais na RMN de peptídeos, tal experimento auxilia em muito nas atribuições de <sup>1</sup>H. Para a ressonância de peptídeos, a aquisição de um experimento de HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C editado (seção 1.5.7, p. 45) é extremamente útil, por possibilitar a separação de ressonâncias provenientes de carbonos metilênicos (fase negativa) das de carbonos metílicos e metínicos (fase positiva). Isso é especialmente útil em atribuições de prolínas (onde CB, CG e CD – respectivamente C $\beta$ , C $\gamma$  e C $\delta$  – são di-hidrogenados), bem como na atribuição de sinais de CB e HB de resíduos de aminoácidos, possibilitando a sub-divisão de

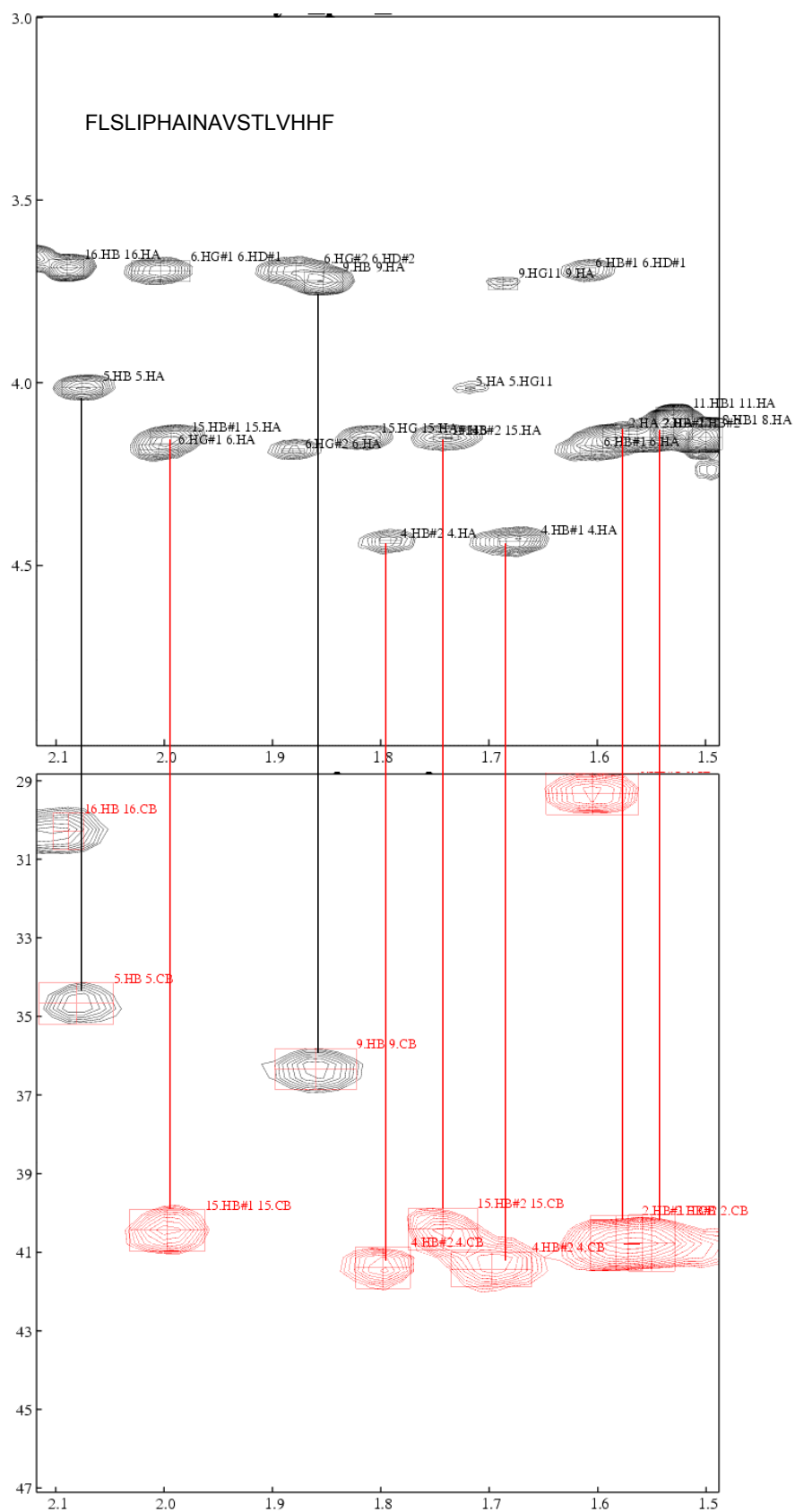


Figura 3.10–Mapas de contornos parciais TOCSY (acima) e HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (abaixo) da PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$  (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

classes de resíduos. Esse último fator se apresenta de forma extremamente útil no assinalamento dos sinais do PS-2, no qual se tem um número significativo de leucinas (três) e isoleucinas (duas). Esses dois tipos de resíduos apresentam cadeias laterais alifáticas relativamente grandes e, devido às semelhanças de deslocamentos químicos entre elas, ocorre a possibilidade de equívocos em assinalamentos prévios. Todavia, nota-se que os CB de resíduos de leucina são ligados a dois hidrogênios e irão apresentar fase negativa no HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , por outro lado, os CB de resíduos de isoleucina são ligados a apenas um H e apresentam fase positiva nesse espectro. Tem-se então uma ferramenta poderosa para se diferenciar HB desses dois tipos de resíduos. A Figura 3.10 (p.90) ilustra essa observação pela análise simultânea de expansões dos mapas de contornos TOCSY e HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Observa-se que correlações entre HB e CB das leucinas 2, 4 e 15 apresentam coloração vermelha (fase negativa), enquanto tais correlações para as isoleucinas 5 e 9 apresentam coloração preta (fase positiva). Percebe-se ainda a não equivalência magnética entre os HB dos resíduos de leucinas. Nessa Figura são ainda observadas conexões entre as correlações determinadas no HSQC com sinais dos respectivos núcleos de  $^1\text{H}$  no mapa de contornos TOCSY, tendo-se assim um ponto de partida para o assinalamento dos demais sinais dos sistemas de spin desses resíduos específicos. Conforme comentado acima, é comum a determinação de correlações inter-residuais não seqüenciais na região de impressão digital do mapa de contornos NOESY. Sabe-se também que tais correlações a “médias-distâncias”, ou seja  $d\alpha\text{N}(i,i+j)_{j=2, 3, 4}$ , podem ser fortes indicativos de estruturas secundárias características (Wüthrich, 1986). Neste trabalho foram detectadas inúmeras dessas correlações, em especial correlações do tipo  $d\alpha\text{N}(i,i+3)$ , as quais são muito comuns em fragmentos  $\alpha$ -helicoidais de peptídeos. Ressalta-se também a caracterização de  $nOe$  inter-resíduos do tipo  $d\alpha\text{N}(i,i+4)$  e  $d\beta\text{N}(i,i+1)$ . Apresenta-se a seguir (Figura 3.11, p. 92) uma expansão de parte da região de impressão digital do mapa de contornos NOESY da PS-2, onde podem ser observados alguns desses tipos de correlações provenientes de  $nOe$ .



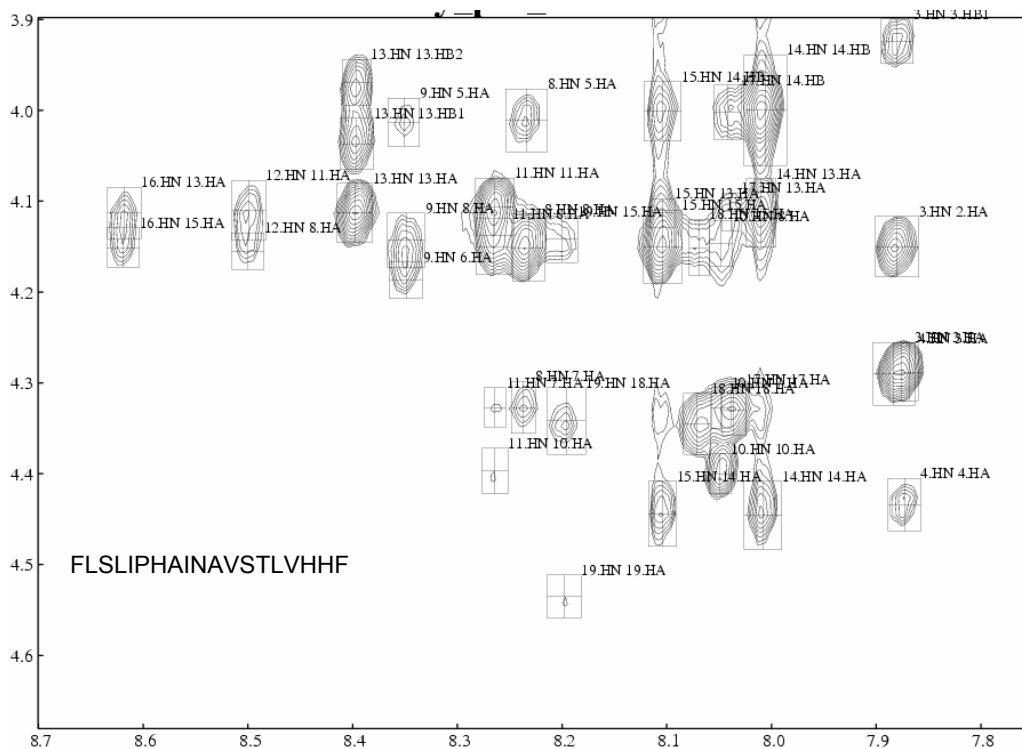


Figura 3.11 – Mapa de contornos NOESY parcial da PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

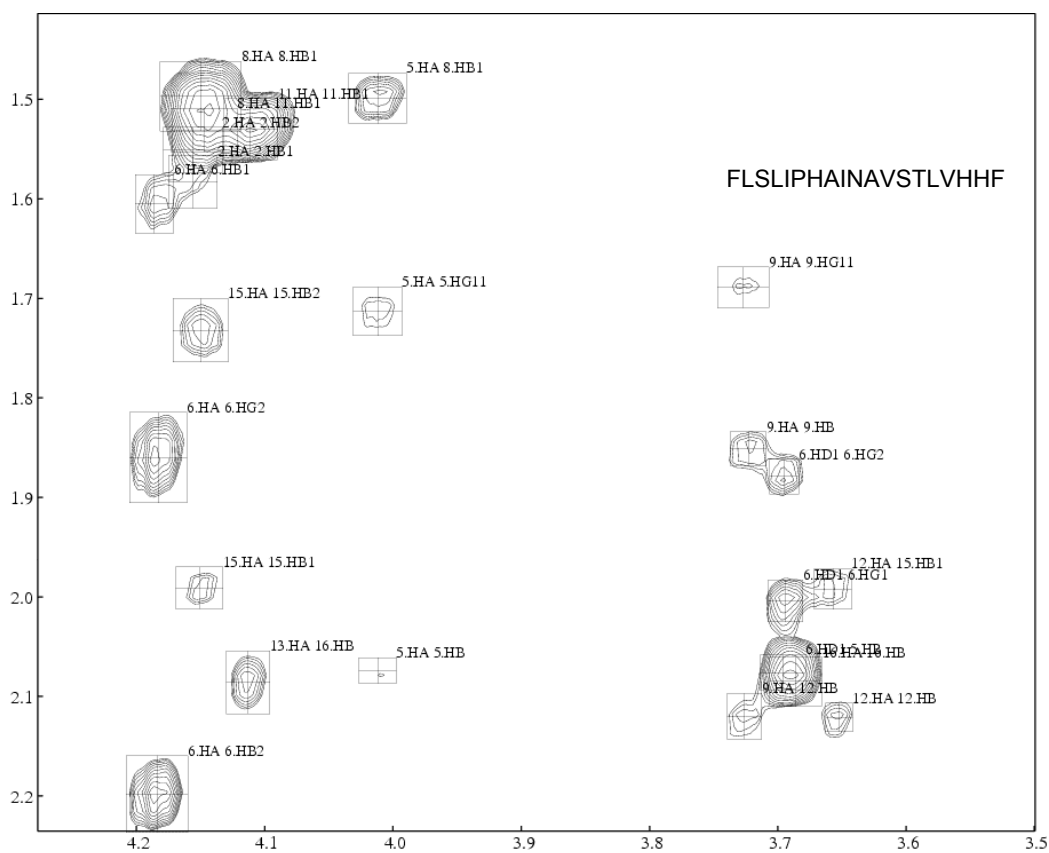


Figura 3.12 – Mapa de contornos NOESY parcial da PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

*nOes* do tipo  $d\alpha\beta(i,i+3)$  são também bem comuns a estruturas  $\alpha$ -helicoidais. Na Figura 3.12 (p. 92), algumas correlações desse tipo são observadas (e.g. 13.HA x 16HB, 8.HA x 11HB e 9.HA x 12HB).

Similares estratégias de assinalamento de ressonâncias foram empregadas nos espectros análogos obtidos para as amostras das PS-1 e PS-3. Não obstante, *nOes* clássicos de estruturas helicoidais foram observados nos mapas de contornos NOESY dessas duas amostras. A seguir são apresentadas expansões na região de ressonância dos hidrogênios amídicos dos mapas de contornos NOESY obtidos para os três peptídeos.

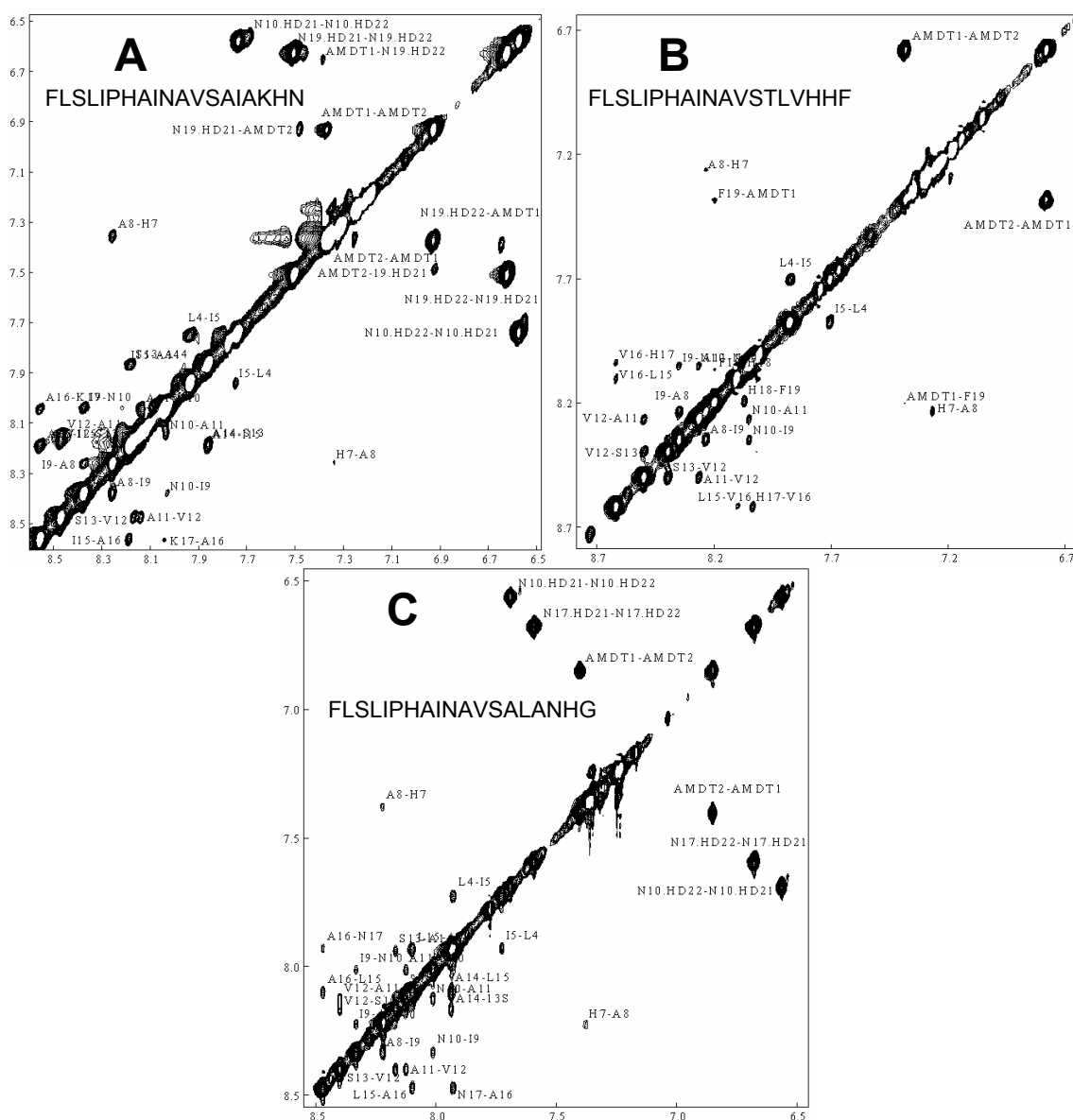


Figura 3.13 – Mapas de contornos NOESY parciais dos peptídeos a) PS-1, b) PS-2 e c) PS-3 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

O grande número de correlações observadas entre os hidrogênios amídicos nos espectros dos três peptídeos pode ser associado à alta estabilização estrutural desses compostos, uma vez que tais núcleos não se correlacionariam em espectros de peptídeos não estruturados, pois esses hidrogênios estariam envolvidos em processo de troca rápida com os hidrogênios de ligações lábeis das moléculas de solvente.

A seguir são apresentados os mapas de contornos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  obtidos para as três amostras peptídicas (Figura 3.14).

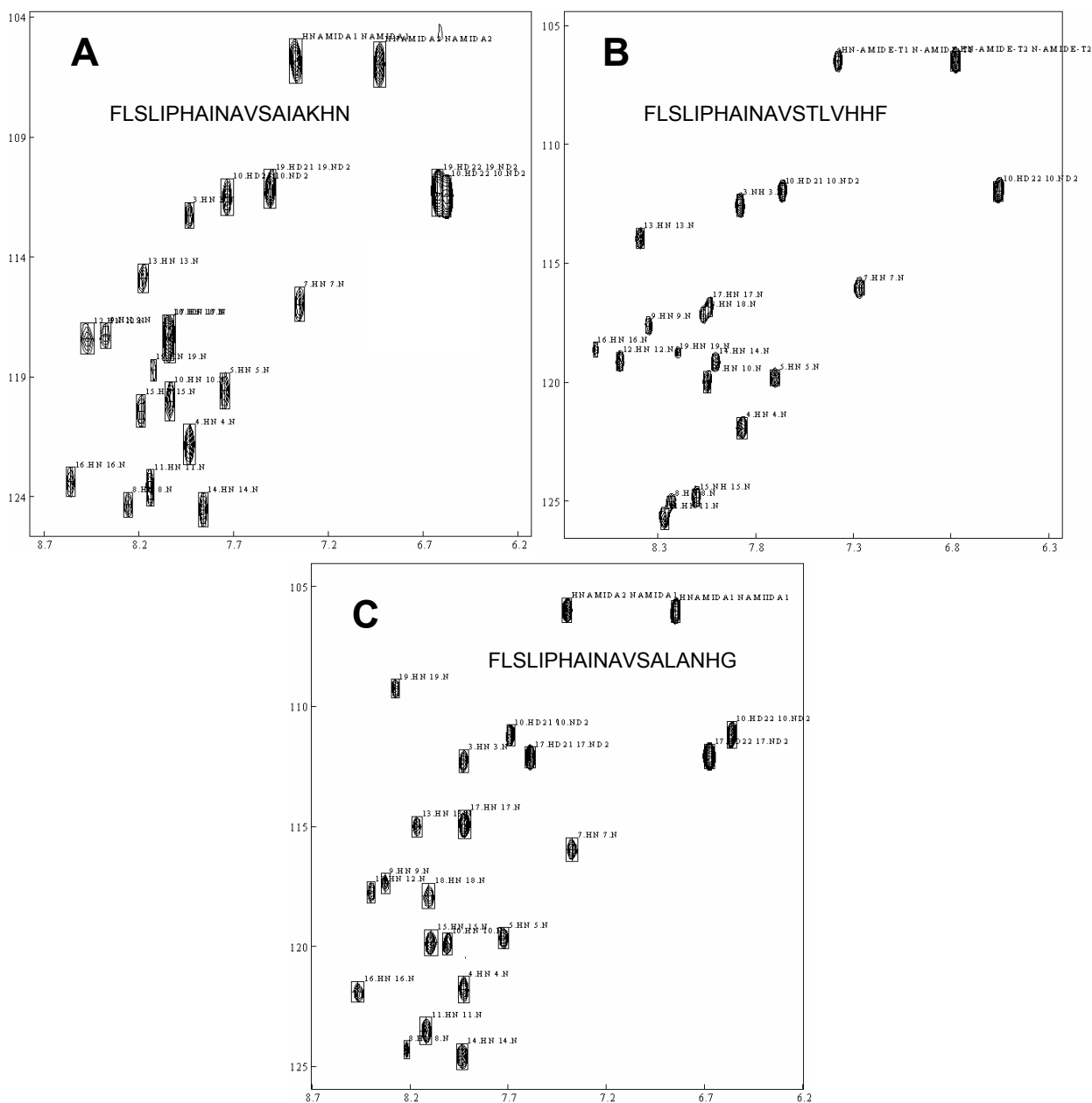


Figura 3.14 – Mapas de contornos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dos peptídeos a) PS-1, b) PS-2 e c) PS-3 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ : $\text{H}_2\text{O}$  (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

São observadas nesses espectros, correlações entre os hidrogênios amídicos e os respectivos hidrogênios entre os resíduos de aminoácidos 2 a 5 e 7 a 19. São também observadas as correlações entre os nitrogênios das amidações C-terminais e os respectivos hidrogênios, bem como correlações associadas a cadeias laterais de resíduos de asparaginas. Como o sexto resíduo de aminoácido nas três seqüências peptídicas é um resíduo de prolina, conclui-se a existência de certo ordenamento a partir do terceiro resíduo de aminoácido até a amidação C-terminal nesses peptídeos (hidrogênios amídicos em frações completamente desestruturadas estariam envolvidos em processo de troca rápida com os hidrogênios lábeis das moléculas de solvente). Não obstante, a significativa dispersão de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  observada nesses mapas de contornos é indicativa de um arranjo estrutural definido dessas moléculas (Woestenenk, 2004).

### **3.3.2 – Estrutura tridimensional dos peptídeos a partir de dados de *nOe***

Conforme discutido na seção 3.3.1, são observados no mapa de contornos NOESY dos três peptídeos várias correlações inter-residuais que indicam estruturação secundária desses compostos. Essas correlações inter-residuais são sumariadas a seguir nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 (p. 96) para os peptídeos PS-1, PS-2 e PS-3, respectivamente.

Da análise dos dados dessas Tabelas, destaca-se inicialmente a não detecção de correlações envolvendo os sinais dos HN dos resíduos 1 e 2 para os três compostos, tendo-se então um forte indício de que esses resíduos não são muito bem estruturados, uma vez que a não detecção desses sinais pode ser associada à troca rápida com o hidrogênios do solvente. Essa aparente ausência de estrutura é, até certo ponto, esperada, pois a porção amino-terminal de peptídeos, na maioria das vezes, é desestruturada, por não apresentar algumas das interações que poderiam vir a estabilizar uma estrutura secundária (como exemplo a interação do oxigênio carbonílico “i”, com o hidrogênio amídico

Tabela 3.2 – *nOes* característicos de estrutura secundária e  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  – PS-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	NH <sub>2</sub>	
	F	L	S	L	I	P	H	A	I	N	A	V	S	A	I	A	K	H	N	NH <sub>2</sub>	
NN(i, i+1)																					
$\alpha\text{N}(i, i+1)$																					
$\beta\text{N}(i, i+1)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+2)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+3)$																					
$\alpha\beta(i, i+3)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+4)$																					
$^3J_{\alpha\text{N}} / \text{Hz}$			6,0	7,5	5,0		5,5	4,8	4,9	4,9	4,6	4,8	5,8	4,8	5,8	3,8	5,8	6,7	7,4		

Tabela 3.3 – *nOes* característicos de estrutura secundária e  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  – PS-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	NH <sub>2</sub>	
	F	L	S	L	I	P	H	A	I	N	A	V	S	T	L	V	H	H	F	NH <sub>2</sub>	
NN(i, i+1)																					
$\alpha\text{N}(i, i+1)$																					
$\beta\text{N}(i, i+1)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+2)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+3)$																					
$\alpha\beta(i, i+3)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+4)$																					
$^3J_{\alpha\text{N}} / \text{Hz}$			8,6	6,8	5,2		5,6	4,2	5,0	4,5	4,0	5,2	6,0	5,0	5,7	5,8	4,8	4,8	6,9		

Tabela 3.4 – *nOes* característicos de estrutura secundária e  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  – PS-3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	NH <sub>2</sub>	
	F	L	S	L	I	P	H	A	I	N	A	V	S	A	L	A	N	H	G	NH <sub>2</sub>	
NN(i, i+1)																					
$\alpha\text{N}(i, i+1)$																					
$\beta\text{N}(i, i+1)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+2)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+3)$																					
$\alpha\beta(i, i+3)$																					
$\alpha\text{N}(i, i+4)$																					
$^3J_{\alpha\text{N}} / \text{Hz}$			7,2	6,7	5,4		5,8	5,0	4,4	4,0	5,8	4,8	4,6	4,9	5,3	4,2	7,7	7,7	6,8;	7,1	

“i+4” que estabiliza estruturas  $\alpha$ -helicoidais). Por outro lado, foram detectados alguns *nOes* inter-residuais envolvendo o segundo resíduo de aminoácido para as PS-1 e PS-2, o que sugere a existência de um pequeno ordenamento a partir desse resíduo.

Para as PS-1 e PS-2 são observadas, em contrapartida, inúmeras correlações de *nOe* envolvendo os resíduos próximos à extremidade C-terminal (resíduos 18 e 19) e inclusive, no caso da PS-2, correlações envolvendo os hidrogênios da amidação C-terminal são observadas, o que sugere um alto grau de estruturação nessa porção terminal dessas moléculas. Por outro lado, a PS-3 se mostra bem menos estruturada nas proximidades da fração C-terminal, pois nenhum *nOe* característico de estrutura secundária é detectado para os resíduos 18 e 19.

No caso da PS-2, inúmeros *nOes* característicos de estruturas secundárias, em especial característicos de estruturas  $\alpha$ -helicoidais ( $\alpha\text{N}(i,i+3)$ ,  $\alpha\beta(i,i+3)$  e  $\alpha\text{N}(i,i+4)$ ) (Wüthrich, 1986), são observados entre os resíduos 5 e 19 e para os hidrogênios da amidação C-terminal, tendo-se assim fortes indícios da existência de uma estrutura helicoidal nesse segmento (resíduo 5 à amidação C-terminal). Na porção de resíduos de aminoácidos entre 3 e 4, tem-se também determinação e alguns padrões de *nOe*, o que parece indicar um certo grau de ordenamento, todavia tais padrões se apresentam em menor proporção que na fração 5-19.

Deve-se também prestar atenção à existência de um resíduo de prolina nas posições 6 das seqüências primárias dos três peptídeos, um vez que é bem conhecido o fato de que esse resíduo tende a desestabilizar estruturas helicoidais (Nelson & Cox, 2004), de modo que é necessário se ter uma maior cautela em qualquer afirmação prévia sobre a estruturação entre os resíduos 3 e 6 nas três seqüências peptídicas.

No caso da PS-1, vários *nOes* característicos de estruturas helicoidais são observados entre os resíduos 5 e 19, entretanto a ausência de correlações inter-residuais envolvendo os hidrogênios da amidação C-terminal parece indicar uma menor estruturação nessa fração da molécula em comparação com a PS-2. Para a PS-3, *nOes* característicos de estruturas helicoidais são encontrados

principalmente entre os resíduos 5 e 15, o que sugere uma estruturação significativamente menor desse peptídeo.

Com o objetivo de fundamentar os pontos acima discutidos (esses baseados em dados de  $nOe$ ), foi construída a Figura 3.15 que apresenta os valores das diferenças entre os deslocamentos químicos experimentais dos carbonos- $\alpha$  e os deslocamentos químicos análogos para os respectivos resíduos em seqüências peptídicas não estruturadas (Wishart *et al.*, 1992). Os valores positivos obtidos entre o quinto e o décimo oitavo resíduos de aminoácido, sugerem que a PS-1 e a PS-2 (Figura 3.15a e b, respectivamente) possuem fragmentos helicoidais nesse intervalo, enquanto que, os valores positivos obtidos entre o quinto e o décimo quinto resíduo de aminoácidos indicam um fragmento helicoidal bem inferior para a PS-3 (Figura 3.15c). Esses resultados estão em pleno acordo com os dados de  $nOe$  apresentados nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 (p. 96).

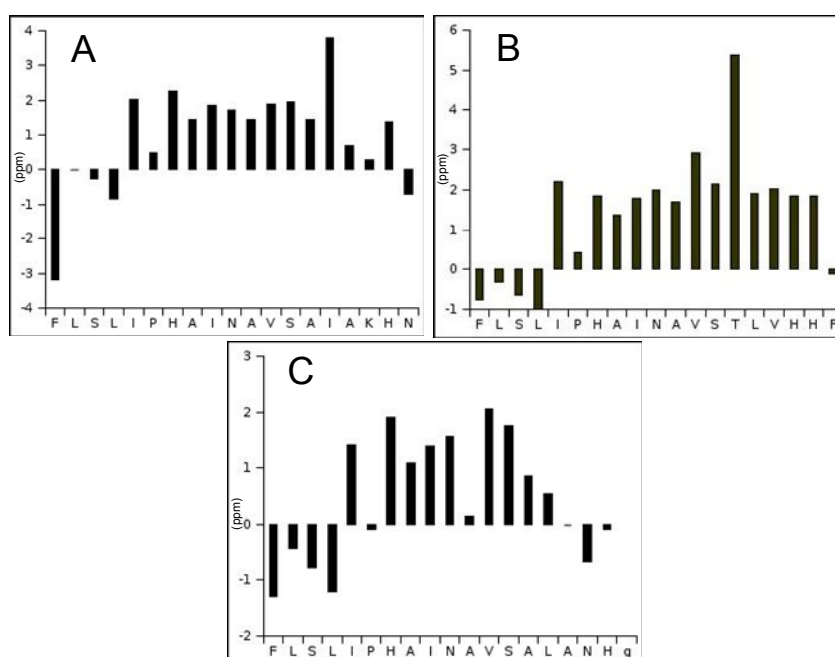


Figura 3.15 – Diferenças entre deslocamentos químicos de carbonos- $\alpha$  experimentais e deslocamentos químicos padrões de carbonos- $\alpha$  de peptídeos não estruturados: a) PS-1, b) PS-2 e c) PS-3.

São ainda apresentados nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 (p. 96), os valores das constantes de acoplamento escalar  $^3J_{HN-H\alpha}$  obtidas nos espectros de DQF-COSY das filoseptinas. Os valores menores que 6 Hz, obtidos para as PS-1 e PS-

2 entre os resíduos 5 e 18, e para a PS-3 entre os resíduos 5 e 16 são indicadores extra de possíveis arranjos helicoidais nesses segmentos (Wüthrich, 1986).

Conforme discutido na seção experimental, os picos cruzados de *nOe* tiveram suas intensidades convertidas em restrições de geometria, as quais foram empregadas em um processo de *annealing* simulado no cálculo das estruturas dos peptídeos. A Figura 3.16 apresenta a sobreposição das dez estruturas mais estáveis obtidas para as filoseptinas pelo procedimento de *annealing* simulado.

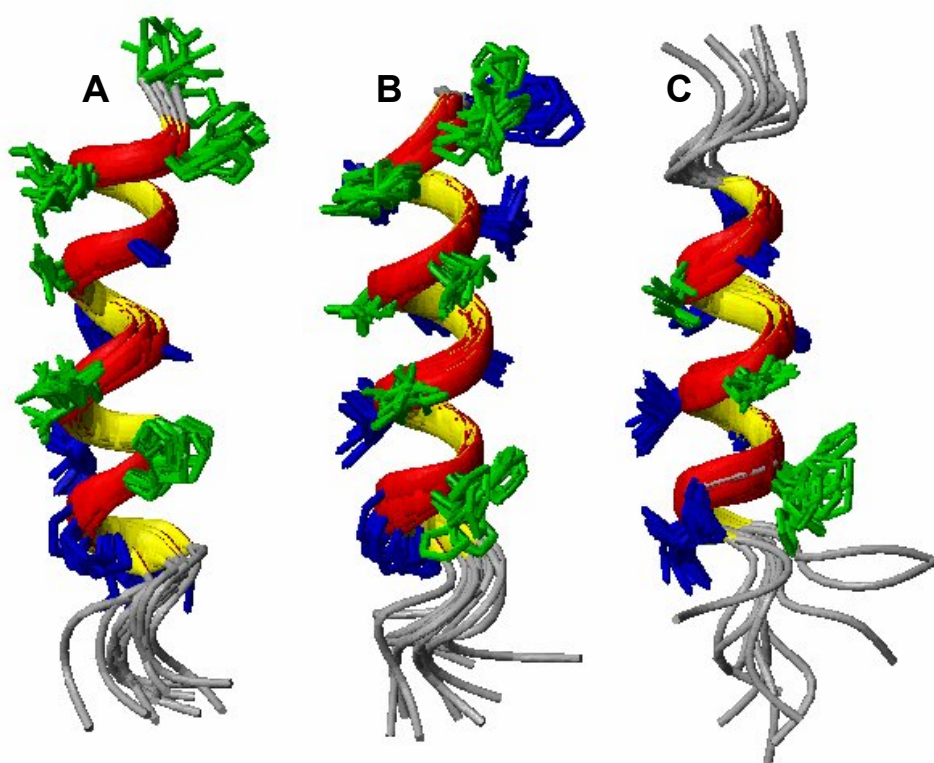


Figura 3.16 – Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para soluções dos peptídeos a 4,0 mM em TFE- $d_2$ /H $_2$ O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM. *a*) PS-1 (sobreposição dos resíduos 5 a 19), *b*) PS-2 (sobreposição dos resíduos 5 a 19) e *c*) PS-3 (sobreposição dos resíduos 5 a 15). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A fração N-terminal aponta para a parte inferior da Figura.

As estruturas tridimensionais apresentadas na Figura 3.16 estão em pleno acordo com os dados de *nOe* e deslocamentos químicos obtidos para os peptídeos (ver discussão acima). Os cálculos estruturais confirmaram que a PS-1 e a PS-2 realmente exibem um maior grau de estrutura helicoidal que a PS-3.



Os segmentos helicoidais se estendem entre os resíduos 5-18 para a PS-1, 5-19 para a PS-2 e 5-15 para a PS-3, o que corresponde a teores helicoidais de 74%, 79% e 58% respectivamente. Esses valores estão em excelente acordo com os resultados obtidos pelas análises de CD realizadas em condições similares (70%, 78% e 53%, respectivamente – ver seção 3.2, p. 82). Não obstante, conforme se concluiu pelas análises dos *nOes*, os resíduos 3 e 4 apresentam certo arranjo estrutural (classificados como *bent* e *turn*, respectivamente) na PS-1 e na PS-2 e o resíduo 4 (*turn*) na PS-3.

As sobreposições das estruturas apresentadas na Figura 3.16 indicam de forma notável que os três peptídeos apresentam estruturas fortemente anfipáticas. Esse efeito é mais pronunciado para a PS-2, na qual todos os resíduos polares da estrutura helicoidal são encontrados em uma face da hélice, sendo a face oposta composta exclusivamente por resíduos apolares. Quando comparada ao PS-2, a PS-1 é menos anfipática devido à substituição da Thr-14 por um resíduo de alanina na face polar da hélice. De forma similar, a Phe-19 (hidrofóbica), alojada na face apolar da PS-2, é substituída por um resíduo de asparagina (hidrofílica) na posição C-terminal da PS-1. Curiosamente, a PS-2 possui *nOes* característicos de estruturas helicoidais adicionais envolvendo os hidrogênios da amidação C-terminal (Tabela 3.3, p. 96), indicando portanto que o décimo nono resíduo é parte do segmento helicoidal. Tais *nOes* não são observados para a PS-1 (Tabela 3.2, p. 96), podendo essa quebra da hélice na posição 19 da PS-1 estar associada ao rompimento da anfipaticidade nesse ponto.

A seguir é apresentada a Figura 3.17, na qual é sumariada a análise da qualidade estereoquímica dos resíduos de aminoácidos das três cadeias peptídicas. A grande maioria dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  está localizada nas “regiões mais favoráveis” e nas “regiões adicionalmente favoráveis” do diagrama de Ramachandran<sup>Δ</sup>, o que confirma a boa qualidade das estruturas calculadas.

---

<sup>Δ</sup> O diagrama de Ramachandran define as conformações peptídicas em função dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  resultantes das rotações dos planos de ligações peptídicas em torno dos  $C\alpha$  (ligações  $N-C\alpha$  e  $C\alpha-C$ , respectivamente). As diferentes regiões presentes nesse diagrama representam conjuntos de pares angulares associados à seguinte ordem decrescente de repulsão estérica: “regiões proibidas”, “regiões generosamente favoráveis”, “regiões adicionalmente favoráveis”, e “regiões mais favoráveis”, (Nelson & Cox, 2004; Doreleijers, 1999; Laskowski *et al.*, 1996).

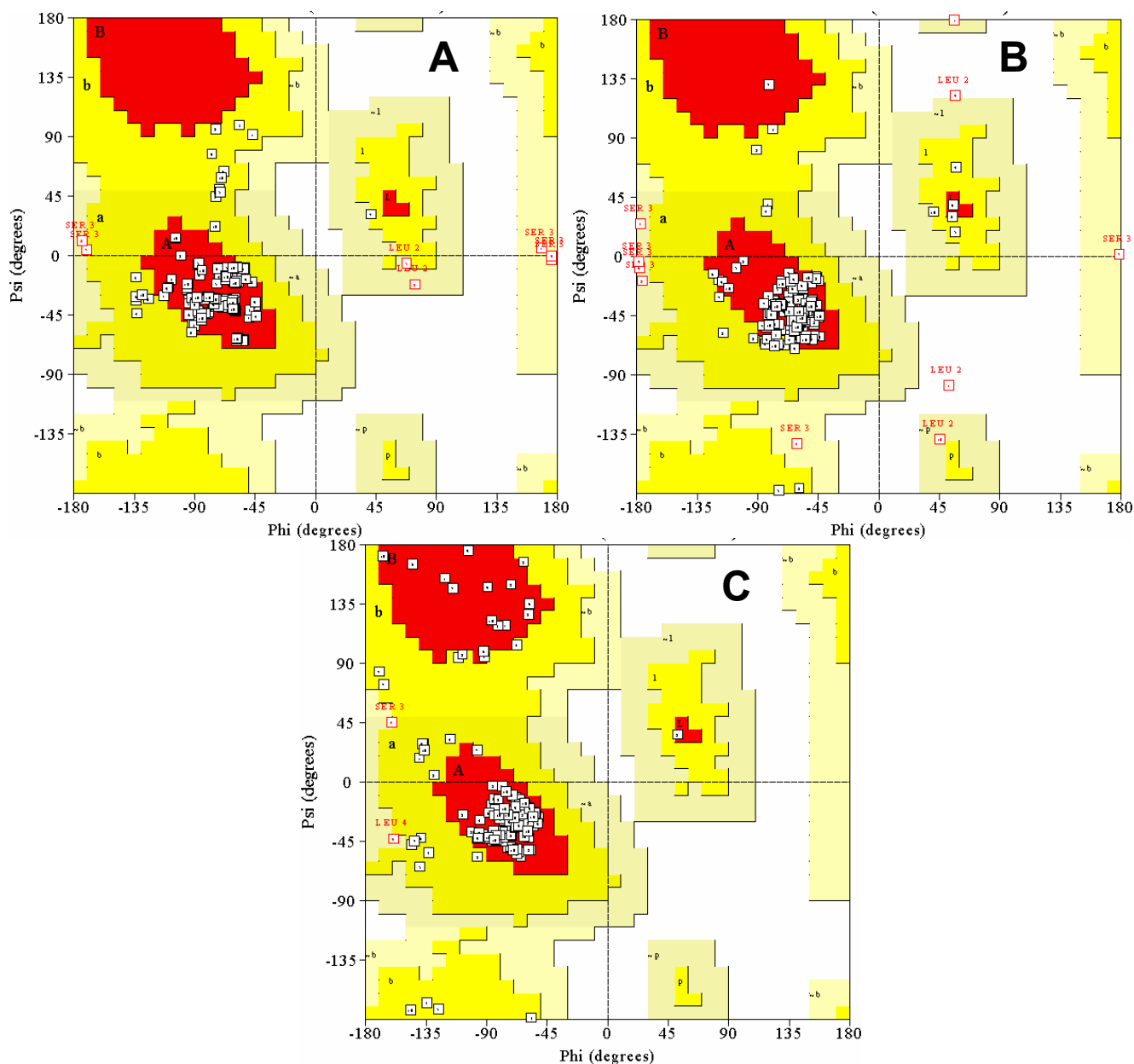


Figura 3.17 – Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis dos peptídeos a) PS-1, b) PS-2 e c) PS-3. “Regiões mais favoráveis” em vermelho, “regiões adicionalmente favoráveis” em amarelo, “regiões generosamente favoráveis” em bege e “regiões proibidas em branco”. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996).

Dentre todos os resíduos de aminoácidos analisados para as dez estruturas de cada um dos peptídeos, apenas a PS-2 apresentou 1,2 % dos resíduos em regiões proibidas do diagrama de Ramachandran. Entretanto esse valor é muito pequeno e essa violação, não obstante, pode ser explicada devido a essa fração se tratar de dois resíduos de Leu-2, ou seja, tem-se a violação em uma porção

definitivamente não estruturada do peptídeo em apenas duas das dez geometrias mais estáveis obtidas.

As estatísticas das análises estruturais das filoseptinas 1, 2 e 3 são sumariadas a seguir na Tabela 3.5. Os valores de RMSD (desvio padrão quadrático médio) obtidos para todos os peptídeos são indicadores de considerável flexibilidade conformacional, todavia esses valores diminuem significativamente quando apenas os segmentos helicoidais são considerados

Tabela 3.5 – Sumário da estatística estrutural dos peptídeos PS-1, PS-2 e PS3 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H<sub>2</sub>O (60%:40%) a 20°C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM

Peptídeo	PS-1	PS-2	PS-3
Número total de restrições de distância	197	193	179
Número de restrições intra-residuais	116	115	116
Número de restrições seqüenciais (i,i+1)	47	46	41
Número de restrições a médias distâncias (i,i+j) <sub>j=2,3,4</sub>	34	32	22
RMSD (Å) – todos os resíduos <sup>a</sup>			
Esqueleto	1,02	1,38	2,12
Esqueleto e átomos pesados	1,84	2,31	3,15
RMSD (Å) – segmento helicoidal <sup>a, b</sup>			
Esqueleto	0,63	0,75	0,63
Esqueleto e átomos pesados	1,22	1,32	1,07
Análise do diagrama de Ramachandran <sup>c</sup>			
Resíduos em regiões mais favoráveis	80,0	77,5	85,0
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	15,6	16,2	13,8
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	4,4	5,0	1,2
Resíduos em regiões proibidas	0,0	1,2	0,0

a – valores de RMSD obtidos com uso do programa MOLMOL

b – da I-5 à N-19 para o PS-1, da I-5 à F-19 para o PS-2, da I-5 à L-15 para o PS-3.

c – resultados obtidos com uso do programa PROCHECK\_NMR

Os estudos de dicroísmo circular (seção 3.2, p. 79) e de RMN em solução indicaram que as filoseptinas 1, 2 e 3 não possuem estruturas definidas em soluções aquosas, mas adotam conformações helicoidais em ambientes de membranas. Transições estruturais similares já foram observadas para outros peptídeos catiônicos lineares (Hwang & Vogel, 1998; Bechinger *et al.*, 1993; Holak *et al.*, 1988; Marion *et al.*, 1988) e, portanto, esse comportamento, bem como as propriedades estruturais das filoseptinas 1, 2 e 3, estão de acordo com modelos prévios que descrevem as interações com membranas e as atividades

biológicas de peptídeos antimicrobianos catiônicos (Zasloff, 2002; Huang, 2000; Bechinger, 1999; Shai, 1999; Matsuzaki, 1998). As estruturas helicoidais desses peptídeos possuem forte caráter anfipático, que permite que esses compostos se particionem de maneira eficiente na interface da membrana. Dessa forma tais compostos podem exercer atividades desestabilizadoras e de formação de poros na membrana (Bechinger & Lohner, 2006; Zasloff, 2002; Shai, 1999). Os peptídeos se encontram em processo de troca entre a solução aquosa e a membrana e interações eletrostáticas ajudam a aumentar a associação do peptídeo com as bicamadas fosfolipídicas ácidas da membrana (Bechinger, 2004; Kuchinka & Seelig, 1989; Matsuzaki *et al.*, 1989).

Apesar da considerável similaridade entre as seqüências peptídicas, consideráveis diferenças são observadas com relação à propensão de formação de hélices nas porções próximas às extremidades C-terminais dos três peptídeos (Figura 3.16, p. 99). As estruturas tridimensionais obtidas a partir dos dados de RMN em solução indicam segmentos helicoidais envolvendo os resíduos 5 a 18 para a PS-1, 5 a 19 para a PS-2 e 5 a 15 para a PS-3, o que corresponde a teores de hélice de 74%, 79% e 58%, respectivamente. Os resultados de CD obtidos a 60% de TFE (seção 3.2, p. 81) apresentam excelente concordância com esses resultados. A formação de hélices em vesículas unilamelares pequenas (seção 3.2) mostram a mesma tendência, ou seja,  $PS-2 \geq PS-1 > PS-3$ . Portanto, as estruturas dos peptídeos associados a membrana são bem representadas pelas misturas de TFE/H<sub>2</sub>O e, principalmente, as diferenças das propensões à formação de hélice das três filoseptinas são mantidas nesse meio.

As principais diferenças entre a estrutura da PS-3 e às das PS-1 e PS-2 são certamente notadas nas porções C-terminais, o que é correlacionado com as diferenças entre as três seqüências primárias que se iniciam a partir do décimo quarto resíduo. Quando a composição de aminoácidos entre os resíduos 14 e 19 é considerada, o caráter hidrofóbico da PS-1 e da PS-3 são bastante similares, mas, por outro lado, o caráter hidrofóbico da PS-2 é bem mais pronunciado (White & Wimley, 1999). Entretanto, quando os resíduos de aminoácidos capazes de sustentar uma carga positiva (integral ou parcial) em pH fisiológico são levados

em conta, uma melhor correlação com os dados estruturais é obtida. Enquanto a PS-3 possui apenas um único resíduo desse tipo no intervalo 14-19 (His-18), dois resíduos são encontrados para a PS-1 (Lys-17 e His-18) e a PS-2 (His-17 e His-18). Essa observação sugere que interações eletrostáticas entre essas cadeias laterais catiônicas e o momento de dipolo negativo resultante na porção C-terminal promovem o arranjo helicoidal nessas extremidades dos peptídeos. Esse efeito é menos pronunciado para a PS-3, que possui um resíduo polar (mas não carregado) de Asn na posição 17. Os deslocamentos químicos de H2 e H4 da histidina 18 da PS-2 (Figura 3.18) possuem valores intermediários, o que sugere a protonação parcial dessas cadeias a pH 7,0 (Aisenbrey *et al.*, 2006; Sadler & Tucker, 1993; Markley, 1975). Alguns estudos existentes na literatura mostram que interações do dipolo da hélice com cadeias laterais positivamente carregadas (em especial histidinas) posicionadas em posições próximas a extremidade C-terminal possuem propriedades estabilizadoras de hélices (Armstrong & Baldwin, 1993; Caffrey & Cusanovich, 1991; Carver & Collins, 1990).

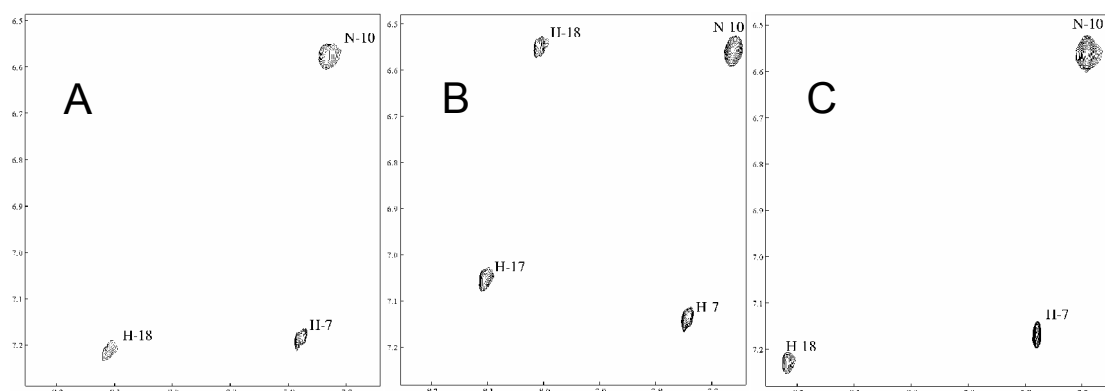


Figura 3.18 – Expansões dos mapas de contornos TOCSY da PS-1 (a), PS-2 (b) e PS-3 (c) mostrando as regiões de deslocamento químico de dos núcleos de H2 e H4 de cadeias laterais de histidinas. Peptídeos a 4,0 mM em TFE- $d_2$ :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

A proximidade entre as cadeias laterais dos resíduos de His-18–Phe-19 obtidas nas estruturas calculadas da PS-2 (Figura 3.16b, p. 99), sugerem que outras interações estabilizadoras de hélice nesse peptídeo sejam provenientes de *stacking* aromático entre esses três resíduos (McGaughey, *et al.*, 1998). A blindagem aromática do resíduo de His-18 da PS-2 (Figura 3.18, p. 104) é clara

quando o deslocamento químico do H4 é considerado (apesar do deslocamento químico de H2 indicar nitidamente estado parcial de protonação). O aumento significativo do deslocamento químico do C $\alpha$  do resíduo de Thr-14 da PS-2 (Figura 3.15b, p. 98) provavelmente é originário da proximidade entre esse resíduo e a cadeia lateral aromática do resíduo de His-17 (Figura 3.16b, p. 99). Sabe-se de situações onde interações do tipo cátions-aromáticos e aromáticos-aromáticos fornecem significativas contribuições energéticas para estabilização de estruturas helicoidais (Bhattacharyya *et al.*, 2002; Butterfield *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2001), embora detalhes sobre como essas cadeias aromáticas interagem entre si sejam ainda temas em discussão (Chelli *et al.*, 2002; McGaughey, *et al.*, 1998; Sun & Bernstein, 1996). Embora várias restrições de *nOe* tenham indicado a proximidade entre as cadeias laterais aromáticas dos resíduos de His-18 e Phe-19 na PS-2, essas restrições não foram suficientes para determinar se essas cadeias laterais interagem via um arranjo de forma-T ou paralelo (Chelli *et al.*, 2002), ou ainda, se há um equilíbrio conformacional entre esses dois tipos de estruturas. Esses tipos de arranjos foram observados em algumas das geometrias mais estáveis da PS-2 obtidas via rotina de *annealing* simulado, conforme mostrado a seguir na Figura 3.19 (p. 106).

Devido à diferente composição de aminoácidos, interações aromáticas são consideravelmente bem menos importantes na estabilização estrutural da PS-1 que na PS-2. Dessa forma, outro tipo de interação deve exercer papel importante na estabilização da fração C-terminal do PS-1. Quando a seqüência da PS-1 é analisada em detalhes, observa-se que os resíduos entre as posições 14 e 19, se encontram em posições propícias para *capping* de hélice, ou seja, esses resíduos se dispõem de maneira apropriada, tal que eles apresentam alta “frequência normalizada de posições de resíduos”, quando se considera a His-18 em posição de *capping* segundo definições de Aurora e Rose (Aurora & Rose, 1998)<sup>Δ</sup>. Esse arranjo de *capping* apresenta os resíduos AIAKHN, dispostos nas posições

---

<sup>Δ</sup> Segmentos de *capping* de hélice são seqüências de resíduos de aminoácidos envolvidos em padrões específicos de interações (normalmente hidrofóbicas ou de ligação de H) nas extremidades de hélices peptídicas. A “frequência normalizada de posições de resíduos” desses segmentos indica a incidência estatística relativa de um tipo de resíduo em uma determinada posição do segmento de *capping*.

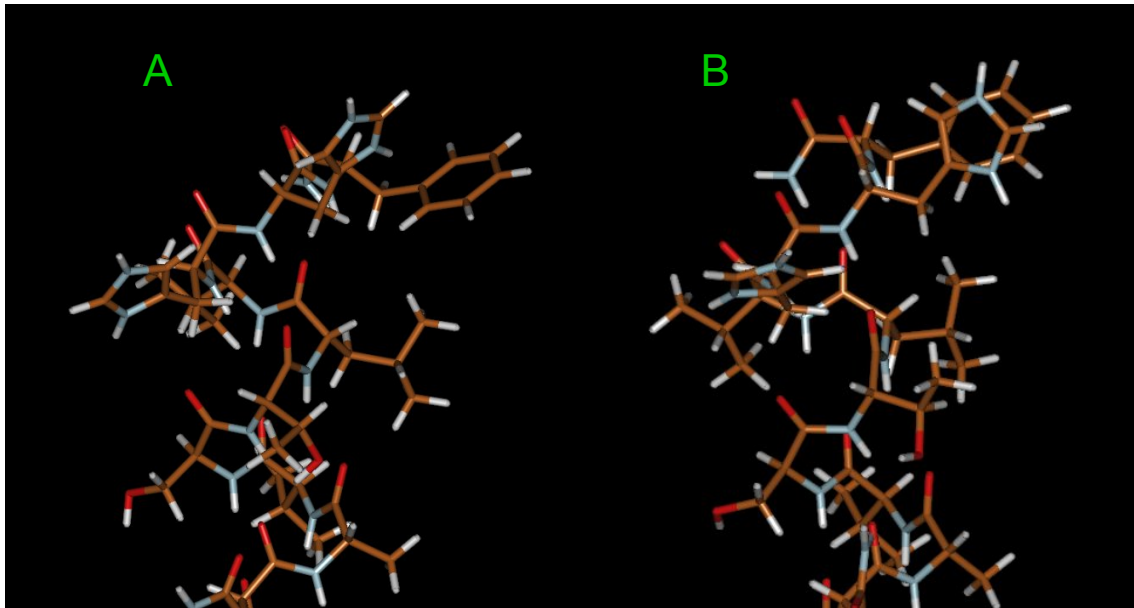


Figura 3.19 – Duas das dez estruturas mais estáveis obtidas via *annealing* simulado para a PS-2 a 4,0 mM em TFE- $d_2$ /H $_2$ O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM. Interações estabilizadoras entre cadeias laterais dos resíduos de His-18 e Phe-19 via arranjos em *a*) forma-T e *b*) paralelo.

$C_4C_3C_2C_1C_C C'$ , onde:  $C_C$  (His-18) representa a posição da ponte da porção C-terminal da hélice,  $C'$  o resíduo seguinte que não pertence à hélice (Asn-19),  $C_1$  o resíduo interno à hélice mais próximo (Lys-17) à posição de *capping*,  $C_2$  o segundo resíduo interno à hélice (Ala-16),  $C_3$  o terceiro resíduo interno à hélice (Ile-15) e  $C_4$  o quarto resíduo interno à hélice (Ala-14) (Aurora & Rose, 1998). Sabe-se que resíduos de asparagina desempenham importante papel em estruturas de *capping* de hélice devido a interações de ligação de hidrogênio entre os hidrogênios amídicos da cadeia lateral e os oxigênios carbonílicos da estrutura peptídica helicoidal. A asparagina se mostra bem localizada na posição  $C'$ , pois esse tipo de interação irá estabilizar principalmente os resíduos de fronteira da estrutura helicoidal do segmento de *capping*. Na realidade resíduos de asparagina encontram na posição  $C'$  sua mais alta “frequência normalizada de posições de resíduos” em segmentos de *capping* de hélice (Aurora & Rose, 1998). Também se sabe que resíduos de histidina em posições  $C_C$  exercem efeitos estabilizadores.

Outro fator que parece contribuir para a estruturação helicoidal peptídica em posições próximas à porção C-terminal é a amidação natural da porção ácida desses peptídeos. Esse efeito é claro para a PS-2, onde a detecção de correlações

de *nOe* entre os hidrogênios da amidação C-terminal e o H $\alpha$  da Val-16 (Tabela 3.3, p. 96) sugerem a existência de ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila do resíduo 16 com os hidrogênios do grupo amida na posição C-terminal. Não obstante, essa amidação da porção C-terminal da PS-1 leva a possibilidades extras de ligação de hidrogênios que podem provocar a estabilização por *capping* de hélice via ligações de hidrogênio (de forma similar a resíduos de asparagina em C<sub>C</sub> – ver discussão acima). Em trabalhos prévios, encontram-se vários relatos onde interações de ligação de hidrogênio desempenham importante papel na estabilização de estruturas helicoidais, incluindo histidinas (Armstrong & Baldwin, 1993), prolinas (Prieto & Serrano, 1997) e várias estruturas de *capping* de hélice (Aurora & Rose, 1998).

A amidação artificial na posição C-terminal de peptídeos com terminações carboxílicas tem levado à promoção da atividade de peptídeos antimicrobianos catiônicos (Katayama *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2001), provavelmente devido à neutralização da carboxila ácida (substituição da carboxila negativamente carregada por um grupo amídico sem carga). A remoção da carga negativa na porção C-terminal leva claramente a duas conseqüências e ambas promovem a atividade antimicrobiana. Primeiramente, a carga negativa iria resultar na desestabilização da conformação helicoidal, devido a interações repulsivas com o dipolo negativo em C-terminal. Em segundo lugar, a atividade antimicrobiana é intensificada devido ao aumento da carga positiva total da molécula, que promove interações com a superfície com carga negativa da bactéria (Mason *et al.*, 2005; Bechinger, 2004; Dathe *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1989).

Em suma, interações eletrostáticas entre as cargas positivas de resíduos de lisina e histidina com o dipolo da hélice (PS-1  $\geq$  PS-2 > PS-3), bem como ligações de hidrogênio e interações de *stacking* adicionais (diferentes para a PS-1 e a PS-2) determinam os detalhes da estabilidade estrutural e da terminação helicoidal desses peptídeos. A estabilidade helicoidal é maior para a PS-2, onde a hélice estende à carboxamida. Esse resultado está em acordo com estudos prévios sobre estabilidades de estruturas helicoidais, nas quais interações eletrostáticas são um importante fator, mas, não obstante, múltiplas interações adicionais



fornece contribuições energéticas não negligenciáveis à estabilidade de estruturas de hélice secundárias (Shi *et al.*, 2001; Armstrong & Baldwin, 1993).

### **3.4 – Experimentos de RMN em fase sólida**

#### **3.4.1 – Alinhamento das bicamadas lipídicas**

Com a finalidade de se obterem informações sobre a ação das filoseptinas quando em contato com membranas, incorporaram-se os peptídeos sintetizados em bicamadas lipídicas orientadas, conforme descrito na seção 2.5.1 (p. 64). Foram então realizados experimentos de RMN de  $^{31}\text{P}$  (seção 2.5.2, p. 65) com o objetivo de investigar o grau de orientação das bicamadas lipídicas de POPC após adição dos peptídeos. Em uma etapa preliminar, amostras de bicamadas lipídicas contendo 10,0 mg de lipídio e peptídeos a concentrações de 0,0 mol%, 0,5 mol%, 1,0 mol%, e 2,0 mol % foram preparadas e os experimentos de  $^{31}\text{P}$  realizados. Os resultados obtidos para os três peptídeos foram bastante similares e os espectros registrados para as amostras da PS-2 incorporada em bicamadas lipídicas são apresentados na Figura 3.20 (p. 109).

Devido às propriedades anisotrópicas do deslocamento químico (Stejskal & Memory, 1994), a frequência de ressonância de  $^{31}\text{P}$  indica diretamente o alinhamento das moléculas de fosfolipídio com relação à direção do campo magnético externo. Para bicamadas lipídicas de POPC, ressonâncias em torno de 30 ppm são observadas quando se tem o eixo principal das moléculas de fosfolipídios alinhado paralelamente à direção de  $B_0$ . Esse sinal se move para deslocamentos químicos próximos a -15 ppm, à medida que a amostra tem sua orientação invertida por até  $90^\circ$  (Seelig, 1978). Observa-se, para todos os espectros da Figura 3.20, um único sinal intenso em torno de 30 ppm, o que confirma uma excelente orientação das bicamadas lipídicas para concentrações de PS-2 entre 0,0 a 2,0 mol%, conforme indicado na Figura 3.21 (p. 109). Esse alto grau de orientação é confirmado pelo experimento de controle (0,0 mol% de peptídeo).

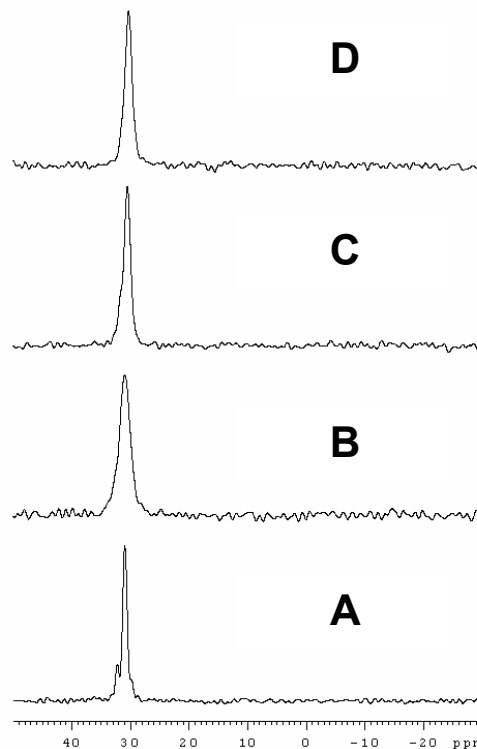


Fig. 3.20 – Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de bicamadas lipídicas de POPC. 10,0 mg de lipídio (pH 5,5; 93% de umidade) para concentrações de PS-2 a *a*) 0,0 mmol%, *b*) 0,5 mmol%, *c*) 1,0 mmol% e *d*) 2,0 mmol%. Medidas feitas para a normal da membrana paralela a  $B_0$ .

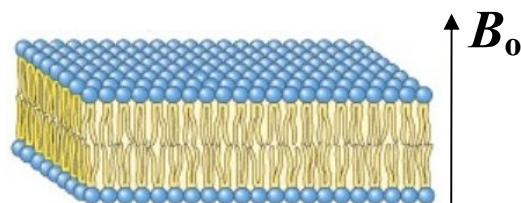


Figura 3.21 – Bicamada formada por moléculas de lipídeos orientadas com o eixo principal paralelo ao campo magnético externo.

Em situações em que se objetiva o trabalho com amostras de peptídeos orientados em bicamadas lipídicas, o conhecimento a respeito do respectivo grau de orientação da bicamada para diferentes razões peptídeo-lipídio é crucial antes da realização de outras medidas de RMN como, por exemplo, experimentos de polarização cruzada. Tal conhecimento é importante, pois normalmente se está procurando uma propriedade anisotrópica de RMN nesses sistemas, como o deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  (Bechinger & Sizun, 2003). Portanto, é

necessário se ter uma noção do grau de orientação da bicamada para as determinadas condições de uma amostra na qual se deseja realizar outras medidas de RMN mais complexas e mais demoradas. Como a RMN de  $^{31}\text{P}$  é bastante sensível, as medidas podem ser realizadas em poucos minutos com apenas 10 mg de lipídio, de tal maneira que esse tipo de teste sobre o grau de ordenamento da bicamada é bastante útil para fins práticos. São gastos pouca quantidade de lipídio e peptídeo para se estabelecer as condições nas quais as medidas de parâmetros da RMN envolvendo núcleos menos sensíveis devem ser detectadas. Além do mais, em experimentos de RMN de  $^{31}\text{P}$ , estamos realizando medidas apenas para moléculas de lipídio, de forma que peptídeos sem marcação isotópica (ou seja, compostos mais baratos) podem ser empregados nessas análises. Em contrapartida, no caso de medidas menos sensíveis (como  $^{15}\text{N}$ ), é necessário se trabalhar com maiores quantidades de amostra e, não obstante, marcações isotópicas são, via de regra, requeridas.

Uma vez que, no presente estudo, os espectros registrados para concentrações de peptídeo a 1,0 mol% indicaram um alto grau de orientação da bicamada, decidiu-se pela preparação de amostras contendo 200 mg de lipídio para essa concentração de peptídeo, todavia peptídeos isotopicamente marcados com  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$  foram usados nessas preparações (seção 2.5.1, p. 64). Os espectros de  $^{31}\text{P}$  obtidos para as amostras das três filoseptinas incorporadas em bicamadas lipídicas são apresentados na Figura 3.22 (p. 111). Um intenso sinal próximo a 30 ppm é observado nos espectros das três amostras, o que indica um alto grau de orientação dessas bicamadas. Entretanto, um sinal com baixa intensidade é observado em deslocamentos químicos próximos a -15 ppm, o que indica uma pequena componente de lipídios não alinhada e/ou alguma mudança conformacional das cabeças polares dos fosfolipídios (Bechinger, 1999; Seelig, 1978). Apesar dessas pequenas frações não orientadas, um alto grau de orientação é observado para essas amostras, indicando que elas são apropriadas para outras medidas de RMN, das quais se esperam obter informações sobre orientação e comportamento dos peptídeos nas bicamadas lipídicas.

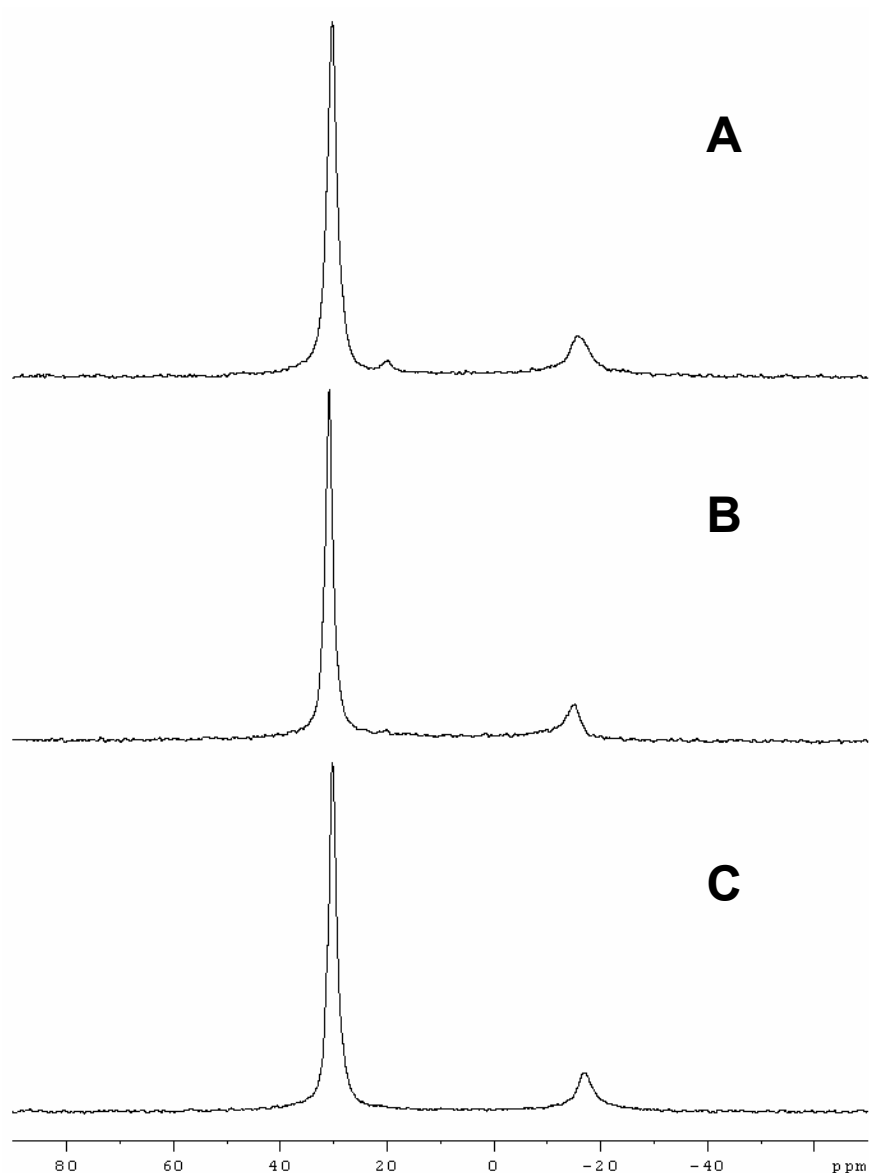


Figura 3.22 – Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  das bicamadas lipídicas de POPC. 200,0 mg de lipídio (pH 5,5; 93% de umidade) para *a*) PS-1, *b*) PS-2 e *c*) PS-3 a 1,0 mol%. Medidas feitas para a normal da membrana paralela a  $B_0$ .

Curiosamente, apesar de se trabalhar com uma relação lipídio-peptídeo idêntica a uma das condições prévias testadas com 10,0 mg de lipídio, os espectros das amostras análogas contendo 200,0 mg de lipídio parecem apresentar um grau de orientação ligeiramente menor (pequeno sinal próximo a -15 ppm – comparar espectros das Figuras 3.20c e 3.22b). Nas preparações efetuadas com 10,0 mg de lipídio foram utilizadas sete placas de vidro, enquanto que nas preparações com 200,0 mg foram utilizadas vinte e sete placas. Isso

significa que a quantidade de lipídio por placa é cinco vezes maior nas amostras contendo 200,0 mg que nas amostras contendo 10,0 mg de lipídio. Isso indica que no primeiro caso há um maior empilhamento de bicamadas por placa e se conclui que o grau de desordem induzido pelo peptídeo em uma camada se propaga para a camada seguinte e é então aumentado ao longo do empilhamento. A redução no grau de ordenamento da bicamada em função da largura da membrana já foi previamente observada para bicamadas lipídicas puras e na presença de peptídeos-modelo, todavia esse efeito parece se pronunciar de maneira mais efetiva para peptídeos que se orientam paralelamente à superfície da membrana (Mendonça Moraes *et al.*, 2008; Harzer & Bechinger, 2000).

Conforme se observa na Figura 3.23, um bom grau de orientação foi também obtido para a amostra contendo PS-2 incorporada em bicamadas lipídicas de POPC:POPS (3:1), entretanto novamente foi notada uma fração não orientada para ambos os lipídios. São claramente observados os picos intensos próximos a 30 e 40 ppm, indicando o bom grau de orientação das moléculas de POPC e POPS, respectivamente.

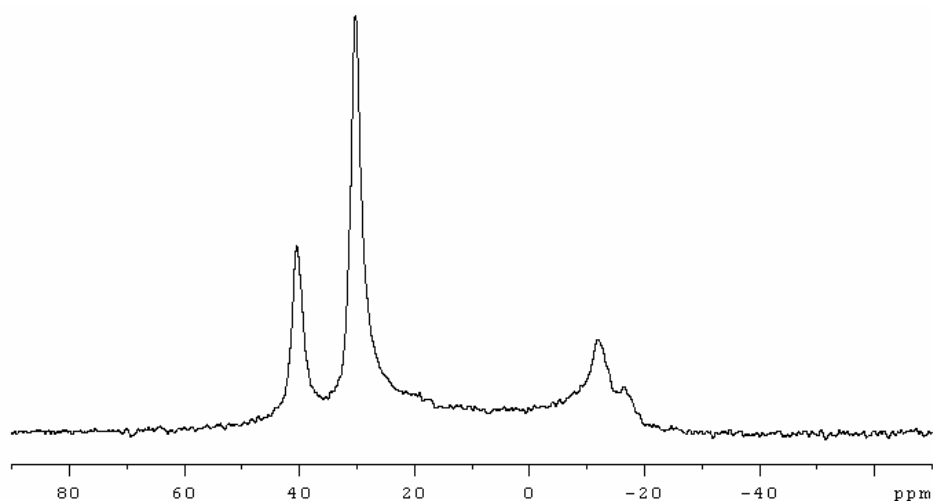


Figura 3.23 – Espectros de  $^{31}\text{P}$  de bicamadas lipídicas de POPC:POPS (3:1), contendo 200,0 mg de lipídio (pH 5,5; 93% de umidade) e PS-2 a 1,0 mol%. Medidas feitas para a normal da membrana paralela a  $B_0$ .

### 3.4.2 – Análise topológica dos peptídeos em bicamadas lipídicas por RMN de $^{15}\text{N}$ e de $^2\text{H}$

Uma vez confirmado o bom grau de orientação das bicamadas lipídicas por RMN de  $^{31}\text{P}$  (seção 3.4.1, p.108), análises das interações dos peptídeos com membranas podem ser efetuadas por medidas de RMN que venham a fornecer alguns parâmetros associados às moléculas de peptídeos incorporadas nas bicamadas lipídicas. As interações anisotrópicas da RMN podem fornecer importantes informações com relação ao alinhamento de ligações e até moléculas com relação ao campo magnético externo. A utilização desse tipo de aproximação já possibilitou a obtenção de restrições angulares que vieram a possibilitar a determinação de dados estruturais importantes de polipeptídeo associados a membranas (Bechinger, *et al.*, 2004). Em inúmeras situações, a dependência orientacional dos deslocamentos de  $^{15}\text{N}$  e  $^{13}\text{C}$  foram utilizadas com esses objetivos (Bechinger *et al.*, 2004; Cross, 1997; Smith *et al.*, 1994).

Em especial, o deslocamento químico anisotrópico de  $^{15}\text{N}$  obtido em medidas de RMN em amostras de peptídeos orientados em bicamadas lipídicas tem fornecido importante informação a respeito da orientação de peptídeos  $\alpha$ -helicoidais. Apesar da proximidade entre os valores dos tensores  $\sigma_{11}$  e  $\sigma_{22}$  (entre 60 e 85 ppm), o valor bem característico do tensor  $\sigma_{33}$  (~230 ppm) faz do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  um indicador direto do ângulo de inclinação da hélice (ver Equação 2.2, p. 68). Uma vez que o tensor  $\sigma_{33}$  cobre um ângulo de aproximadamente  $18^\circ$  com relação ao vetor da ligação N-H, sabe-se que deslocamentos químicos menores que 100 ppm são indicadores de alinhamentos aproximadamente paralelos da hélice em relação à superfície da membrana, enquanto que deslocamentos químicos superiores a 200 ppm são indicadores de orientações aproximadamente perpendiculares à superfície da membrana (arranjos *trans*-membrana) (Bechinger & Sizun, 2003; Bechinger, 1999). A Figura 3.24 ilustra esses tipos de situações.

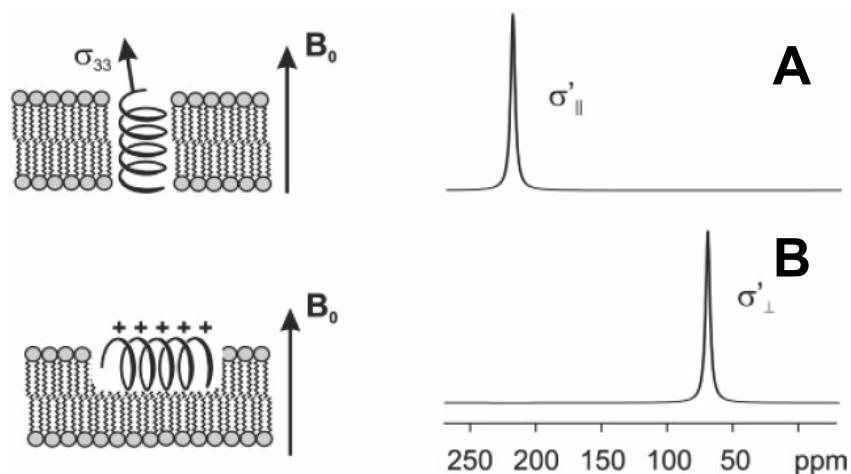


Figure 3.24 – Espectros de RMN de  $^{15}\text{N}$  em fase sólida indicando o alinhamento de um peptídeo  $\alpha$ -helicoidal em arranjos A) *trans*-membrana ou B) paralelo à superfície da membrana – Figura retirada da referência Bechinger & Sizun, 2003.

Medidas de deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  já foram utilizadas como uma ferramenta analítica em investigações estruturais (Cross, 1997) e biofísicas (Mendonça de Moraes *et al.*, 2008; Harzer & Bechinger, 2000; Bechinger, 1996) de situações que representam o processo da inserção de polipeptídeos em membranas. Portanto, com o objetivo de se obterem informações sobre o comportamento das filoseptinas em bicamadas lipídicas, experimentos de  $^{15}\text{N}$  (seção 2.5.2, p. 65) foram realizados para as amostras dos peptídeos isotopicamente marcados incorporados em bicamadas lipídicas. Medidas foram efetuadas para orientações das amostras com a normal da membrana paralela e perpendicular ao campo magnético externo. Os espectros obtidos para os peptídeos incorporados em bicamadas de POPC são apresentados a seguir na Figura 3.25 (p. 115).

Para medidas efetuadas com a normal da membrana paralela ao campo magnético, os sítios marcados com  $^{15}\text{N}$  na PS-2 e na PS-3 exibiram, respectivamente, ressonâncias em 74 e 73 ppm (Figuras 3.25B e C). Em ambos os casos, linhas de ressonância muito finas foram obtidas, o que indica que os sítios marcados nas moléculas dos peptídeos exibem um alto grau de ordenamento nas bicamadas lipídicas e que as hélices se alinham paralelamente à superfície da bicamada (Figura 3.24B). Por outro lado, o espectro obtido para o sítio marcado com  $^{15}\text{N}$  na PS-1 (Figura 3.25A) apresenta um sinal em 104 ppm,

sendo esse valor significativamente superior aos obtidos para os outros dois peptídeos. Tal deslocamento químico seria bastante alto para alinhamentos de hélices perfeitamente planares à superfície da membrana e, não obstante, é consideravelmente inferior aos esperados para alinhamentos *trans*-membrana. Esse deslocamento químico sugere, portando, que a PS-1 adota uma orientação um pouco inclinada, quando comparada às orientações das PS-2 e PS-3.

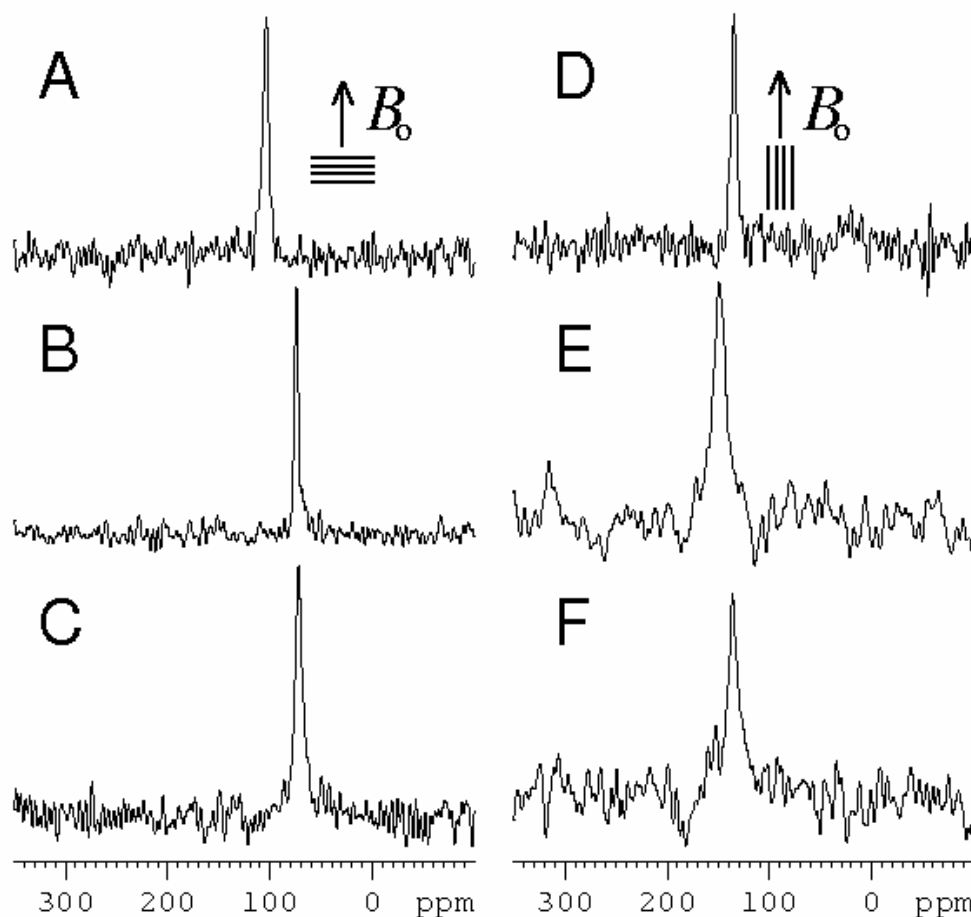


Figure 3.25 – Espectros de RMN em fase sólida de  $^{15}\text{N}$  desacoplado de  $^1\text{H}$  das filoseptinas a 1,0 mol% em bicamadas lipídicas de POPC: (3,3,3- $^2\text{H}_3$ -Ala-11,  $^{15}\text{N}$ -Ala-14)-PS-1 (A e D), (3,3,3- $^2\text{H}_3$ -Ala-8,  $^{15}\text{N}$ -Leu-15)-PS-2 (B e E), e (3,3,3- $^2\text{H}_3$ -Ala-11,  $^{15}\text{N}$ -Val-12)-PS-3 (C e F). A, B e C foram registrados para orientações da amostra com a normal da membrana paralelamente disposta a  $B_0$ . D, E e F foram registrados para orientações da amostra com a normal da membrana perpendicularmente disposta a  $B_0$ .

Nos casos dos espectros de  $^{15}\text{N}$  registrados para orientações da normal da membrana perpendicular ao campo magnético externo, foram observados sinais de ressonâncias em 134 ppm, 149 ppm e 136 ppm para as amostras de  $\{^{15}\text{N}$ -



Ala14}-PS-1,  $\{^{15}\text{N-Leu15}\}$ -PS-2 e  $\{^{15}\text{N-Val12}\}$ -PS-3, respectivamente (Figura 3.25D-F). A detecção de uma única linha de ressonância bem definida para as três amostras, bem como os valores de deslocamento químicos obtidos – em um limite de aproximação razoável  $\sim [\sigma_{33} + (\sigma_{11} + \sigma_{22}/2)]/2$  – sugerem fortemente a existência de um rápido movimento rotacional das hélices em torno da normal da membrana (Aisenbrey & Bechinger, 2004b). Outro fator importante a notar é o valor da diferença entre os deslocamentos químicos para as duas diferentes orientações de amostras (normal da membrana perpendicular e paralela a  $B_0$ ). Verifica-se que a PS-1 possui um valor de diferença ( $\Delta\delta = 30$  ppm) significativamente inferior aos valores da PS-2 e da PS-3 (75 e 63 ppm, respectivamente), de forma que esse resultado fornece uma indicação adicional que o alinhamento da hélice da PS-1 desvia de um arranjo perfeitamente planar.

Embora o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  forneça uma estimativa razoável do ângulo de inclinação da hélice, a proximidade entre os valores de  $\sigma_{11}$  e  $\sigma_{22}$  faz com que esse parâmetro seja insensível a rotações em torno do eixo principal da hélice, ou seja, o ângulo polar de rotação interna (ângulo azimutal). Por outro lado, a RMN de  $^2\text{H}$  em fase sólida pode fornecer informações altamente complementares à RMN de  $^{15}\text{N}$ , de modo que o ângulo de inclinação, bem como o ângulo polar de rotação interna podem ser obtidos pela análise simultânea do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  e do desdobramento quadrupolar de deutério,  $\Delta\nu_Q$  (seção 2.5.3, p. 67) (Aisenbrey & Bechinger, 2004a & b). A marcação isotópica com resíduos de 3,3,3- $^2\text{H}_3$ -Ala fornece vantagens distintas: *a*) O grupo metila está diretamente ligado ao esqueleto peptídico, de forma que o alinhamento do vetor da ligação  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  diretamente reflete o alinhamento do esqueleto helicoidal; *b*) o rápido movimento rotacional ao redor da ligação  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  faz com que os três núcleos de  $^2\text{H}$  sejam magneticamente equivalentes, o que leva à intensificação do sinal de RMN, bem como faz com que o tensor resultante da interação quadrupolar do deutério seja paralelo ao vetor da ligação  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ ; *c*) os alinhamentos da ligação  $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$  e do tensor  $\sigma_{33}$  de  $^{15}\text{N}$  são completamente diferentes com relação à estrutura helicoidal e, portanto, as determinações de ambos os parâmetros levam a informações altamente complementares.

Portanto, com o objetivo de se obterem maiores detalhes sobre o alinhamento das filoseptinas em bicamadas lipídicas, foram adquiridos experimentos de RMN de  $^2\text{H}$  (seção 2.5.2, p.65) para as amostras dos três peptídeos isotopicamente marcados e incorporados às bicamadas lipídicas. Alguns desses espectros são apresentados na Figura 3.26

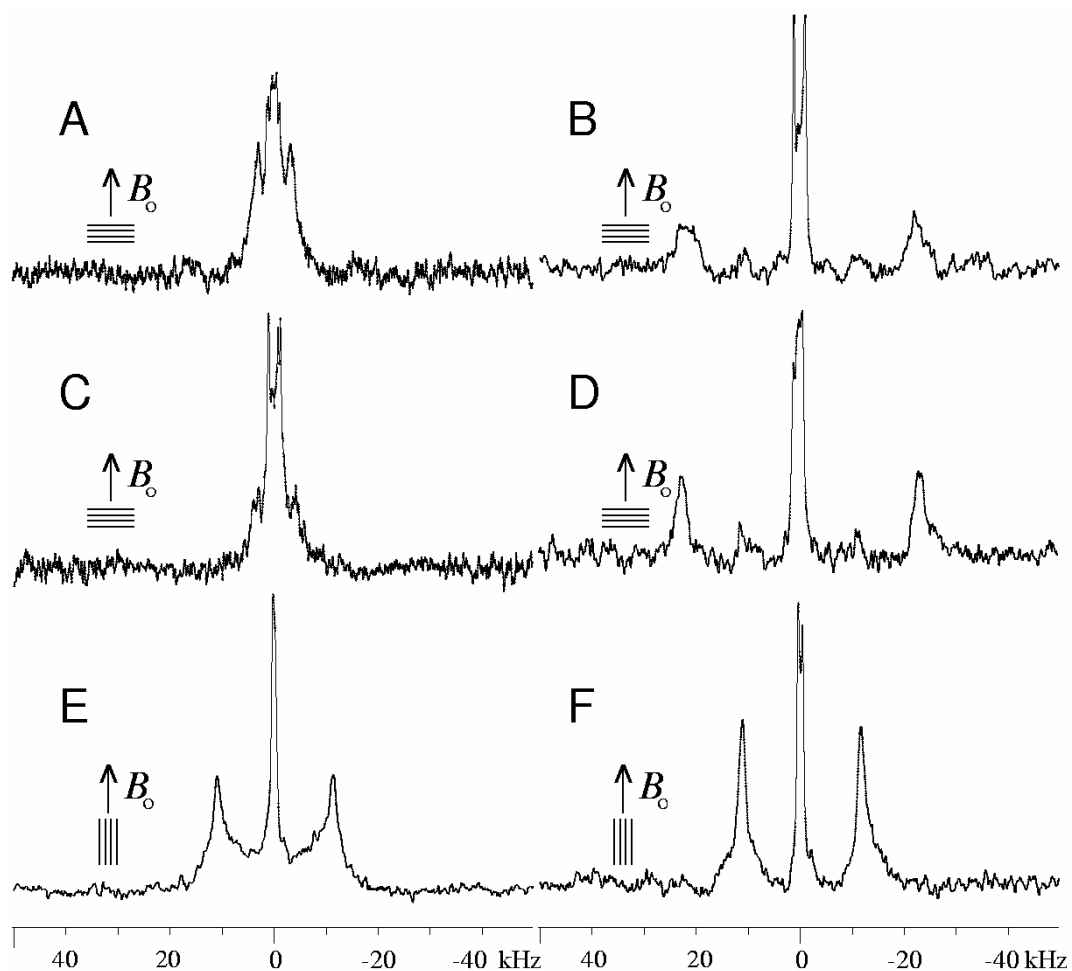


Figura 3.26 – Espectros de RMN em  $^2\text{H}$  em fase sólida das filoseptinas a 1,0 mol% em bicamadas lipídicas. Espectros da  $(3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-11, }^{15}\text{N-Ala-14})\text{-PS-1}$  (A), da  $(3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-8, }^{15}\text{N-Leu-15})\text{-PS-2}$  (B, E), e da  $(3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-11, }^{15}\text{N-Val-12})\text{-PS-3}$  (C) em bicamadas lipídicas de POPC e da  $(3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-8, }^{15}\text{N-Leu-15})\text{-PS-2}$  em bicamadas lipídicas de POPC:POPS (3:1) (D, F). A-D foram registrados para orientações das amostras com a normal da membrana paralela a  $B_0$ . E e F mostram espectros da  $(3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-8, }^{15}\text{N-Leu-15})\text{-PS-2}$  em bicamadas lipídicas de POPC e POPC:POPS (3:1), respectivamente, para orientações das amostras com a normal da membrana perpendicular a  $B_0$ .

Em todos esses espectros são observados desdobramentos quadrupolares menores que 2,5 kKz, os quais são relacionados a moléculas de água associadas à membrana (Mendonça Moraes & Bechinger, 2004). São também observados nos espectros da  $\{3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-11}\}$ -PS-1 e da  $\{3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-8}\}$ -PS-2 gravados para a normal da membrana paralela a  $B_0$ , pares bem definidos de ressonâncias, associados a desdobramentos de 6,0 kHz and 45,0 kHz, respectivamente (Figuras 3.26A e B). Um desdobramento de aproximadamente 8,5 kHz é observado no espectro da  $\{3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-11}\}$ -PS-3 (Figura 3.26C). O espectro da PS-2 em bicamadas de POPC:POPS (3:1), obtido para a mesma orientação, exhibe um desdobramento quadrupolar de 46 kHz (Figura 3.26D). Esse valor é muito similar ao obtido em bicamadas lipídicas de POPC, todavia se observa que as transições quadrupolares da PS-2 em POPC:POPS (3:1) exibem linhas mais estreitas. Esse resultado sugere a existência de um alinhamento mais homogêneo das hélices peptídicas nas bicamadas de POPC:POPS que nas bicamadas de POPC. É possível que interações eletrostáticas mais efetivas entre o peptídeo catiônico PS-2 e as cargas negativas extras das moléculas de POPS venham a favorecer um maior ordenamento do peptídeo na bicamada mista.

São respectivamente apresentados, nas Figura 3.26D e F, os espectros da  $\{3,3,3\text{-}^2\text{H}_3\text{-Ala-8}\}$ -PS-2 em bicamadas lipídicas de POPC e POPC:POPS (3:1) para orientações das amostras com a normal da membrana perpendicular a  $B_0$ . Os desdobramentos quadrupolares observados (22,4 kHz e 22,7 kHz, respectivamente) representam, dentro do erro experimental, metade dos valores obtidos para orientações com a normal da membrana paralela a  $B_0$ . Esses resultados estão em acordo com a Equação 2.1 (p. 67), confirmando mais uma vez (juntamente com as linhas de ressonância bem definidas nos espectros) a existência de um rápido movimento rotacional em torno da normal da membrana para os peptídeos PS, *i.e.* um movimento rotacional mais rápido que  $10^{-5}$  s (escala de tempo da interação quadrupolar do grupo metila deuterado – Seelig, 1977). Novamente, ao se compararem os espectros das Figura 3.26D e F, observa-se que o espectro da PS-2 em bicamadas lipídicas de POPC:POPS possui linhas mais

bem definidas, o que sugere um maior ordenamento do peptídeo nessa bicamada mista.

São também visíveis nos espectros de  $^2\text{H}$  da PS-2 obtidos para orientações com a normal da membrana paralela a  $B_0$ , linhas bem menos intensas que caracterizam desdobramentos quadrupolares de 22 kHz and 23 kHz em bicamadas de POPC e POPC:POPS, respectivamente (Figuras 3.26B e E). Esses valores são, dentro do erro experimental, os mesmos obtidos para orientações com a normal da membrana perpendicular a  $B_0$  (ver discussão na p. 118) e correspondem provavelmente a peptídeos associados a estruturas membranares supramoleculares, as quais resultam em alinhamentos da normal da membrana perpendicular à normal da amostra. Esses resultados estão de acordo com os picos de pequena intensidade próximos a -15 ppm observados nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  das filoseptinas (Figuras 3.22 e 3.23 – p. 111 e 112, respectivamente).

Embora não seja possível se determinar precisamente a orientação dos peptídeos nas bicamadas usando-se o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  ou o desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  separadamente, os dois parâmetros fornecem restrições topológicas altamente complementares, que podem ser utilizadas em conjunto para se obter uma definição mais acurada sobre a orientação dos peptídeos nas bicamadas lipídicas.

A seguir são apresentados nas Figuras 3.27A-C, os mapas de contornos nos quais os valores do desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  e do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  foram calculados (equações 2.1 e 2.2, respectivamente – seção 2.5.3 – p. 67 e 68) para cada par de ângulo polar de rotação interna e ângulo de inclinação para uma resolução angular de  $1^\circ$ . Nesses mapas, os pontos pretos representam orientações nas quais o valor experimental do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  concorda com o valor simulado considerando-se uma incerteza de  $\pm 2$  ppm. As linhas em vermelho seguem pares angulares nos quais o desdobramento quadrupolar de deutério simulado concorda com o valor experimental dentro de

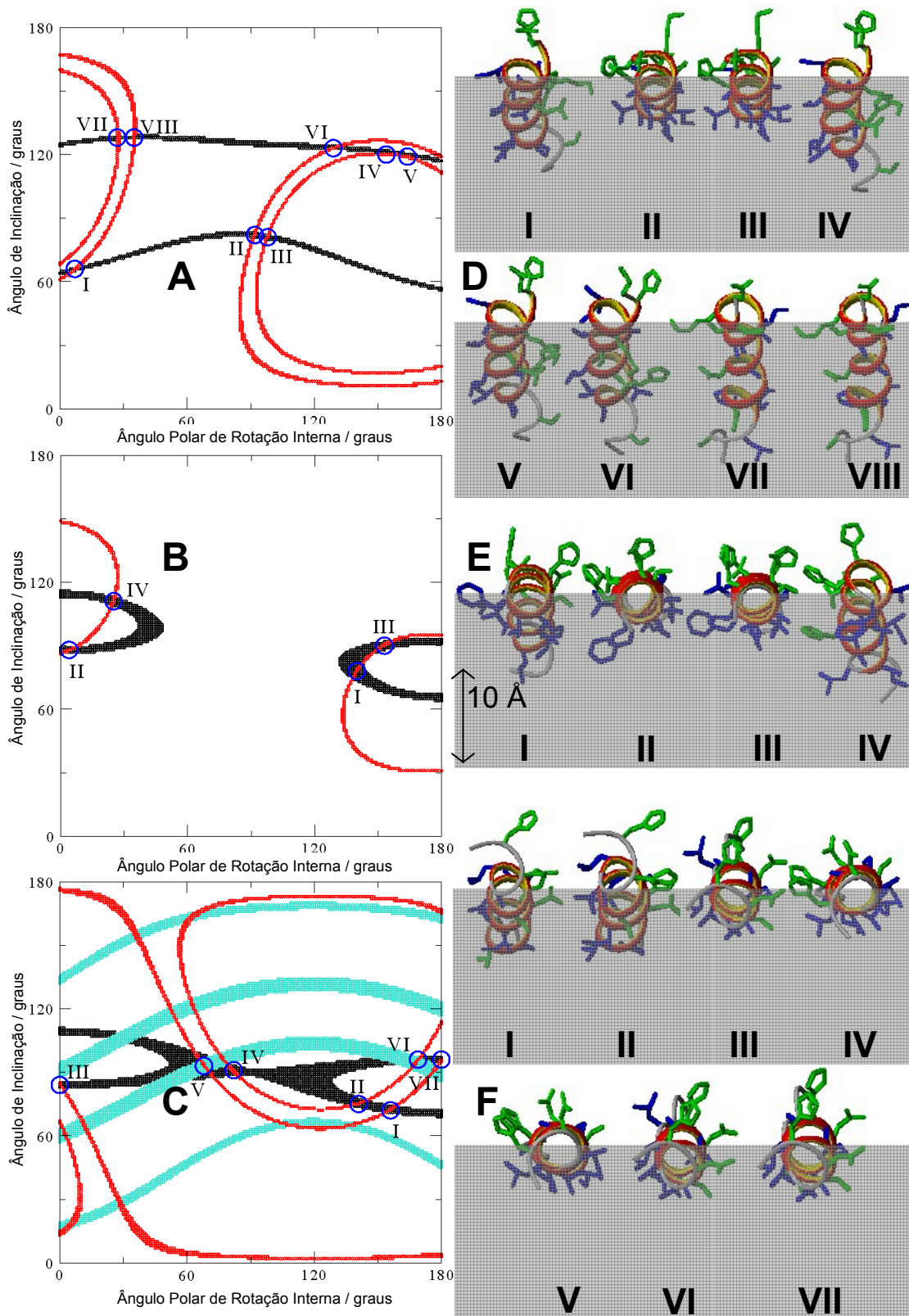


Figura 3.27 – Alinhamentos do PS-1 (A), PS-2 (B) e PS-3 (C) em bicamadas lipídicas apresentados em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna. Os pontos pretos representam orientações que concordam com o deslocamento químico experimental de  $^{15}\text{N}$  dentro de um erro de  $\pm 2.0$  ppm e os pontos vermelhos representam orientações que estão de acordo com o desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  dentro de um erro de  $\pm 1.0$  kHz. Os pontos de

intercessão em azul indicam orientações que concordam simultaneamente com os dois parâmetros e portanto esses arranjos representam as possíveis orientações dos peptídeos nas bicamadas lipídicas. No mapa (C) um parâmetro adicional, desdobramento dipolar de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (10,6 kHz  $\pm$ 1.0 kHz) é incluído na análise – pontos em azul claro (ver Figura 3.28, p. 122). Próximo a cada mapa de contornos é apresentada uma das estruturas obtida por RMN em solução (ver seção 3.3.2, p. 98), representando os possíveis alinhamentos (pontos de interseção) para a PS-1 (D), a PS-2 (E) e a PS-3 (F). Resíduos hidrofílicos são apresentados em verde e hidrofóbicos em azul, sendo os grupos C-terminais apresentados no plano frontal da Figura. Os retângulos em cinza representam aproximadamente a espessura de uma monocamada lipídica (uma seta com pontas duplas indica um comprimento de 10 Å).

$\pm$  1 kHz. Percebe-se claramente que cada parâmetro restringe os alinhamentos peptídicos possíveis, mas quando usados separadamente, inúmeras possibilidades de orientação são deixadas em aberto. Por outro lado, apenas um pequeno número de topologias concordam simultaneamente com ambos os parâmetros e tais pontos de interseção são representados pelos círculos em azul.

Oito possíveis regiões angulares são obtidas para a PS-1, enquanto que quatro possibilidades são obtidas para a PS-2 e sete para a PS-3. Próximo a cada mapa de contorno são apresentadas as respectivas orientações possíveis para uma estrutura tridimensional de cada um dos peptídeos incorporados nas bicamadas lipídicas (Figuras 3.27A, B e C para as PS-1, PS-2 e PS-3, respectivamente). As estruturas tridimensionais aqui apresentadas foram obtidas por dados de RMN em solução (seção 3.3.2, p. 99). Os resíduos hidrofílicos são apresentados em verde e os hidrofóbicos em azul, sendo os grupos C-terminais apresentados no plano frontal da figura.

Dentre os quatro possíveis arranjos obtidos para a PS-2, apenas a orientação III (ângulo de inclinação e ângulo polar de rotação interna  $90^\circ/153^\circ$ ) é energeticamente favorável e livre de inserção total ou parcial de resíduos polares no interior hidrofóbico da membrana (Figuras 3.27B e E). Em particular, as orientações I e IV (que representam respectivamente ângulos de inclinação de  $77^\circ$  e  $111^\circ$ ) são caracterizadas pela inserção profunda de resíduos polares e

carregados (inclusive uma His-7), no interior da membrana, o que definitivamente representaria uma situação termodinamicamente desfavorável.

Dentre as sete possíveis topologias observadas para a PS-3 (Figuras 3.27C e F), o arranjo quase perfeitamente planar V (ângulo de inclinação e ângulo polar de rotação interna  $92^{\circ}/66^{\circ}$ ) reflete de forma melhor a natureza anfipática desse peptídeo, onde a estrutura helicoidal é disposta com sua face apolar no interior hidrofóbico da membrana.

Dentre as oito possíveis topologias determinadas para a PS-1 (Figuras 3.27A e D), a orientação energeticamente mais favorável é representada pelo arranjo II (ângulo de inclinação e ângulo polar de rotação interna  $82^{\circ}/92^{\circ}$ ), devido ao fato de que a inclinação do eixo principal da hélice obtida para as orientações I e IV a VIII força a inserção de vários resíduos polares no interior da bicamada lipídica, além do que, o ângulo polar de rotação interna obtido para a orientação III não dispõe corretamente as faces polares e apolares da hélice com relação à interface da membrana. De forma notável, a orientação II apresenta um desvio de  $8^{\circ}$  do que seria esperado com relação a um arranjo perfeitamente planar. Esse resultado explica o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  obtido para esse peptídeo (104 ppm), o qual qualitativamente já indicava um certo desvio da planaridade para essa hélice peptídica (ver discussões nas páginas 114 a 116).

Com o objetivo de confirmar a eficiência dos resultados topológicos obtidos via análise simultânea do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  e do desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$ , adquiriu-se um experimento de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  PISEMA para a amostra da PS-3 (seção 2.5.2, p. 65), sendo o espectro obtido apresentado na Figura 3.28 (p. 123). Desse espectro se obtém um desdobramento dipolar escalonado igual a 8,7 kHz, que é correspondente à interação dipolar entre os núcleos N-H do sítio de isotopicamente marcado com  $^{15}\text{N}$  na PS-3 (Val-12). Esse desdobramento escalonado corresponde a um desdobramento dipolar de 10,6 kHz (Ramamoorthy *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1994). Esse resultado qualitativamente corresponde a alinhamentos de hélices paralelos à superfície da membrana (Marassi & Opella, 2003). Com o objeto de se analisar esse resultado de uma forma mais quantitativa, procederam-se simulações do valor do

desdobramento dipolar de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna (seção 2.5.3, p.67). Os resultados obtidos com essa simulação são apresentados na Figura 3.27C (p. 120), onde os pontos em azul claro representam alinhamentos peptídicos que concordam com o parâmetro experimental dentro de um erro de  $\pm 1$  kHz. Essa restrição adicional permite uma seleção ainda mais eficiente de topologias, sendo que agora apenas as orientações V e VI (Figuras 3.27C e F, p. 120) concordam simultaneamente com os três parâmetros experimentais (deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$ , desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  e desdobramento dipolar de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ). Ressalta-se que, dentre essas duas orientações, encontra-se o arranjo V, que representa o arranjo energético mais favorável da PS-3 em bicamadas lipídicas.

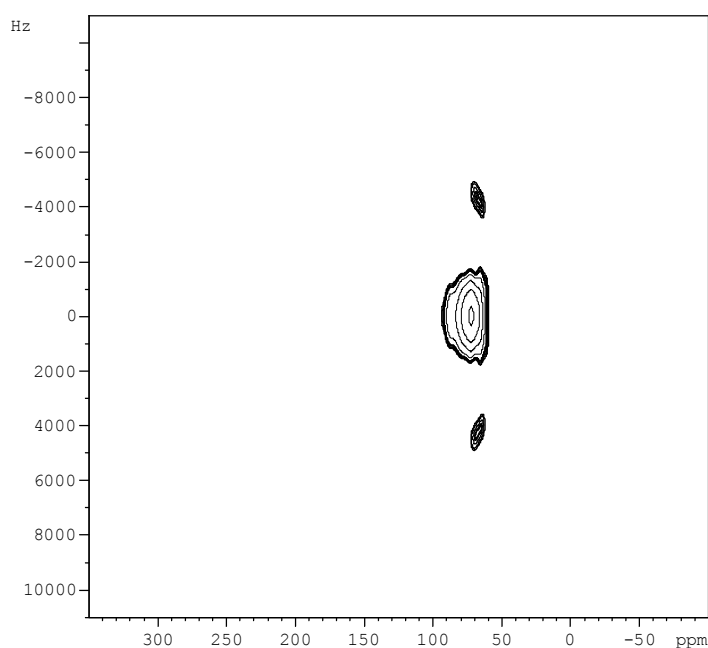


Figura 3.28 – Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  PISEMA do (3,3,3- $^2\text{H}_3$ -Ala-11,  $^{15}\text{N}$ -Val-12)-PS-3 a 1,0 mol% em bicamadas lipídicas de POPC. Experimento gravado para orientação da amostra com a normal da membrana paralela a  $B_0$ .

Os resultados discutidos acima indicam que as hélices das filoseptinas 2 e 3 possuem alinhamentos planares quando em contato com a interface de membranas, todavia um pequeno desvio na planaridade é observado no caso da filoseptina 1. Quando se analisa em detalhes a estrutura do PS-1, percebe-se que esse peptídeo possui um forte caráter anfipático, sendo que o resíduo polar de



Asn-19 está localizado na face hidrofóbica da hélice. Um pequeno desvio da planaridade possibilita a remoção desse resíduo polar do interior hidrofóbico da membrana (Figura 3.27D – topologia II, p. 120), o que explica o resultado obtido.

Um balanço fino de interações eletrostáticas (Vogt & Bechinger, 1999; Matsuzaki *et al.*, 1997) e hidrofóbicas (Mason *et al.*, 2005; Wieprecht *et al.*, 1997) é necessário para a associação e inserção do peptídeo na membrana e, no caso das filoseptinas, a formação de conformações helicoidais garante a formação de estruturas anfipáticas com alto momento hidrofóbico, promovendo-se portanto a interação peptídeo-membrana. Tem sido demonstrado que transições de espécies não estruturadas (meio aquoso) para arranjos helicoidais (ambiente de membrana) contribuem com aproximadamente -0,5 kcal / mol por resíduo no caso de estruturas anfipáticas (Wieprecht *et al.*, 1999), sendo que esse fator deve promover a maior associação da PS-2 e da PS-1 sobre o PS-3 (seção 3.2, p. 79). Após intercalados com os eixos helicoidais paralelos à superfície da bicamada, os peptídeos podem desenvolver atividades perturbadoras e de rompimento da membrana, ou ainda de partição no citoplasma, tendo-se então desenvolvidas as atividades antimicrobianas desses compostos (Zasloff, 2002; Huang, 2000; Bechinger, 1999; Shai, 1999; Matsuzaki, 1998).

No caso das filoseptinas, além do arranjo anfipático adotado por esses peptídeos catiônicos quando em contato com as bicamadas, os resultados obtidos por RMN de  $^{31}\text{P}$  e  $^2\text{H}$  (ver discussões acima) indicaram a formação de arranjos supramoleculares peptídeo-membrana que mostram alinhamento da normal da membrana perpendicular à normal da amostra, o que confirma a capacidade de perturbação da membrana exercida por esses peptídeos. Esses resultados estão em pleno acordo com modelos como o do “carpete” ou “detergente” (Bechinger & Lohner, 2006), onde efeitos como o da difusão lateral e da adsorção preferencial de algumas moléculas de lipídio levam à desestabilização da estrutura da membrana em áreas associadas a diâmetros de vários nanômetros, causando efeitos como o colapso da resistência ôhmica da membrana e a formação de estruturas micelares ao longo da bicamada, tendo-se assim a

formação de poros e o aumento da permeabilidade (Duclohier *et al.*, 1989), bem como o rompimento da membrana (Bechinger, 2005).

Apesar da significativa homologia entre as seqüências primárias das filoseptinas 1, 2 e 3, relevantes diferenças foram observadas ao se compararem as estruturas secundárias desses compostos (seção 3.3.2, p. 95). Além dessas diferenças estruturais, alguns detalhes nas seqüências peptídicas, como a presença de um resíduo polar de asparagina C-terminal no PS-1 (ver discussões acima), fazem com que ocorram diferenças sutis entre os arranjos topológicos desses peptídeos. Tais diferenças são muito vantajosas para o animal, uma vez que o armazenamento de coquetéis de agentes antimicrobianos (Leite *et al.*, 2005; Giovannini *et al.*, 1987) possibilita um maior espectro de ação, tendo-se assim um mecanismo de defesa que é bem eficiente com relação a diferentes microrganismos. Ao mesmo tempo, a liberação de misturas de compostos antimicrobianos possibilita a ação sinérgica de combinações de peptídeos (Hara, *et al.*, 2001; Westerhoff *et al.*, 1995), podendo-se ter uma eficiência ainda maior.

### **3.5 – Estrutura e constantes de blindagem da PS-2 a partir de cálculos quânticos**

#### **3.5.1 – Estrutura da PS-2 a partir de cálculos quânticos**

Nesta seção são descritos os resultados obtidos para a análise estrutural da PS-2 a partir de métodos de cálculo da química quântica.

Com o objetivo de modelar uma estrutura helicoidal, iniciou-se o trabalho pela construção de uma hélice ótima (do primeiro resíduo à amidação C-terminal), fazendo-se então uma otimização prévia de geometria, na qual foi empregado o campo de força AMBER da mecânica molecular. O objetivo dessa etapa prévia de otimização é a obtenção de uma estrutura que possa ser empregada na construção das geometrias de partida a serem utilizadas nos cálculos DFT (seção 2.6, p. 69). Esse processo de otimização prévia fornece geometrias de partida plausíveis aos cálculos quânticos, pois corrige algumas

imperfeições estruturais, como erros significativos em comprimentos de ligações e altas repulsões entre átomos espacialmente vizinhos.

A estrutura obtida via mecânica molecular, foi então particionada nos fragmentos peptídicos F1, F2, F3 e F4 (seção 2.6, p. 69), os quais tiveram então suas geometrias otimizadas para o nível DFT/B3LYP/6-31G\*\*. As otimizações foram conduzidas para os fragmentos peptídicos, levando-se em conta a existência ou não de protonação nos resíduos de His-7, His-17 e His18. Deste ponto em diante faz-se referência aos segmentos peptídicos não protonados como F1(0), F2(0), F3(0) e F4(0) e aos segmentos protonados como F1(+1), F2(+1), F3(+1) e F4(+2).

Após otimização de geometria via mecânica molecular, observou-se certa desestabilização da estrutura helicoidal do peptídeo, resultado que é nítido ao se observar o rompimento (ou enfraquecimento) de várias ligações de hidrogênio CO...HN para o intervalo  $i, i+4$ , conforme mostrado na Figura 3.29a. Por outro

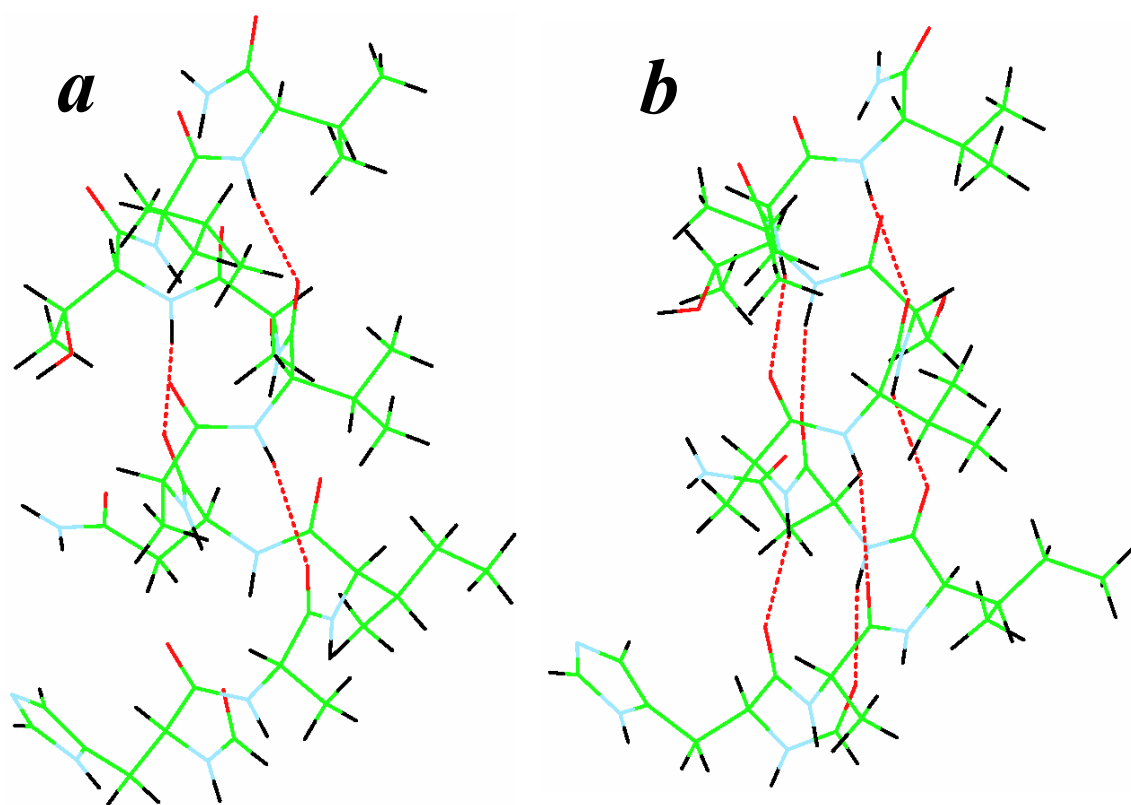


Figura 3.29 – Estruturas do fragmento peptídico F4 (sem carga) obtidas após otimizações de geometria *a*) via rotina de mecânica molecular (campo de força AMBER) e *b*) via método DFT/B3LYP/6-31G\*\*. Átomos de C em verde, de N em azul claro, de O em vermelho e de H em preto.

lado, observa-se que a otimização empregando métodos DFT, leva a uma recomposição significativa desse arranjo helicoidal, conforme mostrado na Figura 3.29b. Esse resultado é importante, pois indica que as interações que tendem a estabilizar a estrutura helicoidal apresentam peso significativo e são bem representadas pelos cálculos DFT/B3LYP/6-31G\*\*. Neste ponto vale ressaltar que conjunto de funções de bases atômicas 6-31G\*\* empregado, parece desempenhar importante função nos resultados obtidos, pois os orbitais de polarização *d* para átomos de C, N e O e os orbitais de polarização *p* para átomos de H, desempenham importante papel na descrição de interações como ligações de hidrogênio (Frisch *et al.*, 1984).

Uma vez otimizadas as geometrias dos fragmentos peptídicos (protonados ou não), fez-se o agrupamento dos resíduos selecionados em cada um dos fragmentos (resíduos que contemplam as interações de ligação de hidrogênio estabilizadoras da estrutura helicoidal – Tabela 2.3, p. 73) e construiu-se assim as estruturas da PS-2(+3) e da PS-2(0), conforme mostrado na Figura 3.30 (p. 128).

Significativas diferenças são observadas ao se compararem as estruturas DFT da PS-2(+3) (Figura 3.30a) e da PS-2(0) (Figura 3.30b). Observa-se uma estrutura helicoidal mais definida no caso da PS-2(0) neutra, a qual se estende do 3° ao 19° resíduo de aminoácido, enquanto que o segmento helicoidal se estende do 5° ao 17° resíduo para a PS-2(+3) protonada. Quando comparadas à estrutura obtida via rotina de *annealing* simulado que emprega restrições de *nOe* (Figura 3.30d), as extensões dos segmentos helicoidais determinadas para as estruturas DFT são significativamente diferentes. A estrutura DFT da PS-2(0) possui um segmento helicoidal maior que a estrutura de RMN da PS-2, enquanto que a estrutura DFT da PS-2(+3) possui um segmento helicoidal menor. Por outro lado, quando se analisa a estrutura média (Figura 3.30c) das geometrias DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3) e da PS-2(0), se obtém um segmento helicoidal que se estende do 5° ao 19° resíduo de aminoácido. Esse segmento helicoidal é exatamente o mesmo obtido por análise via *annealing* simulado usando-se restrições de *nOe* (Figura 3.30d – ver também seção 3.3.2, p. 95).

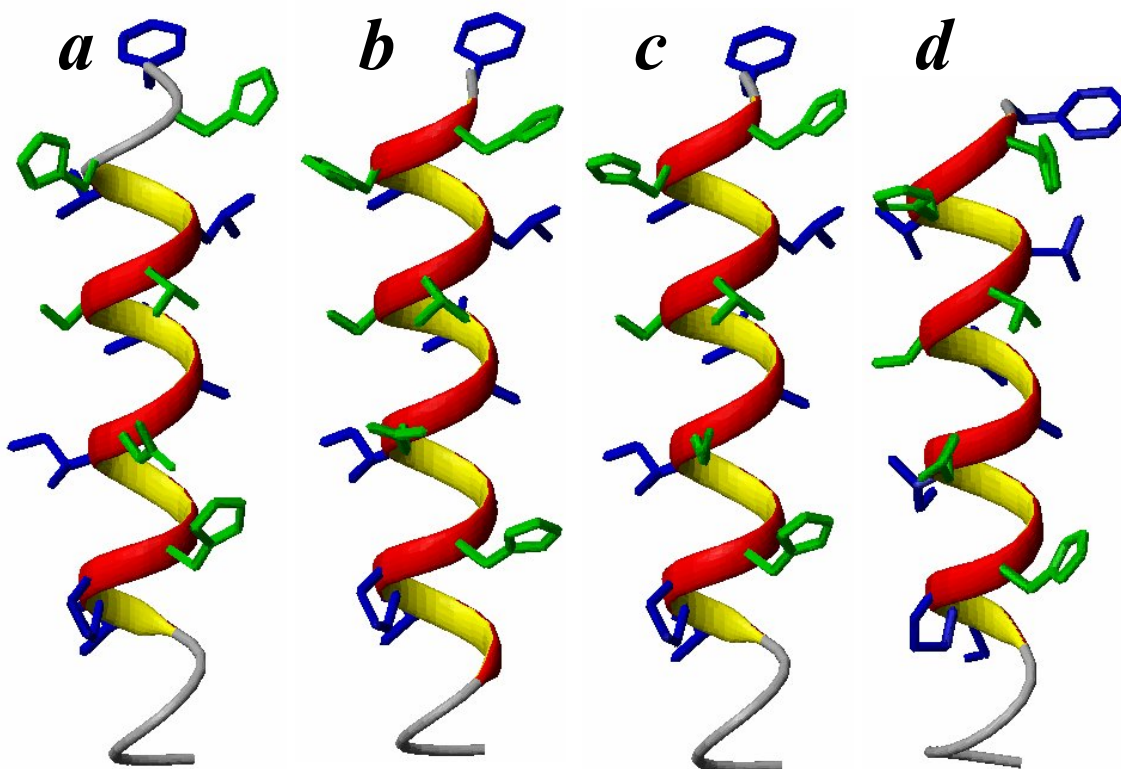


Figura 3.30 – Comparação entre estruturas provenientes de análises conformacionais da PS-2: *a*) Estrutura DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3) (protonada), *b*) estrutura DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(0) (neutra), *c*) estrutura média das geometrias de *a* & *b* e *d*) estrutura mais estável obtida por *annealing* simulado usando-se restrições de *nOe*.

Quando as estruturas DFT/B3LYP/6-31G\*\* são analisadas de maneira mais detalhada, conforme apresentado na Figura 3.31 (p. 129), percebe-se que as protonações dos resíduos de histidina têm um efeito significativo no arranjo adotado pelo peptídeo. Um efeito nítido da protonação no resultado da modelagem molecular pode ser apreciado na Figura 3.31*a*, ao se observar que o resíduo de His-7, carregado positivamente, tende a compartilhar sua densidade de carga positiva, por meio de interações de ligação de hidrogênio, entre o hidrogênio ácido da cadeia lateral da histidina com o oxigênio da cadeia lateral do resíduo de Asn-10. Esse tipo de interação gera uma concentração de carga positiva no resíduo de Asn-10, a qual é aliviada pela formação de uma nova interação de ligação de hidrogênio entre um dos hidrogênios amídicos da cadeia lateral desse resíduo de asparagina com o oxigênio carbonílico do resíduo de Ala-11. Apesar desses resíduos 7 a 11 se encontrarem em arranjo  $\alpha$ -helicoidal na

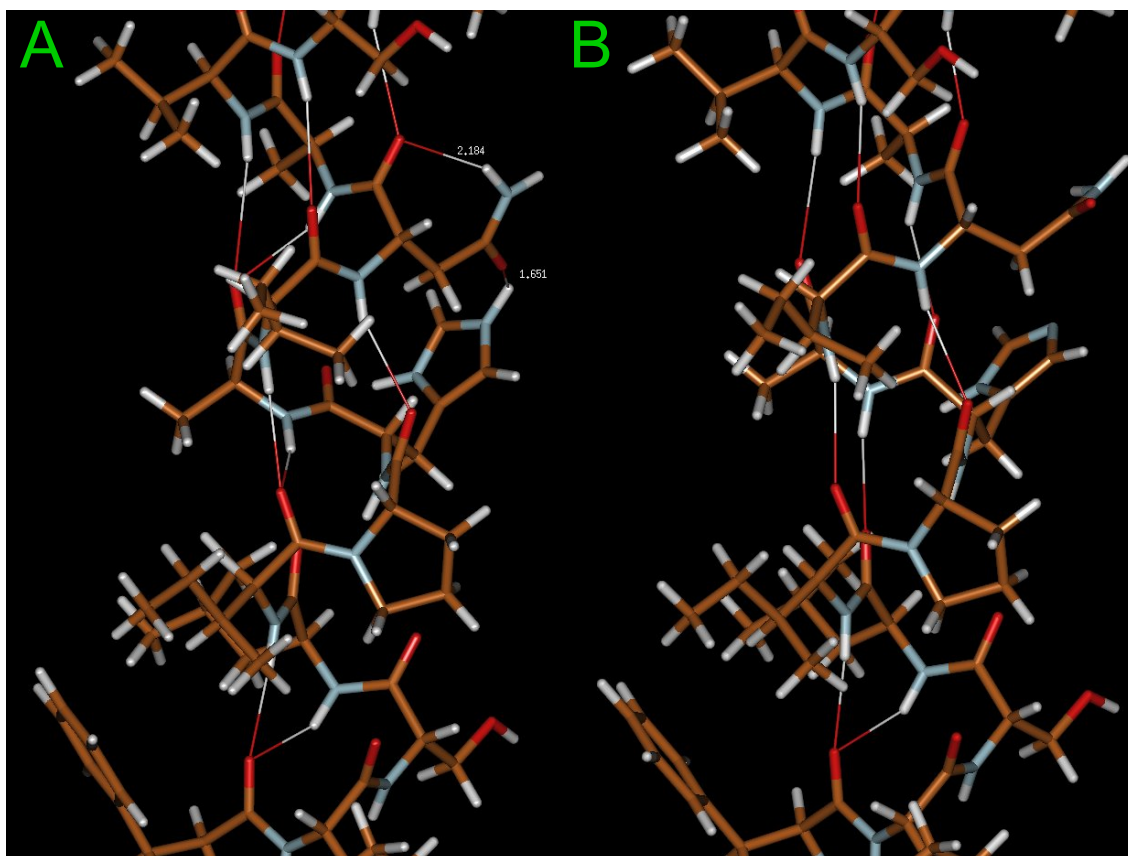


Figura 3.31 – Comparação entre expansões das estruturas DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2: *a*) estrutura PS-2(+3) (protonada) e *b*) PS-2 (neutra). Átomos de C em marrom, de N em azul claro, de O em vermelho e de H em branco.

estrutura da PS-2(+3) (Figura 3.30*a*, p. 128), se observa que essas interações de ligação de hidrogênio entre cadeias laterais, visíveis na Figura 3.31*a*, acabam por alterar os ângulos  $\psi$  do esqueleto peptídico, o que leva à desestabilização das ligações de hidrogênio  $\text{CO}\cdots\text{HN } i, i+4$ , tendo-se assim a desestabilização da estrutura helicoidal. Na ausência de protonação, percebe-se que esse tipo de interação estabilizadora da hélice mais preservada (Figura 3.31*b*). Dessa forma, observa-se que a modelagem de arranjos peptídicos helicoidais via cálculos DFT/B3LYP/6-31G\*\* parece ser mais eficiente quando se trabalha com resíduos não carregados. Neste ponto, deve ser ressaltada uma aproximação intrínseca à estratégia de cálculo utilizada. Em todos os cálculos DFT, trabalharam-se com os fragmentos peptídicos isolados, ou seja, não se consideram moléculas de solvente. Por outro lado, a existência de uma carga positiva em solução pode ser estabilizada por interações com as moléculas de solvente, o que não foi levado

em conta nos cálculos DFT, sendo que essa estabilização da carga promovida pelo solvente diminui efeitos de interações intramoleculares (como as mostradas na Figura 3.31a), que tentam deslocalizar a carga positiva, que possui alta densidade nos resíduos de histidina protonados.

Tem-se um dado importante obtido com os resultados dos cálculos estruturais DFT/B3LYP/6-31G\*\*. Conforme discutido acima, o segmento helicoidal obtido para a estrutura protonada é menor que o obtido via dados de *nOe*, por outro lado, o segmento helicoidal obtido para a estrutura desprotonada é maior que o obtido via dados de *nOe*. Quando se leva em consideração a estrutura média entre a espécie protonada e desprotonada, se obtém um segmento helicoidal com extensão idêntica à obtida via dados de *nOe*. O resultado obtido para essa estrutura DFT/B3LYP/6-31G\*\* média concorda com a análise dos dados de RMN, que sugerem um estado parcial de protonação dos resíduos de histidina para a PS-2 em solução (ver Figura 3.18, p. 104).

A análise da qualidade estereoquímica das estruturas DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3), da PS-2(0) e da estrutura média dessas geometrias é apresentada na Figura 3.32, p. 131. No caso da PS-2(0) e da estrutura média (Figuras 3.32b e c, respectivamente), observa-se que todos os pares angulares  $\phi$  e  $\psi$  se encontram nas “regiões mais favoráveis” do diagrama de Ramachandran e, no caso da PS-2(+3), (Figuras 3.32a) todos os resíduos, exceto a Ala-8, também apresentam os respectivos pares de ângulos nas “regiões mais favoráveis” da curva (o resíduo de Ala-8 possui ângulos  $\phi$  e  $\psi$  nas “regiões adicionalmente favoráveis”). Esses resultados indicam uma alta qualidade das estruturas obtidas. Ressalta-se que o resíduo de Ala-8 é provavelmente susceptível a algum efeito de torção devido à estabilização via ligação de hidrogênio da carga positiva extra do resíduo de His-7(+1) (ver Figura 3.31a, p. 129).

Esses estudos estruturais de modelagem DFT da PS-2, foram capazes de fornecer estruturas bastante similares às obtidas via estratégia de *annealing* simulado que emprega restrições provenientes de dados experimentais de RMN. De forma notável, uma semelhança ainda maior é observada quando se considera

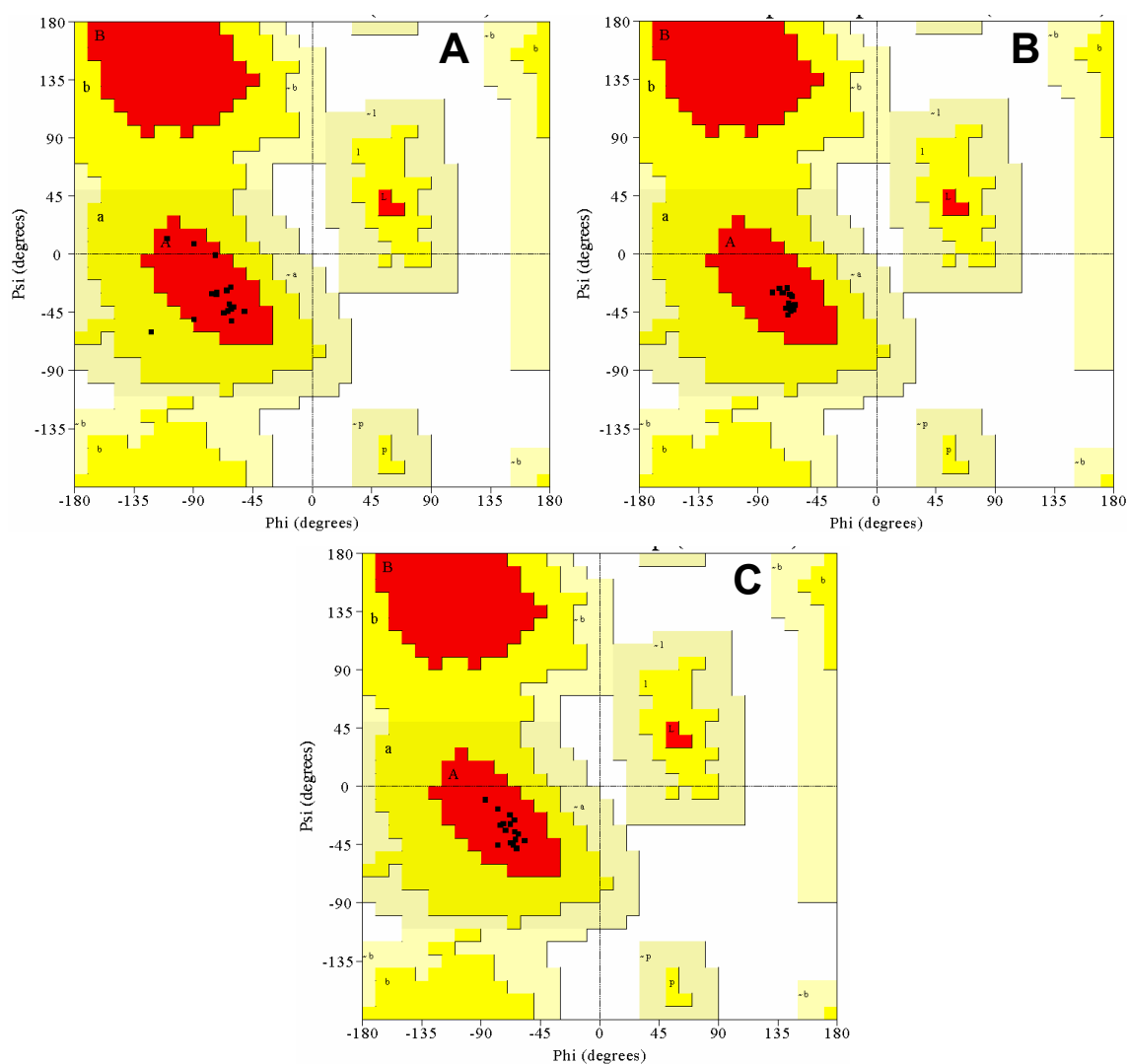


Figura 3.32 – Qualidade estereoquímica das estruturas DFT/B3LYP/6-31G\*\* do PS-2. *a*) PS-2(+3) (protonado), *b*) PS-2(0) (neutro) e *c*) estrutura média das geometrias de *a* & *b*. “Regiões mais favoráveis” em vermelho, “regiões adicionalmente favoráveis” em amarelo, “regiões generosamente favoráveis” em bege e “regiões proibidas em branco”. Dados obtidos com o PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996).

a estrutura DFT média entre a PS-2 carregada positivamente e a PS-2 não carregada, o que perfeitamente corrobora os resultados experimentais, que sugerem um estado parcial de protonação. Esses resultados são muito úteis, no sentido de que a estratégia de fragmentação de uma estrutura peptídica helicoidal em fragmentos peptídicos helicoidais menores é capaz de fornecer resultados que concordam com medidas experimentais (no caso dados da RMN). Em particular,



esta estratégia pode ser muito útil quando se objetiva a modelagem molecular de estruturas peptídicas helicoidais, onde não se tem dados experimentais (como dados de RMN ou cristalografia de raios-X) que indiquem algum arranjo tridimensional definido, mas se tem uma idéia qualitativa do teor helicoidal (como, por exemplo, via espectros de dicroísmo circular). Não obstante esta estratégia de modelagem molecular quântica pode ser útil em situações nas quais, dependendo do peptídeo e do meio de análise, os dados de CD indicam estruturação helicoidal, mas efeitos intrínsecos ao peptídeo no meio, como equilíbrios monômero-oligômero, levam à formação de linhas largas, o que impossibilita a obtenção de correlações em espectros de NOESY e, portanto, inviabilizam determinações estruturais via RMN (Mendonça de Moraes *et al.*, 2008).

### **3.5.2 – Cálculos quânticos das constantes de blindagem da PS-2**

Uma vez obtidas as geometrias moleculares dos fragmentos F1, F2, F3 e F4, protonados ou não (seção 3.5.1, p. 125), realizaram-se cálculos DFT/B3LYP/6-31G\*\* das constantes de blindagem de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para esses núcleos (seção 2.6, p. 69). Após calculadas essas constantes de blindagem, realizou-se o agrupamento dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos resíduos selecionados em cada um dos fragmentos (resíduos que contemplam as interações de ligação de hidrogênio estabilizadoras da estrutura helicoidal – Tabela 2.3, p. 73). As comparações entre os valores de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  teóricos e experimentais determinados para a PS-2 são apresentados nas Figuras 3.33a e 3.33b (PS-2 protonada e neutra, respectivamente – p. 133).

Uma boa concordância é observada ao se compararem os deslocamentos químicos experimentais de RMN de  $^{13}\text{C}$  com os deslocamentos químicos DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3) e da PS-2(0), o que é confirmado pelos

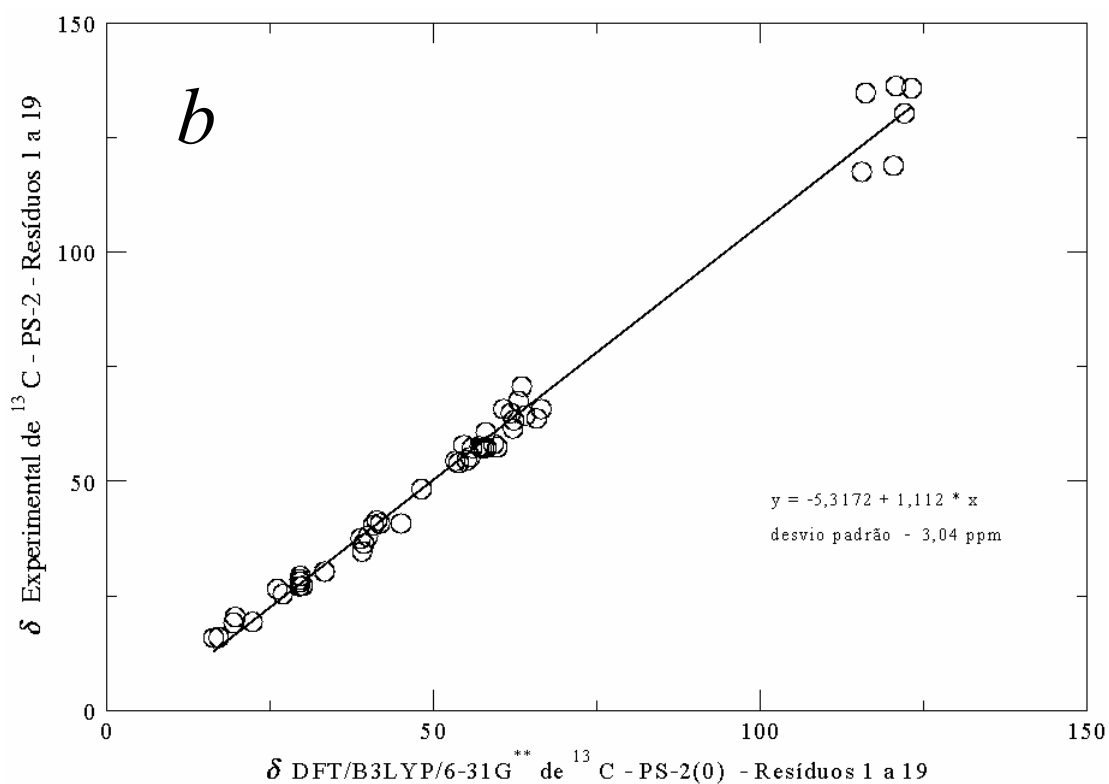
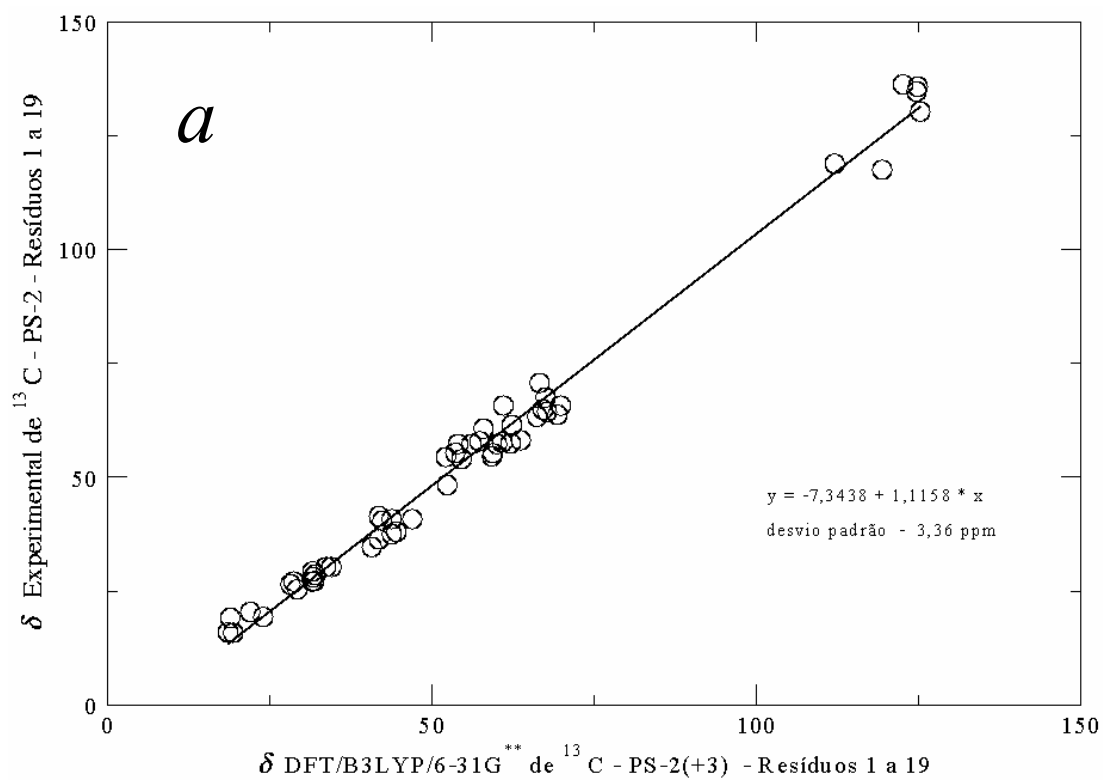


Figura 3.33 – Comparação entre os valores dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  experimentais da PS-2 e os respectivos valores DFT/B3LYP/6-31G\*\* da a) PS-2(+3) (protonada) e b) PS-2(0) (neutra).

coeficientes angulares das regressões lineares dos pontos, que apresentam valores próximos à unidade e, portanto, indicam a similaridade entre valores experimentais e teóricos. Não obstante, baixos valores de desvio padrão (menores que 3,4 ppm) são observados em ambas as regressões, o que indica o bom ajuste dos pontos. Quando comparados com o caso de uma concordância perfeita entre valores experimentais e teóricos (coeficientes linear e angular da reta iguais a 0 e 1, respectivamente), desvios padrões médios de 4,5 ppm e 4,4 ppm são observados para os deslocamentos químicos DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3) e PS-2(0), respectivamente. Esses resultados indicam erros médios menores que 4,5 ppm em uma escala de variação de deslocamento químico de aproximadamente 110 ppm, ou seja, tem-se um erro médio oriundo de 4%.

É bem conhecido o fato de que os deslocamentos químicos de núcleos do esqueleto peptídico são bastante sensíveis a variações na estrutura peptídica secundária. Dessa forma, deslocamentos químicos de núcleos como carbonos- $\alpha$  apresentam valores características de arranjos secundários definidos, como  $\alpha$ -hélices ou fitas- $\beta$  e definem, portanto, os índices de deslocamentos químicos (*chemical shift index* – Wishart *et al.*, 1992; ver também seção 3.3.2 – Figura 3.15). Uma vez que a PS-2 possui um segmento helicoidal muito bem definido, decidiu-se compararem os deslocamentos químicos experimentais e teóricos dos carbonos- $\alpha$ , sendo assim apresentada na Figura 3.34 (p.135), a comparação para a PS-2(0). Quando apenas os núcleos de C $\alpha$  são considerados, um ótimo acordo é observado, sendo um coeficiente angular inferior a 1,04 obtido na regressão linear dos pontos. Essa excelente concordância pode ser explicada pelo fato de que os átomos desses respectivos núcleos, por pertencerem em sua maioria ao esqueleto  $\alpha$ -helicoidal, têm suas posições relativas bem definidas na estrutura peptídica, uma vez que as interações estabilizadoras da hélice tendem a conservar esses átomos em um sistema de coordenadas internas mais rígido do que no caso

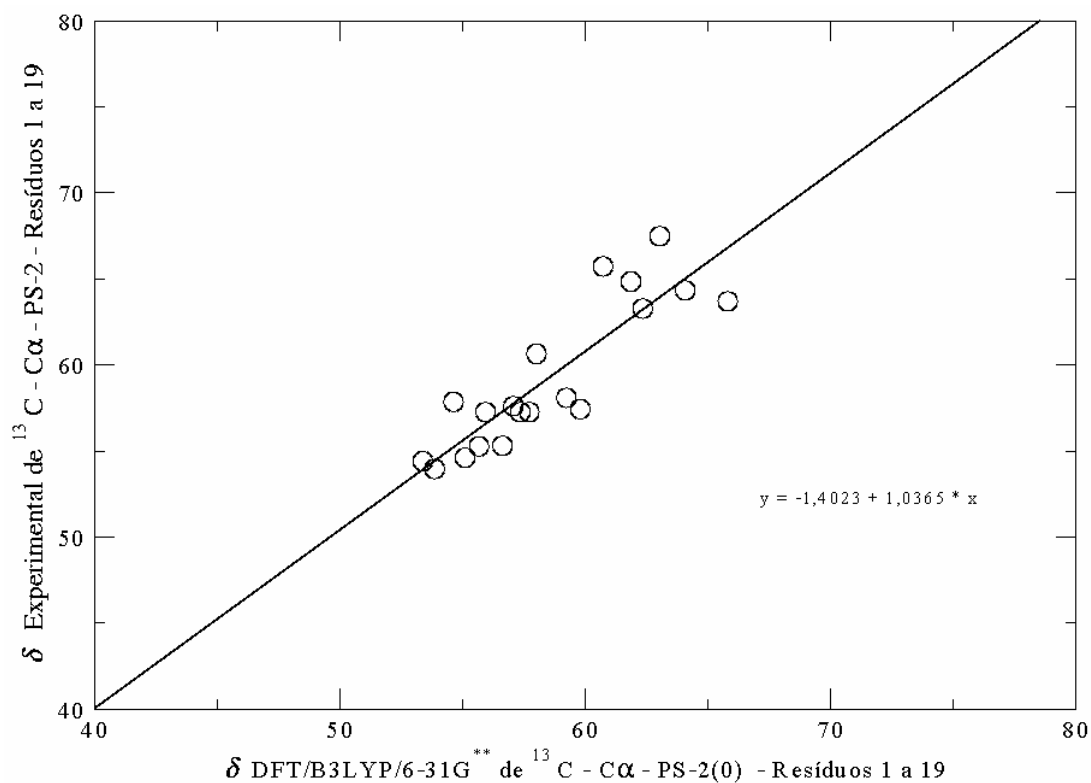


Figura 3.34 – Comparação entre os valores de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{C}\alpha$  experimentais da PS-2 e os respectivos valores DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(0) (neutra).

de outros átomos localizados nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Esse resultado, não obstante, confirma a eficiência da estratégia de fragmentação peptídica para a modelagem de estruturas peptídicas  $\alpha$ -helicoidais (seção 3.5.1, p. 125), uma vez que os deslocamentos químicos de carbonos- $\alpha$ , altamente sensíveis à classe de estruturação secundária, são reproduzidos com um grau de acuracidade bastante satisfatório.

Nas Figuras 3.35a e 3.35b (p. 136), os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  experimentais são comparados com os valores teóricos calculados para a PS-2(+3) e a PS-2(0), respectivamente. A inclinação da reta obtida pela linearização dos pontos para a PS-2(0) apresenta valor significativamente superior à unidade e um valor de desvio padrão médio (0,80 ppm) relativamente alto para a escala de deslocamento químico de  $^1\text{H}$ . Por outro lado, o coeficiente angular da reta de

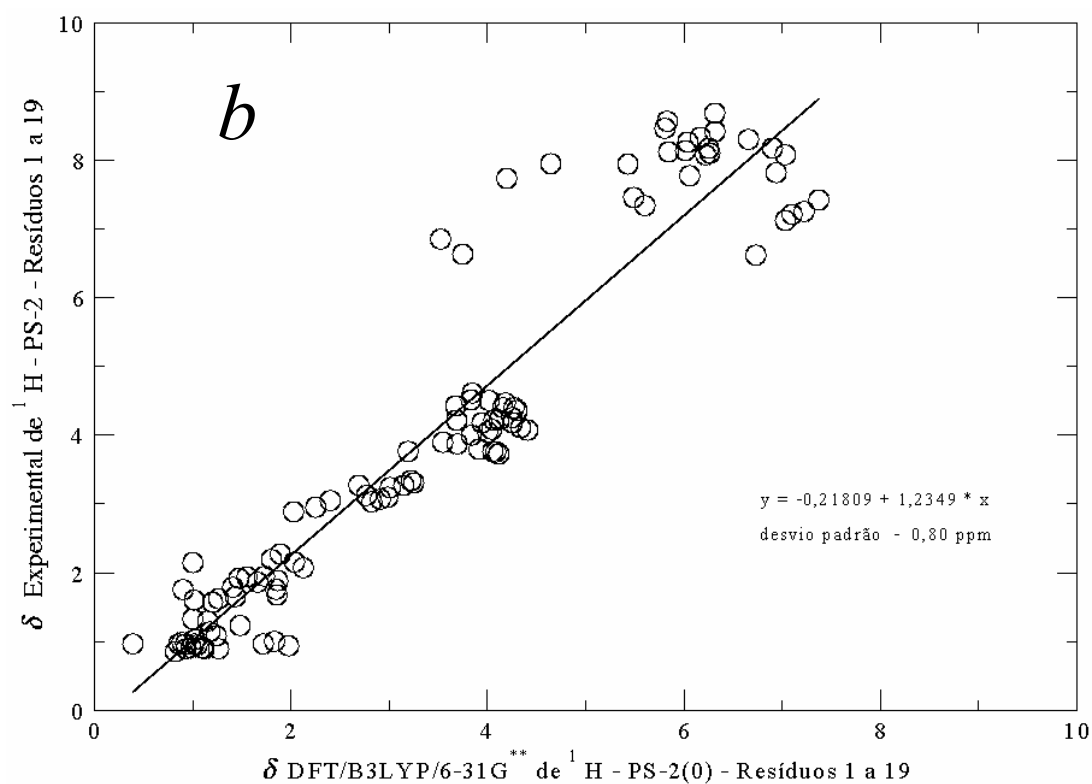
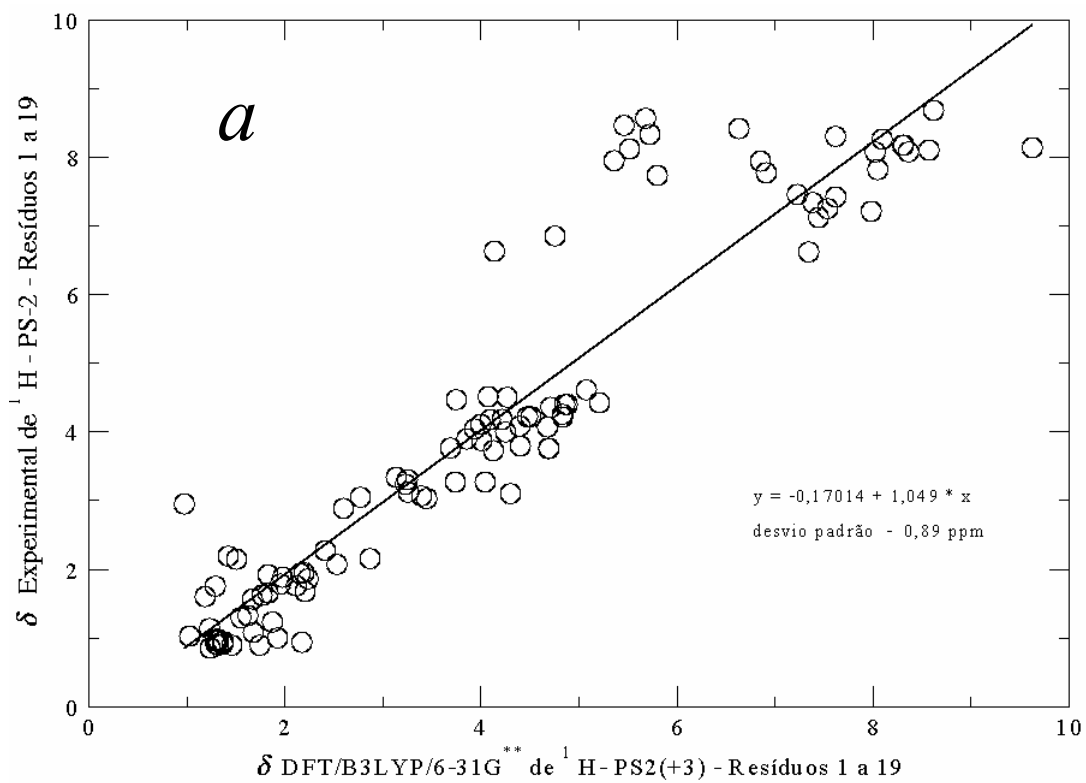


Figura 3.35 – Comparação entre os valores de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  experimentais da PS-2 e os respectivos valores DFT/B3LYP/6-31G\*\* da a) PS-2(+3) (protonada) e b) PS-2(0) (neutra).

linearização é bem próximo à unidade para a PS-2(+3), mas tal resultado não é satisfatório, uma vez que o desvio padrão médio apresenta um valor significativamente elevado (0,89 ppm) para a escala de deslocamento químico de  $^1\text{H}$ . Uma observação mais detalhada dos resultados indica que os maiores erros são associados aos hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio. Expurgando-se os deslocamentos químicos associados a esses átomos, obtêm-se, tanto para a PS-2(+3) (Figura 3.36a, p.138), quanto para a PS-2(0) (Figura 3.36b, p.138), coeficientes angulares próximos à unidade para as retas de linearização e, não obstante, valores de desvios padrões médios significativamente menores (0,45 ppm e 0,31 ppm) são observados.

Os resultados discutidos acima indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e teóricos para hidrogênios em estruturas peptídicas, desde que esses não estejam ligados a átomos nitrogênios. Percebe-se assim a existência de alguma falha no cálculo da propriedade de blindagem magnética para esses núcleos de  $^1\text{H}$  envolvidos em ligações N-H. Tal fato não é surpreendente, uma vez que estudos teórico-experimentais existentes na literatura mostram que efeitos de ligações de hidrogênio, ou mesmo fortes interações de dipolo permanente, intra ou intermoleculares envolvendo diferentes espécies atômicas (*e.g.* interações N-H...I, O-H...I, e N-H...O), têm um efeito bastante significativo nos valores das constantes de blindagem de RMN de  $^{17}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$  e  $^1\text{H}$  (Khodaei *et al.*, 2007). Devido à natureza eletrostática dessas interações, tensores de gradientes de campo elétrico e tensores de blindagem química dos sítios quadrupolares e magnéticos, respectivamente, se mostram bastante sensíveis a efeitos de ligações de hidrogênios em diversos sistemas e estruturas químicas, como no caso de carboidratos (Khodaei *et al.*, 2007) e proteínas (Samadi *et al.*, 2008). Estudos com peptídeos em soluções contendo solventes doadores ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ou receptores (acetona,  $\text{H}_2\text{O}$ ) de ligações de hidrogênio, indicam que a reprodução acurada de deslocamentos químicos de núcleos passíveis a esse tipo interação é bem representada, apenas quando se consideram as possíveis interações com as moléculas de solvente (Mennucci & Martinez, 2005). No caso

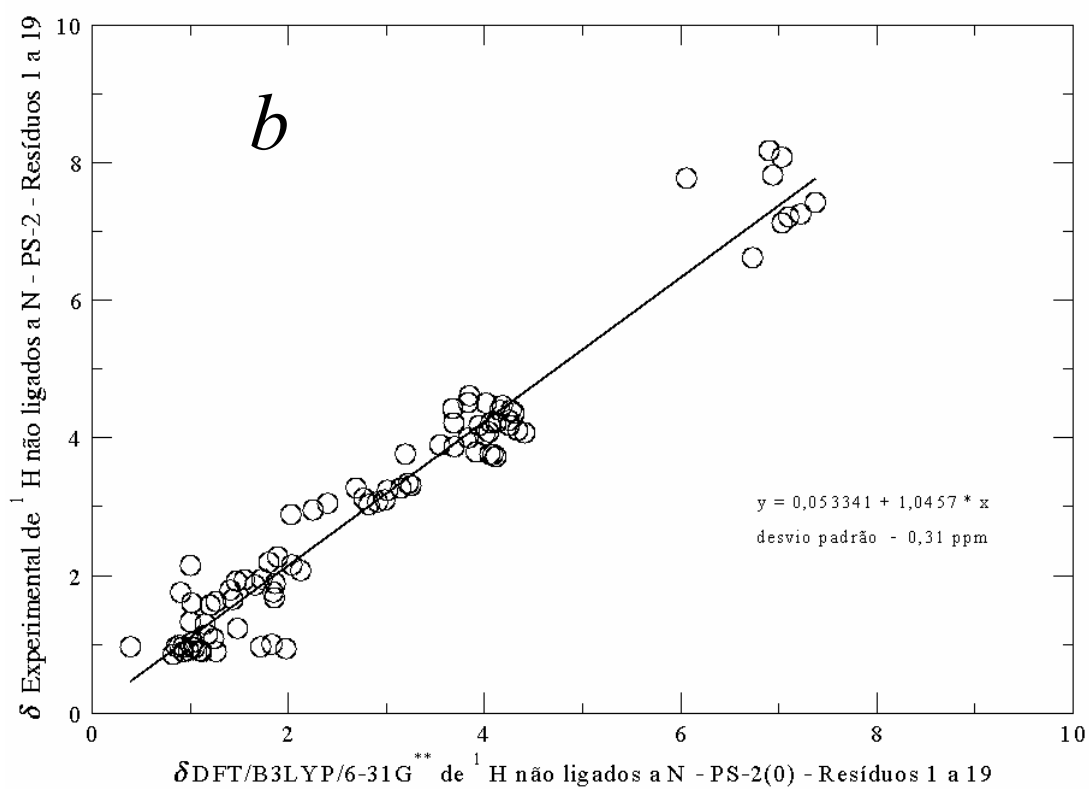
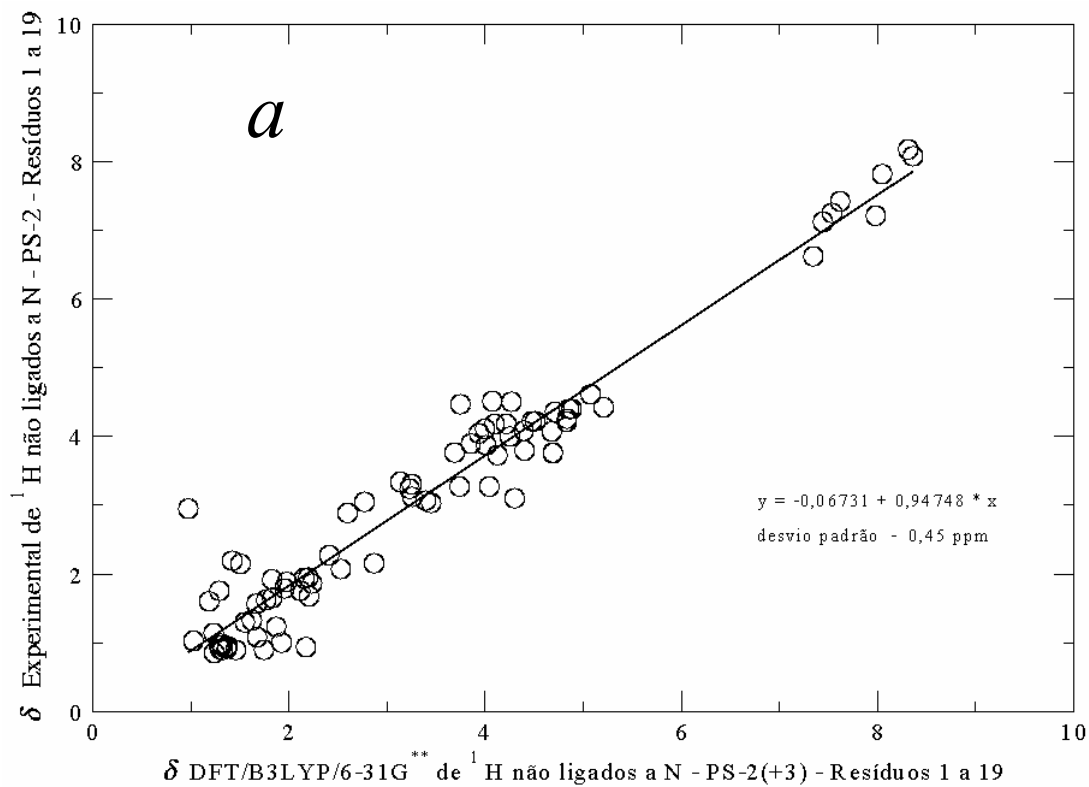


Figura 3.36 – Comparação entre os valores de deslocamentos químicos experimentais de  $^1\text{H}$  não ligados a N da PS-2 e os respectivos valores DFT/B3LYP/6-31G<sup>\*\*</sup> da *a*) PS-2(+3) (protonada) e *b*) PS-2(0) (neutra).

de proteínas em soluções aquosas, as moléculas de água da camada de solvatação imediatamente vizinha à superfície da proteína desempenham importantes efeitos nesse sentido (Nandi & Bagchi, 1997). Nessa camada de solvatação, encontram-se algumas poucas moléculas de solvente fortemente ligadas à proteína (estado ligado), enquanto que todas as outras possuem um movimento rotacional e translacional mais efetivo (estado livre) (Gregory, 1995). Portanto, as discrepâncias observadas entre os deslocamentos experimentais e teóricos de hidrogênios ligados a N podem ser atribuídas à não inclusão de interações de ligação de hidrogênio entre a proteína e as moléculas de solvente. No caso do sistema em estudo, tanto o TFE quanto a água podem interagir com o peptídeo via ligação de hidrogênio. Como o enfoque principal desta etapa do trabalho visa principalmente a proposta de uma estratégia simples, rápida e eficiente para a modelagem quântica de peptídeos helicoidais, decidiu-se trabalhar com as estruturas peptídicas sem a representação direta das moléculas de solvente, uma vez que tal representação acarretaria um custo computacional e complexidade muito elevados para os estudos realizados no nível (quântico) de interesse para sistemas com muitos átomos, como os fragmentos peptídicos aqui estudados.

Quando considerados apenas os deslocamentos químicos dos hidrogênios não ligados a átomos de nitrogênio, boas concordâncias entre valores experimentais e teóricos foram encontradas. Curiosamente, uma reta com inclinação inferior à unidade é obtida quando se comparam os deslocamentos experimentais com os da PS-2(+3) (Figura 3.36a, p.138), por outro lado, quando os resultados experimentais são comparados aos deslocamentos da PS-2(0) (Figura 3.36b, p.138), uma reta com inclinação superior à unidade é obtida. Apresenta-se a seguir a Figura 3.37 (p. 140), na qual são comparados os deslocamentos químicos experimentais de  $^1\text{H}$  da PS-2 com as médias entre os respectivos valores obtidos para a PS-2(+3) e a PS-2(0). A linearização dos pontos fornece uma reta com coeficiente angular intermediário aos obtidos para a PS-2(+3) e a PS-2(0), sendo esse valor obtido ainda mais próximo à unidade.



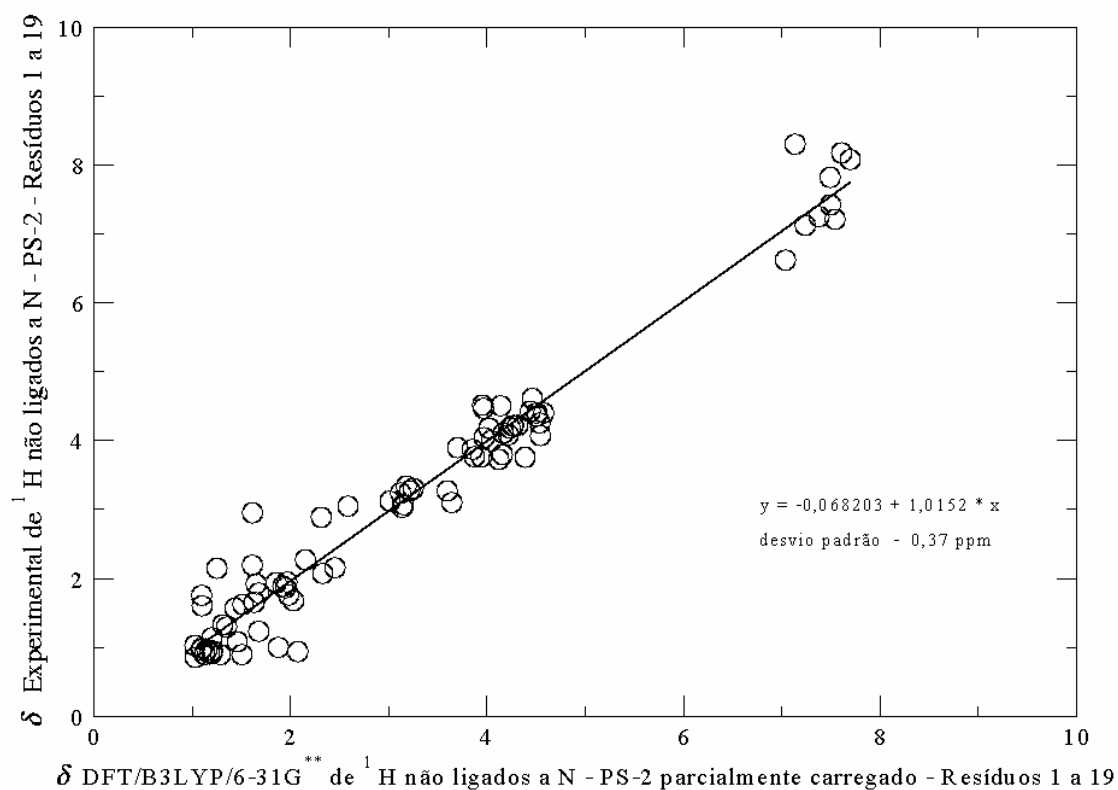


Figura 3.37 – Comparação entre os valores dos deslocamentos químicos experimentais de  $^1\text{H}$  da PS-2 e os valores médios entre os respectivos deslocamentos químicos DFT/B3LYP/6-31G\*\* da PS-2(+3) (protonada) e PS-2(0) (neutra).

Esses valores de deslocamentos químicos médios, podem ser considerados como uma representação dos deslocamentos químicos de um estado parcial de protonação nas três histidinas (50% de protonação). Um melhor ajuste dos pontos pode ser novamente associado a um estado parcial de protonação do peptídeo e essa observação está em acordo com as análises dos deslocamentos químicos experimentais de RMN (seção 3.3.2, p. 95) e com a comparação entre as estruturas *ab-initio* e as estruturas de RMN em solução (Figura 3.30, p. 95), que sugerem um estado parcial de protonação para a PS-2 na solução estudada.

Os resultados obtidos a partir dos cálculos DFT/B3LYP/6-31G\*\* de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da PS-2(+3) e da PS-2(0) mostram concordância satisfatória com relação aos resultados experimentais (salvo o caso de átomos de hidrogênios diretamente ligados a átomos de nitrogênio). Essa concordância fornece uma evidência extra da eficiência do método de fragmentação peptídica proposto neste trabalho (seção 2.6, p. 69), o qual

possibilita a modelagem de estruturas de peptídicas  $\alpha$ -helicoidais, utilizando-se de métodos de cálculos acurados da mecânica quântica. Conforme comentado anteriormente (seção 3.5.1, p. 125), essa estratégia de modelagem quântica pode ser útil em situações nas quais resultados qualitativos (ou semi-quantitativos), como dados de CD, indicam estruturação helicoidal, mas outros fatores experimentais impossibilitam a obtenção de dados que venham a fornecer as estruturas tridimensionais. Nesse momento, cálculos de deslocamentos químicos podem vir a fornecer importantes informações, pois as concordâncias entre valores experimentais e teóricos podem ser usadas para confirmar uma proposta estrutural teórica.

## 5 – Conclusão

Efetuar-se, no presente trabalho, diversos estudos estruturais e da interação com membranas dos peptídeos antimicrobianos catiônicos filoseptina 1, 2 e 3. Os peptídeos usados neste trabalho foram obtidos via estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, tendo sido esses purificados por cromatografia líquida de alta eficiência. A obtenção dos compostos de interesse foi confirmada por análise de espectrometria de massas.

Realizaram-se estudos estruturais qualitativos desses peptídeos via dicroísmo circular. Os resultados mostraram que as três filoseptinas não apresentam estruturação definida em meio aquoso, todavia, em misturas de água:TFE, observou-se que os peptídeos adotavam estruturas helicoidais. Não obstante, observou-se que esses peptídeos, quando em contato com vesículas de POPC:POPS (3:1), também apresentam segmentos helicoidais. Misturas de TFE e água, bem como vesículas fosfolipídicas são meios conhecidos por mimetizarem o ambiente de membranas e, portanto, os resultados obtidos sugerem que as filoseptinas, apesar de desestruturadas em meio aquoso, adquirem conformações helicoidais quando em contato com a superfície de membranas. Esse tipo de comportamento é muito comum em peptídeos antimicrobianos, uma vez que se sabe que tais compostos, quando em contato com a superfície de membranas, adquirem conformações bem definidas e então exercem suas atividades antimicrobianas.

Sabe-se que interações com membranas desempenham um importante papel durante o processo de ação antibiótica de peptídeos antimicrobianos catiônicos, tanto por perturbação e formação de poros, ou por permitir a passagem dos peptídeos para o interior da célula, onde eles interagem com outros alvos macromoleculares. O conhecimento sobre a estrutura tridimensional dos peptídeos em ambientes de membrana, é crucial à compreensão do possível mecanismo de ação desses compostos. Dessa forma, procedeu-se a determinação das estruturas tridimensionais das filoseptinas em um meio que mimetiza o ambiente da membrana (TFE:H<sub>2</sub>O – 60:40). Os resultados de RMN em solução (correlações de *nOe* características de estruturas secundárias, deslocamentos

químicos de núcleos e valores de  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ ) corroboram com a existência de segmentos helicoidais nos três peptídeos, o que foi inequivocamente confirmado pelo uso de cálculos estruturais que empregam uma rotina de *annealing* simulado, que leva em consideração restrições impostas pelos dados experimentais de RMN. As estruturas dos três peptídeos mostraram possuir segmentos helicoidais muito bem definidos, tendo sido observada a existência de um alto caráter anfipático nas três hélices peptídicas, sendo tal efeito mais notado para a PS-2.

Os dados de RMN em solução forneceram estruturas nas quais os segmentos helicoidais se estendem entre os resíduos 5 a 18 para a PS-1, 5 a 19 para a PS-2 e 5 a 15 para a PS-3. Esses resultados indicam um grau de estruturação que segue a ordem  $\text{PS-2} \geq \text{PS-1} > \text{PS-3}$ . De forma notável, a PS-2 e a PS-1 se apresentam mais estruturados que a PS-3, sendo tal diferença de ordenamento mais nítida nas proximidades da porção C-terminal, o que é de se esperar, uma vez que as diferenças nas três seqüências primárias ocorrem a partir do décimo quarto resíduo de aminoácido. Dentre os efeitos que se mostram importantes à estabilização estrutural das vizinhanças C-terminais da PS-2 e da PS-1, se têm as interações eletrostáticas entre cadeias laterais catiônicas e o momento de dipolo negativo resultante na porção C-terminal. Como a PS-2 e a PS-1 apresentam maior densidade de carga positiva nas proximidades da porção C-terminal que a PS-3, a estabilização da hélice é mais favorecida para os dois primeiros peptídeos. Outros tipos de interações nas vizinhanças C-terminais, como interações de aromáticas e *capping* de hélice (diferentes para a PS-1 e a PS-2), parecem promover a estabilização dessas porções peptídicas. Um outro componente que estabiliza a estrutura helicoidal nesses peptídeos é a presença da amidação C-terminal natural nesses compostos, a qual possibilita a formação de ligações de hidrogênio extras, que promovem a estruturação nas proximidades C-terminais. As estruturas obtidas a partir dos dados de RMN em solução indicam a existência de um alto caráter anfipático nas três hélices peptídicas, sendo esse efeito mais notado para a PS-2.

Com o objetivo de se entender o comportamento das filoseptinas quando em contato com membranas, se incorporaram os peptídeos (com marcações isotópicas seletivas de  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$ ) em bicamadas lipídicas de POPC e foram realizados experimentos de RMN de sólido com essas amostras. Tais estudos foram também realizados para a PS-2 incorporada em bicamadas lipídicas de POPC:POPS (3:1). Inicialmente se adquiriram espectros de  $^{31}\text{P}$  das moléculas de lipídeo da bicamada, e os resultados obtidos indicaram um alto grau de ordenamento da bicamada nas condições de estudo (1,0 mol% de peptídeo e umidade relativa de 93%). Os espectros de  $^{15}\text{N}$  obtidos para a PS-2 e a PS-3 indicaram que os sítios marcados com  $^{15}\text{N}$  mostram deslocamentos químicos característicos de orientações planares das hélices peptídicas em relação à superfície da membrana, todavia o valor de deslocamento químico observado para a PS-1 não é condizente com um alinhamento helicoidal peptídico perfeitamente planar. Adquiriram-se ainda experimentos de RMN de  $^2\text{H}$ , sendo que os desdobramentos quadrupolares, bem como as formas bem definidas linhas de ressonância, indicaram a existência de alinhamentos bem definidos dos peptídeos nas bicamadas lipídicas de POPC. Quando comparados os espectros de  $^2\text{H}$  da PS-2 em bicamadas de POPC e POPC:POPS (3:1), observam-se, no último caso, linhas de ressonância ainda mais definidas, o que indica que a carga negativa extra presente nas moléculas de POPS, parece intensificar a afinidade do peptídeo catiônico com a membrana aniônica. Quando as amostras tiveram suas orientações invertidas de  $90^\circ$  (i.e., orientações para a normal da membrana perpendicular ao campo magnético externo), os valores obtidos para os deslocamentos químicos de  $^{15}\text{N}$ , bem como os valores obtidos para o desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$ , indicaram que esses peptídeos apresentam um rápido movimento rotacional em torno da normal da membrana.

Embora não seja possível determinar precisamente a orientação dos peptídeos nas bicamadas usando-se o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  ou o desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  separadamente, os dois parâmetros forneceram restrições topológicas altamente complementares, as quais foram utilizadas em conjunto para se obter uma definição acurada sobre a orientação dos peptídeos

nas bicamadas lipídicas. No caso da PS-3, o desdobramento dipolar de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , obtido no espectro de PISEMA, possibilitou um outro conjunto de restrições angulares, que precisaram ainda mais as possíveis orientações desse peptídeo na bicamada lipídica. Observou-se que a PS-2 e a PS-3 se alinham paralelamente à superfície da membrana, sendo observado em ambos os casos uma perfeita separação entre as faces polar (em contato com as cabeças de fósforos) e apolar (inserida no interior apolar da membrana), o que reflete perfeitamente as estruturas peptídicas altamente anfipáticas determinadas por RMN em solução. Por outro lado, a hélice peptídica da PS-1 apresenta um pequeno, mas significativo, desvio da orientação planar, o que é explicado pelo fato de que tal arranjo possibilita a remoção do resíduo polar C-terminal da Asn-19 do interior hidrofóbico da hélice, sendo entretanto mantidas, para todas as outras cadeias laterais da hélice, a partição ideal entre resíduos polares e apolares na interface hidrofílica e hidrofóbica da membrana, respectivamente.

Após intercalados com os eixos helicoidais paralelos à superfície da membrana, os peptídeos catiônicos anfipáticos podem desenvolver atividades perturbadoras e de rompimento da membrana, ou ainda de partição no citoplasma, tendo-se então desenvolvidas as atividades antimicrobianas desses compostos. Resultados de RMN em fase sólida também indicaram, apesar do alto grau de orientação das bicamadas lipídicas, a formação de arranjos supramoleculares peptídeos-membrana que mostram alinhamento da normal da membrana perpendicular à normal da amostra, o que confirma a capacidade de perturbação da membrana exercida por esses peptídeos. Esses resultados estão em pleno acordo com modelos como o do “carpete” ou “detergente”, onde efeitos como o da difusão lateral e da adsorção preferencial de algumas moléculas de lipídio levam à desestabilização da estrutura da membrana em áreas associadas a diâmetros de vários nanômetros, causando efeitos como o colapso da resistência ôhmica da membrana e a formação de estruturas micelares ao longo da bicamada, tendo-se assim a formação de poros e o aumento da permeabilidade, bem como o rompimento da membrana.

Apesar da significativa homologia entre as seqüências primárias das filoseptinas 1, 2 e 3, relevantes diferenças estruturais são observadas ao se compararem as estruturas obtidas por RMN em solução para esses compostos. Além dessas diferenças estruturais, alguns detalhes nas composições das seqüências peptídicas fazem com que ocorram diferenças sutis entre os arranjos topológicos desses peptídeos. Tais diferenças são muito vantajosas para o animal, uma vez que o armazenamento de coquetéis de agentes antimicrobianos possibilita uma maior gama de ação, tendo-se assim um mecanismo de defesa que é bem eficiente frente a diferentes microrganismos. Ao mesmo tempo, a liberação de misturas de compostos antimicrobianos possibilita a ação sinérgica de combinações de peptídeos, podendo-se ter uma eficiência ainda maior.

Neste trabalho, foram ainda realizados estudos DFT/B3LYP/6-31G\*\* de modelagem da estrutura molecular da PS-2. Empregou-se em tal estudo, uma estratégia de partição da estrutura peptídica em segmentos helicoidais menores contendo nove ou dez resíduos de aminoácidos. Nesses segmentos helicoidais menores, ou fragmentos, os resíduos selecionados foram contemplados com a estabilização proporcionada por todas as interações possíveis num intervalo de resíduos “ $i, i+4$ ”, as quais são conhecidas por estabilizar o arranjo helicoidal de estruturas peptídicas. Uma vez otimizadas as geometrias dos fragmentos, os resíduos selecionados foram então agrupados e a estrutura *ab-initio* da PS-2 foi finalmente obtida. Cálculos usando essa estratégia foram realizados para fragmentos nos quais se consideraram a neutralidade de carga, ou ainda a presença de uma carga resultante positiva, em cada um dos três resíduos de histidina desse peptídeo. Geometrias similares às obtidas por RMN em solução, foram obtidas na modelagem quântica da PS-2(0) neutra e da PS-2(+3) protonada, entretanto, de forma notável, uma semelhança ainda maior é observada quando se comparam às estruturas de RMN, a estrutura média entre as geometrias *ab-initio* da PS-2(0) e da PS-2(+3). Esse resultado está em pleno acordo com os dados experimentais, que sugerem um estado parcial de protonação para as histidinas da PS-2 nas condições estudadas por RMN em solução. As concordâncias obtidas entre os resultados experimentais e os

resultados dos cálculos DFT são muito úteis no sentido de que a estratégia de fragmentação proposta é capaz de fornecer resultados bastante plausíveis, quando se objetiva a modelagem molecular de estruturas peptídicas helicoidais. Tal estratégia se mostra bastante promissora para situações nas quais não se possuem dados experimentais (como dados de RMN ou cristalografia de raios-x) que indiquem algum arranjo tridimensional definido, mas se tem uma idéia qualitativa do teor helicoidal (como, por exemplo, via espectros de dicroísmo circular) de um determinado peptídeo.

Com a finalidade de fundamentar a eficiência da modelagem quântica de peptídeos helicoidais proposta neste trabalho, bem como de checar a possibilidade de tal estratégia poder vir a auxiliar a atribuição de sinais em espectros de RMN, foram realizados cálculos DFT/B3LYP/6-31G\*\* das constantes de blindagem dos fragmentos peptídicos da PS-2(0) neutra e da PS-2(+3) protonada. Após reunidos os resíduos de aminoácidos selecionados em cada um dos fragmentos peptídicos, observam-se boas concordâncias entre os valores experimentais e teóricos dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Os resultados obtidos suportam a eficiência da estratégia de fragmentação peptídica proposta para a modelagem molecular de estruturas helicoidais, uma vez que propriedades tão sensíveis a arranjos conformacionais, como deslocamentos químicos de núcleos, podem ser reproduzidas com uma boa acuracidade a partir dos modelos quântico-teóricos em estudo. Além desse fator, a comparação entre deslocamentos químicos experimentais e teóricos pode se apresentar muito útil em estudos estruturais de peptídeos. Uma aplicação promissora seria, por exemplo, em situações nas quais, dependendo do peptídeo e o meio de análise, linhas largas de ressonância são obtidas, o que acaba por impossibilitar a obtenção de correlações em espectros de NOESY e portanto inviabilizam determinações estruturais via RMN. Nesses casos, a determinação de deslocamentos químicos nos experimentos unidimensionais de RMN, utilizando-se de diversas estratégias físicas e químicas (*e.g.* pulsos seletivos em RMN, marcações isotópicas seletivas), possibilitaria a comparação entre os valores experimentais com os valores teóricos obtidos para diferentes arranjos e levaria



assim à possibilidade de se apresentar uma estrutura, ou proposta estrutural, para o peptídeo em estudo.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aisenbrey, C.; Bertani, P.; Henklein, P.; Bechinger, B. Structure, dynamics and topology of membrane polypeptides by oriented  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 36, 451-460, **2007**.

Aisenbrey, C.; Kinder, R.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J. M.; Bechinger, B. Interactions involved in the realignment of membrane-associated helices: An investigation using oriented solid-state NMR and ATR-FTIR spectroscopies topologies, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 7708-7716, **2006**.

Aisenbrey, C.; Bechinger, B. Tilt and rotational pitch angle of membrane-inserted polypeptides from combined  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry*. **43**: 10502-10512, **2004a**.

Aisenbrey, C.; Bechinger, B. Investigations of polypeptide reotational diffusion in aligned membranes by  $^{15}\text{N}$  and  $^2\text{H}$  solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. **126**: 16676-16683, **2004b**.

Andrew, E. R.; Szczesniak, E. A Historical Account of NMR in the Solid State. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28 (1), 11-16, **1995**.

Ali, M. F.; Soto, A. M.; Knoop, F. C.; Conlon, J. M. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog *Xenopus tropicalis* (Pipidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1550, 81-89, **2001**.

Armstrong, K. M; Baldwin, R. L. Charged histidine affects alpha-helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges, *Proceedings of the national academy of sciences of the U. S. A.*, 90, 11337-11340, **1993**.

Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. Two-dimensional Spectroscopy. Application to Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the Chemical Physics* 64 (5), 2229-2246, **1976**.

Aurora, R.; Rose, G. D. Helix capping, *Protein Science*, 7, 21-38, **1998**.

Barjat, H.; Mattiello, D. L.; Freeman, R. Suppression of radiation damping in NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 136, 114-117, **1999**.

Barra D.; Simmaco M. Amphibian skin: a promising resource for antimicrobial peptides. *Trends in Biotechnology*., 13, 205-209, **1995**.

Bax, A. *Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids*. Terceira edição. Editora D. Reidel Publishing Company, **1985**.

Bax, A.; Davis, D. G. MLEV-17-Based Two Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 65, 355-360, **1985**.

Bax, A., Freeman, R. Investigation of Complex Networks of Spin-Spin Coupling by Two-Dimensional NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 44, 542-561, **1981**.

Bechinger, B. Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides. A <sup>31</sup>P solid-state NMR spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712, 101-108, **2005**.

Bechinger, B. Membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 23, 271-292, **2004**.

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

Bechinger, B. Towards membrane protein design: pH sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, 263, 768-775, **1996**.

Bechinger, B.; Lohner, K. Detergent-like action of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1756, 1529-1539, **2006**.

Bechinger, B.; Aisenbrey, C.; Bertani, P. The alignment, structure and dynamics of membrane-associated polypeptides by solid-state NMR spectroscopy *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 190-204, **2004**.

Bechinger, B.; Sizun, C. Alignment and structural analysis of membrane polypeptides by  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy. *Concepts in Magnetic Resonance*, 18A, 130-145, **2003**.

Bechinger, B., Zasloff, M., and Opella, S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state NMR spectroscopy, *Protein Science*, 2, 2077-2084, **1993**.

Bechinger, B.; Opella, S. J. Flat-coil probe for NMR spectroscopy of oriented membrane samples. *Journal of Magnetic Resonance*, 95, 585-588, **1991**.

Beck, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic-Behavior. *Physical Review .A*, 38, 3098-3100, **1988**.

Becker, E. D. *High Resolution NMR – Theory and Chemical Applications*, Terceira Edição, Editora Academic Press, **2000**.

Bendall, M. R.; Pegg, D. T. Distortionless Complete accurate editing of decoupled  $^{13}\text{C}$  spectra using DEPT and quaternary-only sequence. *Journal of Magnetic Resonance*, 53, 272-296, **1983**.

Berger, S.; Braun, S. *200 and more basic NMR experiments: A practical course* Wiley-VCH, **2004**.

Bertrand, R. D.; Momz, W. B.; Garronay, A. N.; Chingas, G. C. *Journal of the American Chemical Society*, 26, 283-295, **1978**.

Bhattacharyya, R.; Samanta, U.; Chakrabarti, P. Aromatic-aromatic interactions in and around alpha-helices, *Protein Engineering*, 15, 91-100, **2002**.

Bodenhausen, G.; Kogler, H.; Ernst, R. R. *Selection of coherence-transfer pathways in NMR experiments. Journal of Magnetic Resonance*, 58, 370-388, **1984**.

Boman, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Reviews of Immunology*, 13, 61-92, **1995**.

Breitmaier, E.; Sphon, K. H.; Berger, S.  $^{13}\text{C}$  Spin-Lattice Relaxation Times and the Mobility of Organic Molecules in Solution. *Angewandte Chemie – International Edition*, 14, 144-159, **1975**.

Breitmaier, E.; Voelter W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. Terceira Edição. Editora John Wiley and Sons, **1986**.

Buck, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 31, 297-355, **1998**.

Butterfield, S. M., Patel, P. R., and Waters, M. L. (2002) Contribution of aromatic interactions to alpha-helix stability, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 9751-9755, **2002**.

Cabréé, P. *Optical rotatory dispersion and circular dichroism in organic chemistry*. Editora Holden-Day, São Francisco (EUA), **1965**.

Caffrey, M. S.; Cusanovich, M. A. Lysines in the amino-terminal alpha-helix are important to the stability of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c<sub>2</sub>, *Biochemistry*, 30, 9238-9241, **1991**.

Carver, T. R.; Slichter, C. P. Polarization of nuclear spins in metals. *Physical Review*, 102, 975-980, **1956**.

Carver, T. R.; Slichter, C. P. Polarization of nuclear spins in metals. *Physical Review*, 92, 212-213, **1953**.

Cavanagh, H. J.; Fair Brother, W. S.; Palmer III, A. G.; Rance, M.; Skelton, N. J. *Principles and Practice Protein NMR Spectroscopy*. Segunda edição. Editora Elsevier Academic Press, Burlington (EUA), **2007**.

Caprino, L. A.; Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry*, 37, 3404-3409, **1972**.

Carver, J. A. and Collins, J. G. NMR identification of a partial helical conformation for bombesin in solution, *European Journal of Biochemistry*, 187, 645-650, **1990**.

Castellani, F.; van Rossum, B.; Diehl, A.; Schubert, M.; Rehbein, K. Oschkinat, H. Structure of a protein determined by solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. *Nature*, 420, 98-102, **2002**.

Chan, W. C.; White, P. D. – *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach*. Editora Oxford University Press, **2000**.

Chelli, R.; Gervasio, F. L.; Procacci, P.; Schettino, V. Stacking and T-shape competition in aromatic-aromatic amino acid interactions, *Journal of the American Chemical Society*, 124, 6133-6143, **2002**.

Chen, Y. H., Yang, J. T., and Chau, K. H. Determination of the helix and b form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry*, 13, 3350-3359, **1974**.

Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Editora Pergamon, **1999**.

Cohen, J. S.; Jaroszewski, J. W.; Kaplan, O.; Ruiz-Cabello, J.; Collier, S. W. A History of Biological Applications of NMR Spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28 (1), p.53-85, **1995**.

Cross, T. A. Solid-state nuclear magnetic resonance characterization of gramicidin channel structure. *Methods in Enzymology*, 289, 672–98, **1997**.

Csordas A.; Michl H. Isolation and structure of an hemolytic polypeptide from defensive secretion of European *Bombina* species. *Montsh. Chem.*, 101, 182-189, **1970**.

Dathe, M.; Schümann, M.; Wieprecht, T.; Winkler, A.; Beyermann, M.; Krause, E.; Matsuzaki, K.; Murase, O.; Bienert, M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry*, 35, 12612-12622, **1996**.

Davis, A. L.; Keeler, J.; Laue, E. D.; Moskau, D. Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance*, 98, 207-216, **1992**.

Davis, J.H.; Jeffrey, K. R.; Bloom, M.; Valic, M. I. Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters*, 42, 390-394, **1976**.

Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G; Pfeifer, J.; Bax, A. NMRPipe: A Multidimensional Spectral Processing System Based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6, 277-293, **1995**.

Derome, A.E.; Williamson, M.P. Rapid-pulsing artifacts in double-quantum filtered COSY. *Journal of Magnetic Resonance*, 88, 177-185, **1990**.

Derome, A. E. *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*. Editora Pergamon, **1987**.

Ding, F. X.; Schreiber, D.; VerBerkmoes, N. C.; Becker, J. M.; Naidler, F. The chain length dependence of helix formation of the second transmembrane domain of a g protein-coupled receptor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 14483-14492, **2002**.



Ditchfield, R. Self-consistent field perturbation-theory of diamagnetism 1. Gauge-invariant LCAO method for NMR chemical-shifts. *Molecular Physics*, 27, 789-807, **1974**.

Doddrell, D. M.; Pegg, D. T.; Bendall, M. R. Distortionless Enhancement by Polarization Transfer. *Journal of Magnetic Resonance*, 48, 323-327, **1982**.

Doreleijers, J. F. Validation of biomolecular NMR structures. - ICEX – Utrecht University, Países Baixos, **1999** (Tese de Doutorado).

Duclohier, H.; Molle, G.; Spach, G. Antimicrobial Peptide Magainin I from *Xenopus* Skin Forms Anion-Permeable Channels in Planar Lipid Bilayers, *Biophysical Journal*, 56, 1017-1021, **1989**.

Eisberg, R.; Resnick, R. *Quantum Physics of Atoms, Molecules, Solids, Nuclei, and Particles*. Editora John Wiley and Sons, 1974.

Emsley, J. W.; Feeney, J. Milestones in the First Fifty Years of NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28 (1), 1-9, **1995**.

Ernst, R. R.; Anderson, W. A. Application of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Review of Scientific Instruments*, 37, 93, **1966**.

Farrar, T. C. Density matrices in NMR spectroscopy: Part I. *Concepts in Magnetic Resonance*, 2, 1-12, **1990a**.

Farrar, T. C. Density matrices in NMR spectroscopy: Part II. *Concepts in Magnetic Resonance*, 2, 55-61, **1990b**.

Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. 25. Supplementary Functions for Gaussian-Basis Sets. *Journal of Physical Chemistry*, 80, 3265-3269, **1984**.

Fribolin, H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, Terceira Edição, Editora Wiley-VCH, **1998**.

Fu, R.; Cross, T. A. Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of protein and polypeptide structure. *Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 235–268, **1999**.

Gil, V. M. S. Gerales; C. F. G. C. *Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações*. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. Segunda edição, **2002**.

Giovannini, M. G.; Poulter, L.; Gibson, B. W.; Williams, D. H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochemical Journal*, 243, 113-120, **1987**.

Goldstein, H. *Classical Mechanics*. Adisson-Wesley publishing company, **1959**.

Greenfield, N.; Fasman, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8, 4108-4116, **1969**.

Gregory, R. *Protein-solvent interactions*. Dekker, Nova Iorque, **1995**.

Günther, H. *NMR spectroscopy – basic principles, concepts and applications in chemistry*. Segunda Edição. Editora John Wiley and Sons, **1998**.

Hallock, K. J., Henzler, W. K., Lee, D. K., and Ramamoorthy, A. An Innovative Procedure Using a Sublimable Solid to Align Lipid Bilayers for Solid-State NMR Studies. *Biophysical Journal*, 82, 2499-2503, **2002**.

Hara, T.; Mitani, Y.; Tanaka, K.; Uematsu, N.; Takakura, A.; Tachi, T.; Kodama, H.; Kondo, M.; Mori, H.; Otaka, A.; Nobutaka, F.; Matsuzaki, K. Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study. *Biochemistry*, 40, 12395-12399, **2001**.

Harris, R. K. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: A Physicochemical View* Editora Logman Scientific and Technical, **1987**.

Hartmann, S. R.; Hahn, E. L. Nuclear double resonance saturation and rotary saturation in solids. *Physical Review*, 98, 1787-1809, **1955**.

Harzer, U.; Bechinger, B. Alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: A CD, N-15 and P-31 solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biochemistry*, 39, 13106-13114, **2000**.

Hediger, S.; Meier, B. H.; Ernst, R. R. Adiabatic-passage Hartmann-Hahn cross polarization in NMR under magic angle sample spinning. *Chemical Physics Letters*, 249, 449-456, **1995**.

Hediger, S.; Meier, B. H.; Kurur, N. D.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R. NMR cross polarization by adiabatic-passage through Hartmann-Hahn condition (APHH). *Chemical Physics Letters*, 223, 283-288, **1994**.

Helgaker, T. *et al.* "DALTON, a molecular electronic structure program, Release 2.0, **2005**, <http://www.kjemi.uio.no/software/dalton/dalton.html>

Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous electron gas. *Physical Review B*, 136, 864-871, **1964**.

Holak, T. A., Engstrom, A., Kraulis, P. J., Lindeberg, G., Bennich, H., Jones, T. A., Gronenborn, A. M., and Clore, G. M. The solution conformation of the

antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study, *Biochemistry*, 27, 7620-7629, **1988**.

Homans, S. W. *A dictionary in NMR concepts*. Versão revisada. Editora Claredon Press, **1995**.

Huang, H. W. Action of antimicrobial peptides: Two-state model, *Biochemistry*, 39, 8347-8352, **2000**.

Huang H. W.; Chen F. Y.; Lee, M. T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Physical Review Letters*, 14, 198, **2004**.

Hwang, P. M. Vogel, H. J. Structure-function relationships of antimicrobial peptides, *Biochem Cell Biol*, 76, 235-246, **1998**.

Hyberts, S. G., Goldberg, M. S., Havel, T. F., and Wagner, G. The Solution Structure of Eglin C Based on Measurements of Many NOEs and Coupling Constants and its Comparison with X-Ray Structures, *Protein Science*, 1, 736-751, **1992**.

Jansík, B. *Density Functional Theory for Molecular Properties*, Tese de Doutorado, Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suécia, 2004.

Jaroniec, C. P.; MacPhee, C. E.; Bajaj, V. S.; McMahon, M. T.; Dobson, C. M.; Griffin, R. G. High-resolution molecular structure of a peptide in an amyloid fibril determined by magic angle spinning NMR spectroscopy, *Proceedings of the national academy of sciences of the U. S. A.*, 101, 711-716, **2004**.

Jasanoff, A.; Fersht, A.R. Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. *Biochemistry*, 33, 2129-2135, **1994**.

Johnson, B. A.; Blevins, R. A. NMRVIEW: a computer program for the visualization and analysis of NMR data, *Journal of Biomolecular NMR*, 4, 603-614, **1994**.

Johnson, W.C. Secondary structure of proteins through circular-dichroism spectroscopy. *Annual Reviews of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 17, 145-166, **1988**.

Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., and Nagasawa, H. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone, *Peptides*, 23, 1537-1546, **2002**.

Kent, S. B. H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annual Reviews in Biochemistry*, 57, 957-989, **1988**.

Kessler, H.; Gehrke, M.; Griesinger, C. Two dimensional NMR spectroscopy: background and overview of the experiments, *Angewandte Chemie – International Edition*, 27 490-536, **1988**.

Khodaei, S.; Hadipoura, N. L.; Kasaai, M. R. Theoretical investigation of hydrogen bonding effects on oxygen, nitrogen, and hydrogen chemical shielding and electric field gradient tensors of chitosan/HI salt. *Carbohydrate Research*, 342, 2396-2403, 2007.

Kingsley, P. B. Product operators, coherence transfer pathways and phase cycling. Part III: phase cycling *Concepts in Magnetic Resonance*, 7, 167-192, **1995**.

Kohn, W.; Beck, A. D.; Parr, R. G. Density Functional Theory of Electronic Structure. *Journal of Physical Chemistry*, 100, 12974-12980, **1996**.

Kohn, W.; Sham, L. J. Quantum Density Oscillations in an Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review A*, 138, 1697-1705, **1965**.

Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *Journal of Molecular Graphics*, 14, 51-32, **1996**.

Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules, *Biochem Biophys Res Commun*, 95, 1-6, **1980**.

Kuchinka, E. and Seelig, J. Interaction of melittin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation, *Biochemistry*, 28, 4216-4221, **1989**.

Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R.; Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR, *Journal of Biomolecular NMR*, 8, 477-486, **1996**.

Lee, C.; Yang W. T.; Parr, E. R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Physical Review B*, 37, 785-789, **1988**.

Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Rodrigues, M. I. S.; Prates, M. V.; Brand, G. D.; Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Bocca, A. L.; Albuquerque, S.; Bloch Jr., C. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*, 26 (4), 565-563, **2005**.

Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, Terceira Edição. Editora Allyn and Bacon, **1983**.

Levitt, M. H. *Spin dynamics – Basis of nuclear magnetic resonance*. Editora John Wiley & Sons, Chichester (Reino Unido), **2006**.

Lula, I.; Denadai, A. L.; Resende, J. M.; de Sousa, F. B.; de Lima, G. F.; Piló-Veloso, D.; Heine, T.; Duarte, H. A.; Santos, R. A. S.; Sinisterra, R. D. Study of Angiotensin (1-7) vasoactive peptide and its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence specific NMR assignments and structural studies. *Peptides*, 28, 2199-2210, **2007**.

Macomber, R. S. *A complete introduction to modern NMR spectroscopy*. Editora Wiley-Interscience, **1998**.

Marassi, F. M.; Opella, S. J. Simultaneous assignment and structure determination of a membrane protein from NMR orientational restraints. *Protein Science*, 12, 403-411, **2003**.

Marion, D.; Ikura, M.; Tschudin, R.; Bax, A. Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 85, 393-399, **1989**.

Marion, D.; Zasloff, M.; Bax, A. A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Letters*, 227, 21-26, **1988**.

Markley, J. L. Observation of Histidine Residues in Proteins Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Accounts of Chemical Research*, 8, 70-80, **1975**.

Mason, A. J.; Marquette, A.; Bechinger, B. Zwitterionic phospholipids and steroids modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization. *Biophysical Journal*, 93, 4289-4299, **2007**.

Mason, A. J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B. The antibiotic and DNA transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes, *FASEB Journal*, 20, 320-322, **2005**.

Mason, A. J., Gasnier, C., Kichler, A., Prevost, G., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H., and Bechinger, B. Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 3305-3311, **2006**.

Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376, 391-400, **1998**.

Matsuzaki, K.; Nakamura, A.; Murase, O.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge, *Biochemistry*, 36, 2104-2111, **1997**.

Matsuzaki, K., Harada, M., Handa, T., Funakoshi, S., Fujii, N., Yajima, H., and Miyajima, K. Magainin 1-Induced Leakage of Entrapped Calcein Out of Negatively-Charged Lipid Vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 981, 130-134, **1989**.

McGaughey, G. B., Gagne, M., and Rappe, A. K.  $\pi$ -Stacking interactions. Alive and well in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15458-15463, **1998**.

Mendonça de Moraes, C; Verly, R. M.; Resende, J. M.; Aisenbrey, C.; Bemquerer, M. P.; Piló-Veloso, D.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Bechinger, B. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin k by multidimensional solution and oriented  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical Journal*, artigo submetido, **2008**.



Mendonça Moraes, C.; Bechinger, B. Peptide-related alterations of membrane-associated water: deuterium solid-state NMR investigations of phosphatidylcholine membranes at different hydration levels. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 42, 155-161, **2004**.

Mennucci, B.; Martínez, J. M. How to model solvation of peptides? Insights from a quantum mechanical and molecular dynamics study of *N*-methylacetamide. 2.  $^{15}\text{N}$  and  $^{17}\text{O}$  nuclear shieldings in water and in acetone. *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 9830-9838, **2005**.

Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2149-2154, **1963**.

Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. II. The Synthesis of Bradykinin, *Journal of the American Chemical Society*, 86, 304-305, **1964**.

Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron*, 61, 10827-10852, **2005**.

Morris, G. A.; Freeman, R. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *Journal of the American Chemical Society*, 101, 760-762, **1979**.

Mueller, K. T.; Sun, B. Q.; Chingas, G. C.; Zwanziger, J. W.; Terao, T.; Pines, A. Dynamical-angle spinning of quadrupolar nuclei. *Journal of Magnetic Resonance*. 86, 470-487, **1990**.

Müller, L. Sensitivity Enhanced Detection of Weak Nuclei Using Heteronuclear Multiple Quantum Coherence. *Journal of the American Chemical Society*, 111 (16), 4481-4484, **1979**.

Nandi, N.; Bagchi, B. Dielectric relaxation of biological water. *Journal of Physical Chemistry B*, 101, 10954-10961, **1997**.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Editora W. H. FREEMAN & CO., Quarta Edição, **2004**.

Norwood, T. J. Magnetic Field Gradients in NMR: Friend or Foe? *Chemical Society Reviews* 59-66, **1994**.

Overhauser, A. W. Polarization of nuclei in metals. *Physical Review*, 92, 411-415, **1953**.

Pake, G. E.. Nuclear resonance absorption in hydrated Crystals: Fine structure of the proton line. *Journal of Chemical Physics*, 16, 327-336, **1948**.

Piantini, U.; Sørensen, O. W.; Ernst, R. R. Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *Journal of the American Chemical Society*, 104, 6800-6801, **1982**.

Pines, A.; Gibby, M. G.; Waugh, J. S. Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *Journal of Chemical Physics*, 59, 569-590, **1973**.

Piotto, M.; Saudek, V; Sklenar, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR*, 2, 661-665, **1992**.

Prieto, J.; Serrano, L. C-capping and helix stability: the Pro C-capping motif, *Journal of Molecular Biology*, 274, 276-288, **1997**.

Ramamoorthy, A, Wu, C. H., Opella, S. J. Experimental aspects of multidimensional solid-state NMR correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Series*, 140, 131-140, **1999**.

Rance, M.; Byrd, R.A. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 52, 221-240, **1983**.

Redfield, A. G. Nuclear spin thermodynamics in the rotating frame. *Science*, 164, 1015, **1969**.

Redfield, A. G. Nuclear magnetic resonance saturation and rotary saturation in solids. *Physical Review*, 98, 1787-1809, **1955**.

Resende, J. M. Estudos por Ressonância Magnética Nuclear de Derivados de Furanoditerpeno Extraído de *Pterodon polygalaeflorus* BENTH. Departamento de Química - ICEX - UFMG, 2003 (Monografia de Bacharelado).

Resende, J. M. Timol: estudos conformacionais e da parametrização de experimentos de RMN e determinação *ab-initio* de constantes de blindagem. Departamento de Química - ICEX - UFMG, **2004** (Dissertação de Mestrado).

Rinaldi, A. C. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6, 799-804, **2002**.

Rosenthal, K.; Erlandsson, M.; Undén, A. 4-(3-hydroxy-4-methylpentyl)phenilacetic acid as a new linker for the solid phase synthesis of peptides with Boc chemistry. *Tetrahedron Letters*, 40, 377-380, **1999**.

Sadler, P. J.; Tucker, A. pH-induced structural transitions of bovine serum albumin. Histidine pKa values and unfolding of the N-terminus during the N to F transition. *European Journal of Biochemistry*, 212, 811-817, **1993**.

Samadi, Z.; Mirzaeim, M.; Hadipour, N. L.; Abedini Khorami, S. Density functional calculations of oxygen, nitrogen and hydrogen electric field gradient and chemical shielding tensors to study hydrogen bonding properties of peptide group (O C–NH) in crystalline acetamide. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26, 977–981, **2008**.

Samoson, A.; Lipmaa, E.; Pines, A. Averaging of second order effects by means of double-rotor. *Molecular Physics*. 55, 1013, **1998**.

Schellman, J. A. Circular dichroism and optical rotation. *Chemical Reviews*, 75, 323-331, **1975**.

Schindler, M; Kutzelnigg, W. Theory of magnetic susceptibilities and NMR chemical-shifts in terms of localized quantities. 3. Application to hydrocarbons and other organic-molecules. *Molecular Physics*, 105,1360-1370, **1983**.

Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery Jr., J. A. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *Journal of Computational Chemistry*, 14, 1347-1363, **1993**.

Schwieters, C. D.; Kuszewski, J. J.; Tjandra, N.; Glone, G. M. The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package., *Journal of Magnetic Resonance*, 160, 66-74, **2003**.

Seelig, J. <sup>31</sup>P NMR and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 515,105-140, **1978**.

Seelig, J. Deuterium magnetic resonance: Theory and applications to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 10, 353-418, **1977**.

Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion, and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective lytic peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462, 55-70, **1999**.

Shi, Z.; Olson, C. A.; Bell, A. J., Jr.; Kallenbach, N. R. Stabilization of alpha-helix structure by polar side-chain interactions: complex salt bridges, cation-pi interactions, and C-H...O H-bonds, *Biopolymers*, 60, 366-380, **2001**.

Shoolery, J. N. The development of experimental and analytical high resolution NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28 (1), 37-52, **1995**.

Shriver, J. Product operators and coherence transfer in multiple-pulse NMR Experiments. *Concepts in Magnetic Resonance*, 4, 1-33, **1992**.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Sétima edição. Editora Livros técnicos e científicos editora S. A., Rio de Janeiro, **2006**.

Simmaco M. Mignogna G.; Barra D. Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers*, 47, 435-450, **1998**.

Slater, J. C. Magnetic Effects and the Hartree-Fock Equation. *Physical Review*, 82, 538-541, **1951**.

Smith, R.; Separovic, F.; Milne, T. J.; Whittaker, A.; Bennett, F. M.; Cornell, B. A.; Makriyannis, A.. Structure and orientation of the pore-forming peptide, melittin, in lipid bilayers. *Journal of Molecular Biology*, 241:456-466, **1994**.

Soares, M. R.; Bisch P. M.; Campos de Carvalho, A. C.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L. Correlation Between Conformation and Antibody Binding: NMR Structure of Cross-Reactive Peptides From T.Cruzi , Human And L.Braziliensis. *FEBS Letters*, 560, 134-140, **2004**.

Sreerama, N.; Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set *Analytical Biochemistry*, 252-260, **2000**.

Sreerama, N.; Woody, R. W. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science*, 13, 100-112, **2004**.

Stejskal, E. O.; Memory, J. D. *High resolution NMR in the solid state: fundamentals of CPMAS*. Primeira edição. Editora Oxford University Press, **1994**.

Strandberg, E.; Ulrich, A. S. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance*, 23A, 89-120, **2004**.

Straus, S. K.; Scott, W. R. P.; Watts, A. Accessing the effects of time and spatial averaging in  $^{15}\text{N}$  chemical shifts  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolar correlation solid-state NMR experiments. *Journal of Biomolecular NMR*, 26, 283-295, **2003**.

Sun, S.; Bernstein, E. R. Aromatic van der Waals clusters: Structure and nonrigidity, *Journal of Physical Chemistry*, 100, 13348-13366, **1996**.

Tam, J. P.; Heath, W. F.; Merrifield, R. B. Mechanism for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid–trifluoroacetic acid–dimethyl sulfide. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 5242-5251, **1986**.

Teng, Q. *Structural biology – practical NMR applications*. Editora Springer, Nova Iorque (EUA), **2005**.

Tolman, J. R.; Prestegard, J. H. Homonuclear and heteronuclear correlation experiments using pulsed-field gradients. *Concepts in Magnetic Resonance*, 7, 247-262, **1995**.

Vogt, T. C. B.; Bechinger, B. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 29115-29121, **1999**.

Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, E. M. Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin-Density Calculations – A Critical Analysis. *Canadian Journal of Physics*, 58, 1200-1211, **1980**.

Westerhoff, H. V., Zasloff, M., Rosner, J. L., Hendler, R. W., de Waal, A., Vaz Gomes, A, Jongasma, P. M., Riethorst, A., and Juretic, D. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in Escherichia coli, tumor cells and liposomes. *European Journal of Biochemistry*, 228, 257-264, **1995**.

White, S. H.; Wimley, W. C. Membrane protein folding and stability: Physical principles, *Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 319-365, **1999**.

Wieprecht, T.; Apostolov, O.; Beyermann, M.; Seelig, J. Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment:

implications for the peptide-membrane binding equilibrium, *Journal of Molecular Biology*, 294, 785-794 **1999**.

Wieprecht, T., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., and Bienert, M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment, *FEBS Letters*, 417, 135-140, **1997**.

Wilker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bernel, W. Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 31, 287-292, **1993**.

Wink, D. J. Spin-Lattice Relaxation Times in  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 66 (10), 810-813, **1989**.

Wittel, K.; McGlynn, S. P. The Orbital Concept in Molecular Spectroscopy. *Chemical Reviews*, 77 (5), 745-755, **1977**.

Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy, *Biochemistry*, 31, 1647-1651, **1992**.

Williamson, M. P.; Havel, T. F.; Wüthrich, K. Solution conformation of proteinase inhibitor-IIA from bull seminal plasma by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic-resonance and distance geometry. *Journal of Molecular Biology*, 182, 295-315, **1985**.

Woestenenk, E. A. Protein production, characterization and structure determination in structural genomics. Departamento de Biotecnologia - KTH, Estocolmo, Suécia, **2004** (Tese de doutorado).



Woody, R. W. (1996) *Theory of circular dichroism of proteins*, in *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules* (Fasman, G. D., ed.), Plenum Press, New York, pp. 25-67.

Wu, C. H., Ramamoorthy, A, Opella, S. J. High-resolution heteronuclear dipolar solid-state NMR-spectroscopy, *Journal of Magnetic Resonance Series A*, 109, 270-272, **1994**.

Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Editora John Wiley and Sons, Inc, **1986**.

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

Zhu, J. M.; Smith, I. C. P. Selection of coherence transfer pathways by pulsed-field gradients in NMR-spectroscopy. *Concepts in Magnetic Resonance*, 7, 281-291, **1995**.

## **APÊNDICE A1 – Lista com trabalhos apresentados em congressos**

**1** –RESENDE, Jarbas M.; MORAES, C. M. ; PILÓ-VELOSO, D. ; CESAR, A. ; Bertani P. ; BECHINGER, B. Topologia absoluta de peptídeos em membranas por análise simultânea de diferentes parâmetros espectrais obtidos via RMN em fase sólida. In: X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Niterói, Universidade Federal Fluminense, 2008. p. 61-62.

**2** –VERLY, R. M.; RESENDE, Jarbas M.; MORAES, C. M.; BEMQUERER, M. P.; PILÓ-VELOSO, D.; CESAR, A. Análise conformacional por RMN da cadeia peptídica monomérica da homotarsinina. In: X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Niterói, Universidade Federal Fluminense, 2008. p. 77-78.

**3** –RESENDE, Jarbas M.; PILÓ-VELOSO, D.; CESAR, A. Cálculos da estrutura e das constantes de blindagem do peptídeos antimicrobiano PS-2. In: X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Niterói, Universidade Federal Fluminense, 2008. p. 107-108.

**4** –RESENDE, Jarbas M.; MORAES, C. M. ; PILÓ-VELOSO, D. ; CESAR, A. ; Bertani P. ; BECHINGER, B. Solid-state NMR studies of antimicrobial phylloseptin peptides in membrane-mimicking environments. In: EUROMAR 2008, 2008, São Petersburgo. ABSTRACTS. São Petersburgo - Rússia: Universidade Fedesal de São Petersburgo, 2008. p. 171-171.

**5** – VERLY, R. M. ; RESENDE, Jarbas M.; BEMQUERER, M. P. ; PILÓ-VELOSO, D. . Structural determination of the homotarsinine monomer and dimer by NMR bidimensional techniques.. in: EUROMAR magnetic resonance conference, 2008, São Petersburgo - Rússia. BOOK OF ABSTRACT. SÃO PETERSBURGO : UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PETERSBURGO, 2008. v. 1. p. 144-144.

**6** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; Almeida, F. C. L. ; Prates, M. V. ; CESAR, Amary ; Valente, A. P. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Structural Study of Antimicrobial Phylloseptin Peptides PS2 and PS3 by

Circular Dichroism and Solution NMR. In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis. AUREMN 2007, 2007. p. 89-90.

**7** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; CESAR, Amary ; Bertani, P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Analysis of Phylloseptin Peptides in Membranes: Helix Tilt & Rotational Pitch Angles from Combined  $^{15}\text{N}$  &  $^2\text{H}$  Solid-State NMR. In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis. AUREMN 2007, 2007. p. 37-38.

**8** – Mendonca Moraes, C. ; RESENDE, Jarbas M. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Membrane Perturbation by Antibiotic Peptide DDK: a Solid-State NMR Study. In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis. AUREMN 2007, 2007. p. 125-126.

**9** – Mendonca Moraes, C. ; RESENDE, Jarbas M. ; CESAR, Amary ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Synthesis and Structure Analysis of the Heterodimeric Peptide. In: 11th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting, 2007, Angra dos Reis. AUREMN 2007, 2007. p. 127-128.

**10** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; Prates, M. V. ; Amary C. Ferreira ; Almeida, F. C. L. ; Valente, A. P. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Análise Estrutural do Peptídeo Antimicrobiano Phylloseptin-1. In: 30a Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia. 30a Reunião Anual da SBQ, 2007.

**11** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Almeida, F. C. L. ; Prates, M. V. ; CESAR, Amary ; Valente, A. P. ; Bemquerer, M. P. ; Bechinger, B. . Structural Studies of Antimicrobial Phylloseptin Peptides by Circular Dichroism and Solution NMR. In: EUROMAR Magnetic Resonance Conference, 2007, Tarragona. EUROMAR 2007, 2007. p. 123-123.

**12** – Verly, R. Moreira ; RESENDE, Jarbas M. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Structural Determination of the Antimicrobial Peptide DDK Isolated from *Phyllomedusa Distincta* through NMR Techniques. In: 800 MHz NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural

Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**13** – Munhoz, V. H. ; Verly, R. Moreira ; RESENDE, Jarbas M. ; Alcântara, A. F. C. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Structural Determination by NMR Spectroscopy and Conformational Analysis of Distinctin Chain-2. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**14** – Verly, R. Moreira ; RESENDE, Jarbas M. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Structural Determination of Homotarsinine Monomer Bidimensional NMR Techniques. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**15** – Mendonca Moraes, C. ; RESENDE, Jarbas M. ; Amary C. Ferreira ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Synthesis and Structure Analysis of the Heterodimeric Peptide "Distinctin" Using <sup>31</sup>P- and <sup>15</sup>N-NMR. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**16** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; CESAR, Amary ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bertani, P. ; Bechinger, B. . Solid-State NMR Studies of Antimicrobial Peptides from *Phyllomedusa Hypochondrialis* in Membrane-Mimicking Environments. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**17** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; CESAR, Amary ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bemquerer, M. P. ; Almeida, F. C. L. ; Valente, A. P. ; Mundim, N. C. C. R. ; Prates, M. V. . Solution NMR Structures of Three Antimicrobial Peptides Naturally Found in a Brazilian Frog Species. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**18** – Munhoz, V. H. ; Verly, R. Moreira ; RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C.; Bemquerer, M. P. ; Alcântara, A. F. C. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Structural Determination by NMR Spectroscopy and Conformational Analysis of Distinctin Chain-1. In: 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHZ NMR Facility Inauguration and 2nd Annual Meeting of the Millennium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology, 2007.

**19** – Verly, R. Moreira ; Munhoz, V. H. ; RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C.; Alcântara, A. F. C. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Structural Determination by NMR Spectroscopy and Conformational Analysis of Distinctin Chain 1. In: XXI Encontro Regional da SBQ-MG, 2007, Uberlândia (MG). XXI Encontro Regional da SBQ-MG, 2007.

**20** – RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; Almeida, F. C. L. ; Prates, M. V. ; CESAR, Amary ; Valente, A. P. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; Bechinger, B. . Estudos Estruturais de Peptídeos Antimicrobianos de *Phyllomedusa Hypochondrialis*, por RMN e CD. In: XXI Encontro Regional da SBQ-MG, 2007, Uberlândia (MG). XXI Encontro Regional da SBQ-MG, 2007.

**21** – Lula, I. ; PILÓ-VELOSO, Dorila ; RESENDE, Jarbas M. ; Santos, R. A. S. ; Sinisterra, R. D. . Study of BPP7a and its 'beta'-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence specific NMR assignments. In: 800 MHz NMR facility Inauguration Symposium and 2th Annual Meeting of the Millenium Institute for Structural Biology

in Biomedicine and Biothecnology, 2007, Rio de Janeiro. 800 MHz NMR facility Inauguration Symposium and 2th Annual Meeting of the Millenium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biothecnology, 2007.

**22** – Pérez-Rebolledo, A. ; Silva, J. G. ; Bertani, P. ; RESENDE, Jarbas M. ; Alcântara, A. F. C. ; BERALDO, H. . N(4)-Methyl-4-Nitroacetophenone Thiosemicarbazone and its Ni(II) Complex: Structural Study by Means of NMR and DFT Calculations. In: XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006, Fortaleza. XIII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2006.

**23** – RESENDE, Jarbas M. ; CESAR, Amary ; SOUZA FILHO, José Dias de . Timol: Uma Molécula Interessante para o Ensino Instrumental e de Interpretação de RMN. In: IX Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, 2006, Recife. IX Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, 2006.

**24** – Verly, R. Moreira ; RESENDE, Jarbas M. ; Mendonca Moraes, C. ; Bemquerer, M. P. ; PILÓ-VELOSO, Dorila . Análise por RMN Bidimensional da Estrutura do Peptídeo Dermadistinctina K. In: XX encontro da Sociedade Brasileira de Quimica-MG, 2006, São João Del Rey. XX encontro da Sociedade Brasileira de Quimica-MG, 2006

**25** – RESENDE, Jarbas M. ; CESAR, Amary ; Demicheli, C. ; Frezard, F. . Theoretical NMR studiesof N-Methyl-Glucamine Atimonate Structures. In: First Iberoamerican NMR meeting, 2005, Angra dos Reis. First Iberoamerican NMR meeting, 2005. p. 157-158.

## **APÊNDICE A2 – Artigos produzidos durante o doutorado**

### ***Artigo aceito para publicação***

**1** – Solution NMR structures of the antimicrobial peptides Phylloseptin 1, 2, and 3 and biological activity: The role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations

*Autores:* Jarbas M. Resende, Cléria Mendonça Moraes, Maura V. Prates, Amary Cesar, Fabio C.L. Almeida, Nathália C.C.R. Mundim, Ana Paula Valente, Marcelo P. Bemquerer, Dorila Piló-Veloso and Burkhard Bechinger

[doi:10.1016/j.peptides.2008.06.022](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.022)

Periódico - *Peptides*

Ano: 2008

### ***Artigo submetido para publicação***

**2** – Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented  $^{15}\text{N}$  and  $^{31}\text{P}$  solid-state NMR spectroscopy

*Autores:* Cléria Mendonça de Moraes, Rodrigo Moreira Verly, Jarbas M. Resende, Christopher Aisenbrey, Marcelo Porto Bemquerer, Dorila Piló-Veloso, Ana Paula Valente, Fábio C. L. Almeida and Burkhard Bechinger

Periódico – *Biophysical Journal*

Ano: 2008

### ***Artigos publicados***

**3** – Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *eishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- $\gamma$  and cytolytic activity by CD8+ T cells

*Autores:* Daniela M. Resende, Bráulia C. Caetano, Míriam S. Dutra, Marcus L.O. Penido, Christiane F. Abrantes, Rodrigo M. Verly, Jarbas M. Resende, Dorila Piló-Veloso, Simone Aparecida Rezende, Oscar Bruna-Romero, Ana Paula Fernandes and Ricardo T. Gazzinelli

[doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.091](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.091)

Periódico - *Vaccine*, volume 26, p. 4585-4593.

Ano: 2008

4 – Study of angiotensin-(1–7) vasoactive peptide and its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies.

*Autores:* Ivana Lula, Ângelo L. Denadai, Jarbas M. Resende, Frederico B. de Sousa, Guilherme F. de Lima, Dorila Pilo-Veloso, Thomas Heine, Hélio A. Duarte, Robson A.S. Santos and Rubén D. Sinisterra

Periódico – *Peptides*, volume 28, p. 2199-2210.

Ano: 2007

5 – *N*(4)-Methyl-4-nitroacetophenone thiosemicarbazone and its nickel(II) complex: Experimental and theoretical structural studies.

*Autores:* Anayive Pérez-Rebolledo, Isolda C. Mendes, Nivaldo L. Speziali, Philippe Bertani, Jarbas M. Resende, Antônio F. de Carvalho Alcântara and Heloisa Beraldo

Periódico – *Polyhedron*, volume 26, p. 1449-1458.

Ano: 2007

6 – Synthesis and phytotoxicity evaluation of novel 6*a*,7*b*-dihydroxyvouacapan-17*b*-oic acid derivatives

*Autores:* Pedro A. Castelo-Branco, Mayura M. M. Rubinger, Jarbas M. Resende, Antônio A. Silva, Dalton L. Ferreira-Alves and Dorila Piló-Veloso

Periódico – *Journal of Chemical Research*, volume 6, p. 351-353.

Ano: 2006

7 – Total NMR assignment of furanditerpene derivatives from *Pterodon Polygalaeiflorus* Benth

*Autores:* Jarbas M. Resende, Pedro A. Castelo-Branco, Dorila Piló-Veloso, Mayura M. M. Rubinger and Dalton L. Ferreira-Alves.

Periódico – *Annals of Magnetic Resonance*, volume 3, p. 57-59.

Ano: 2004