

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Rodrigo Moreira Verly

**Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaio
Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise
Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**

Belo Horizonte

2010

UFMG/ICEx/DQ-818^a

T. 346^a

Rodrigo Moreira Verly

**Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios
Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise
Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**

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

Belo Horizonte

2010

Verly, Rodrigo Moreira

V521p Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios
2010 biológicos, estudos termodinâmicos e análise
T estrutural por RMN em meios biomiméticos./ Rodrigo
Moreira Verly. 2010.

xxii; 182 f. : il.

Orientadora: Dorila Piló Veloso.

Co-Orientador: Marcelo Porto Bemquerer

Tese(Doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia p.169-182

1.Química orgânica - Teses 2.Síntese - Teses
3.Peptídeos antimicrobianos - Teses I.Piló-Veloso,
Dorila, Orientadora. II.Bemquerer, Marcelo Porto, Co-
Orientador. Título

CDU 043



"Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaio Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos"

Rodrigo Moreira Verly

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Dorila Piló Veloso - Orientadora
UFMG

Dr. Marcelo Porto Bemquerer - Co-Orientador
EMBRAPA

Profa. Beatriz Simas Magalhães
UCB-DF

Profa. Luzineide Wanderley Tinoco
UFRJ

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

Prof. José Dias de Souza Filho
UFMG

Belo Horizonte, 25 de maio de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família. Ao meu pai, Jorge, por ser meu grande exemplo e pelo seu entusiasmo com nossas conquistas. À minha mãe, Mara, por ser a fortaleza e o centro da família. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível. Mesmo distantes reconheço o esforço, carinho e dedicação que têm comigo, por isso quero que saibam que lhes respeito, admiro e amo.

À professora doutora Dorila Piló-Veloso, pela orientação científica e pessoal. Suas contribuições estão além da vida acadêmica. Vejo nela, um exemplo de comprometimento com a ciência e com a vida.

Ao professor doutor Marcelo Porto Bemquerer, um grande co-orientador. Sua participação foi fundamental, pois mesmo distante sempre esteve disposto a colaborar e dar novos rumos ao trabalho. Devo muito do meu amadurecimento científico a ele.

À Roberta Viana Ferreira, minha companheira e quem esteve presente em cada história pessoal que carrego durante o período deste trabalho. Muitos foram os obstáculos e, por várias vezes, o desânimo quis contagiar, porém seu apoio e incentivo sempre sobrepuseram estes sentimentos. Sem seu carinho e sua atenção nada disso seria possível e, por isso, estará eternamente comigo.

Aos amigos, antes de professores, doutores ou quaisquer outros vários títulos Jarbas Magalhães Rezende e José Dias de Souza Filho pelas inúmeras conversas científicas ou não, e que foram sempre muito proveitosas tanto para o desenvolvimento deste trabalho quanto pessoal.

Ao grande amigo e companheiro de trabalho Victor Hugo de Oliveira Munhoz, responsável por ótimas discussões sobre os mais diversos assuntos e também pela inesquecível viagem à Rússia.

À companheira de trabalho Cléria Mendonça Moraes, pelo incentivo e ensinamentos prestados para o sucesso deste trabalho.

Ao professor Antônio Flávio de Carvalho Alcântara, pelo apoio, amizade e cooperação durante a realização deste trabalho.

Ao professor Marcelo Matos Santoro, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, pela colaboração científica, cessão de seu laboratório e de seus equipamentos para os experimentos de calorimetria.

Ao professor Jean Frederic Frezard do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, pela cessão de seu laboratório e de seus equipamentos na preparação dos lipossomas.

Aos professores Fábio C. Almeida e Ana Paula Valente, do Centro Nacional de RMN da UFRJ, pela amizade e colaboração irrestrita durante todas as estadias no CNRMN.

Aos professores Adriano Monteiro de Castro Pimenta e Maria Helena de Lima Perez Garcia do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Biologia e Imunologia do ICB da UFMG e seus alunos. Em especial ao Agenor Valadares Santos, pela cessão e auxílio na utilização dos equipamentos envolvidos no processo de caracterização do peptídeo.

Ao professor Rubén Dario Sinistera Milan pela cessão dos equipamentos para realização de experimentos de espalhamento de luz.

À amiga e companheira de trabalho Mariana Quezado pelo incentivo e ensinamentos em etapas fundamentais deste trabalho.

À Marilda Conceição da Silva, pela colaboração na aprendizagem do uso do cromatógrafo CLAE.

A todos os meus amigos desde os tempos do ensino fundamental em especial a Vitor Rodrigues Martins, Fábio Ramos Dias, Rodrigo “Tuiú” e Tiago Macedo, com eles aprendi que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.

A meus amigos conquistados nesta estadia em Belo Horizonte como Paulo Henrique (Alemão), Geraldo Fernandez, Gustavo Martins Serrão, Victor Araújo, Fernando Faria (Mogli), Naira Torres, Raquel Borges, Gessy James, Olídio, Meiriane, Taiane pelo incentivo e inúmeros momentos de descontração durante este período.

Aos amigos de curso Débora Costa e Ângelo Denadai pela amizade sincera e discussões acerca de nossos trabalhos.

Às secretárias de Pós-Graduação, pelo apoio e trabalho sempre eficiente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

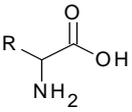
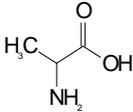
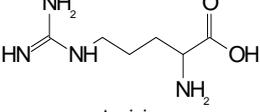
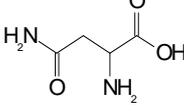
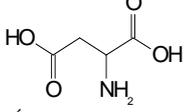
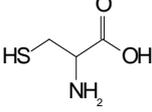
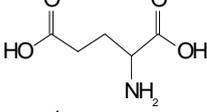
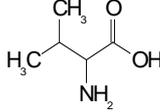
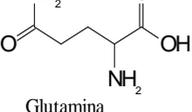
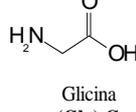
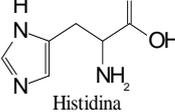
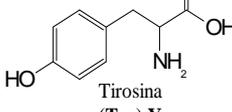
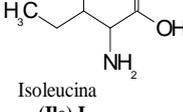
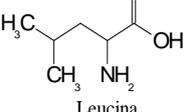
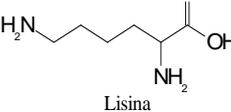
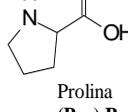
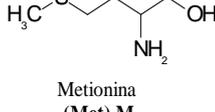
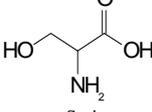
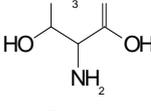
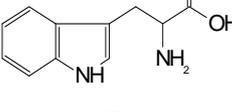
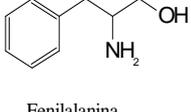
	Página
Tabela de símbolos e massas monoisotópicas de resíduos de aminoácidos.....	viii
Estrutura dos vinte aminoácidos essenciais.....	ix
Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	x
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xvii
Resumo.....	xix
Abstract.....	xxi
Introdução e Objetivos.....	1
Capítulo 1 - Considerações gerais sobre estudos estruturais e termodinâmicos de peptídeos antimicrobianos	2
1.1 Peptídeos Antimicrobianos.....	2
1.2 Relação estrutura e atividade antimicrobiana.....	4
1.3 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.....	6
1.4 Estudos da interação peptídeo-membrana.....	11
1.5 Dicroísmo Circular	13
1.6 Ressonância Magnética Nuclear	16
1.6.1 RMN bi-dimensional: TOCSY e NOESY	17
1.6.2 Assinalamento sequencial de peptídeos e proteínas	20
1.6.3 Obtenção de estruturas tridimensionais	21
1.7 Titulação calorimétrica.....	25
1.8 Espalhamento de luz dinâmico.....	30
1.9 Síntese de peptídeos	33
1.9.1 Síntese orgânica de peptídeos em fase sólida	33
1.9.2 Peptídeos diméricos - Formação de ligação de dissulfeto	38
Capítulo 2 - Materiais e Métodos.....	40
2.1 Síntese dos peptídeos DD K, LyeTx I e HMT-1	40
2.1.1 Preparação da resina para a SPFS.....	41
2.1.2 Etapa de Acoplamento	42
2.1.3 Etapa de Desproteção.....	43
2.1.4 Reação de clivagem do peptídeo da resina	43
2.2 Síntese do peptídeo HMT-2 – Reação de dimerização via formação de ligação dissulfeto.....	44
2.3 Acompanhamento da reação de obtenção de HMT-2	44
2.4 Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida.....	45
2.5 Secagem das amostras	45
2.6 Análise por espectrometria de massas	45
2.7 Padronização das soluções estoque de peptídeo	46
2.8 Obtenção de lipossomas	47

2.9	Encapsulamento de carboxifluoresceína em vesículas unilamelares	49
2.10	Medidas de extravasamento das LUVs-CF.....	49
2.11	Microcalorimetria.....	50
2.12	Espalhamento de luz dinâmico	51
2.13	Ensaio da atividade antimicrobiana.....	51
2.14	Experimentos de espectroscopia de Dicroísmo Circular	52
2.15	Experimento de RMN	52
2.16	Processamento, análise e tratamento dos dados de RMN.....	55
Capítulo 3 - Resultados de Discussão		57
3.1	Peptídeo antimicrobiano DD K.....	57
3.1.1	Síntese, Purificação e Caracterização	57
3.1.2	Estudos termodinâmicos	61
3.1.3	Estudos estruturais de DD K em meios biomiméticos.....	71
3.2	Peptídeo antimicrobiano homotarsinina.....	87
3.2.1	Síntese, Caracterização e Purificação	87
3.2.2	Estudo das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular.....	101
3.2.3	Determinação estrutural por RMN.....	106
3.2.4	Determinação de estruturas tri-dimensionais a partir de dados de RMN	128
3.2.5	Calorimetria de titulação isotérmica	140
3.2.6	Espalhamento de luz dinâmico	146
3.2.7	Atividade antimicrobiana.....	147
3.3	Peptídeo antimicrobiano LyeTx I.....	148
3.3.1	Síntese, purificação e caracterização	148
3.3.2	Testes antimicrobianos do peptídeo sintético LyeTx I.....	152
3.3.3	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	152
3.3.4	Determinação estrutural por RMN.....	154
Conclusões e perspectivas		166
Referências bibliográficas.....		169
Anexo - Lista dos trabalhos publicados.....		182

Tabela de símbolos e massas monoisotópicas de resíduos de aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asp	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021
Glutamina	Q	Gln	128,058
Histidina	H	His	137,058
Isoleucina	I	Ile	113,084
Leucina	L	Leu	113,084
Lisina	K	Lys	128,094
Metionina	M	Met	131,040
Prolina	P	Pro	97,052
Serina	S	Ser	87,032
Tirosina	Y	Tyr	163,063
Treonina	T	Thr	101,047
Triptofano	W	Trp	186,079
Valina	V	Val	99,068

Estrutura dos vinte aminoácidos essenciais

<p>Nome (Abreviação) Símbolo</p>				
	 Alanina (Ala) A	 Arginina (Arg) R	 Asparagina (Asn) N	 Ácido Aspártico (Asp) D
	 Cisteína (Cys) C	 Ácido Glutâmico (Glu) E	 Valina (Val) V	 Glutamina (Gln) Q
	 Glicina (Gly) G	 Histidina (His) H	 Tirosina (Tyr) Y	 Isoleucina (Ile) I
	 Leucina (Leu) L	 Lisina (Lys) K	 Prolina (Pro) P	 Metionina (Met) M
	 Serina (Ser) S	 Treonina (Thr) T	 Triptofano (Trp) W	 Fenilalanina (Phe) F

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

1D	uni-dimensional
2D	bi-dimensional
3D	tri-dimensional
ACN	acetonitrila
CD	dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CF	5,6-carboxifluoresceína
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	espectroscopia de correlação, do inglês <i>correlation spectroscopy</i>
DCM	diclorometano
D _h	diâmetro hidrodinâmico
DIC	<i>N,N'</i> - diisopropilcarbodiimida
DLS	espalhamento de luz dinâmico, do inglês <i>dynamic light scattering</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPC	dodecilfosfocolina, do inglês <i>dodecylphosphocholine</i>
DQF	filtro de duplo quantum, do inglês <i>double-quantum filter</i>
DQF-COSY	espectroscopia de correlação com filtro de duplo quantum, do inglês <i>Double-quantum filtered COSY</i>
DRV	vesículas por desidratação e reidratação, do inglês <i>Dehydration Rehydration Vesicles</i>
DSS	4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato de sódio
E.COSY	espectroscopia de correlação exclusiva, do inglês <i>exclusive correlation spectroscopy</i>
EDT	etanoditiol
EM	espectrometria de massas
ESI	ionização por eletro-spray, do inglês <i>electron spray ionization</i>
FID	decaimento livre da indução, do inglês <i>free induction decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
FT	transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform</i>
<i>H</i>	helicidade, porcentagem de hélice
HOBt	1 - hidroxibenzotriazol
HSQC	coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
Hz	hertz
ITC	calorimetria de titulação isotérmica, do inglês <i>isothermal titration calorimetry</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento escalar

LUVs	vesículas grandes unilamelares, do inglês <i>large unilamellar vesicles</i>
MALDI	dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MIC	concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
MLVs	vesículas multi-lamelares, do inglês <i>multi lamellar vesicles</i>
MS	espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
m/z	razão entre a massa e a carga
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PC	fosfatidilcolina do inglês <i>phosphatidylcholine</i>
PDB	banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
PIPE	4-metil-piperidina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
QUEEN	validação quantitativa de restrições experimentais de RMN, do inglês <i>quantitative evaluation of experimental <u>NMR</u> restraints</i>
RMSD	raiz quadrada dos desvios médios quadrados, do inglês <i>root of mean square deviation,</i>
SA	arrefecimento simulado do inglês <i>simulated annealing</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida
SUVs	vesículas unilamelares pequenas, do inglês <i>small unilamellar vesicles</i>
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	tri-isopropilsilano
TOCSY	espectroscopia de correlação total, do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
TQF-COSY	espectroscopia de correlação com filtro de triplo quantum, do inglês <i>Triple-quantum filtered COSY</i>
t_r	tempo de retenção
Tris	tris-hidroxiaminometilmetano
δ	deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Diferentes estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos.....	3
Figura 1.2 - Hélice circular de catelicidina LL-37 em estrutura de α -hélice.....	5
Figura 1.3 - Representação esquemática do mecanismo de formação de barril..	7
Figura 1.4 - Representação esquemática do mecanismo de formação de carpete..	8
Figura 1.5 - Representação esquemática do mecanismo SMH.....	9
Figura 1.6 - Modelo para o mecanismo de ação tipo detergente exercido por peptídeos antimicrobianos catiônicos.....	10
Figura 1.7 – Diferentes sistemas biomiméticos formados por agregados de moléculas anfifílicas.....	11
Figura 1.8 – Estrutura química de fosfolipídeos comumente empregados em formulações de micelas, bicelas e vesículas.	12
Figura 1.9 - Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas E_R (sentido horário e em vermelho) e E_L (sentido anti-horário e em azul)..	14
Figura 1.10 - Sistema $R_1-(C=O)-NH-R_2$ com suas respectivas transições eletrônicas. ..	15
Figura 1.11 - Espectros de dicroísmo circular típicos de peptídeos estruturados.	16
Figura 1.12 - Representação das transferências de magnetização por ligação	18
Figura 1.13 - Exemplos de experimentos bidimensionais de RMN para determinação de sistemas de <i>spin</i> de resíduos de aminoácidos.	18
Figura 1.14 - Exemplo de um experimento bidimensional dependente do Efeito Nuclear Overhauser – NOESY.	19
Figura 1.15 - Representação de nOes típicos de estrutura secundária em α -hélice.	20
Figura 1.16 – Restrições de distâncias derivadas de ligação de hidrogênio.	22
Figura 1.17 – Exemplo de mapas de contornos HSQC para determinação de RDC.	24
Figura 1.18 - Representação das mudanças sofridas por uma molécula durante o processo de cálculo por arrefecimento simulado.	25
Figura 1.19 - Fluxo de Calor em função do tempo para uma Titulação Calorimétrica de um processo exotérmico.	26
Figura 1.20 - Gráfico qualitativo de um experimento calorimétrico onde uma substância titulada possui um sítio de complexação.	27
Figura 1.21 - Titulação calorimétrica de POPC SUVs (20 mmol.L^{-1}) com solução de M2a ($200 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) a 15°C	28
Figura 1.22 - Titulação calorimétrica de $I^6V^9W^{12}T^{15}I^{17}$ M2a ($6 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) com POPC SUVs (38 mmol.L^{-1}) a 15°C	29
Figura 1.23 - Representação do processo de espalhamento de luz no equipamento de DLS.	31
Figura 1.24 - Gráfico da variação do fator de correlação G em função do tempo.....	32
Figura 1.25 - O princípio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)..	34
Figura 1.26 - Síntese de peptídeos em fase sólida – Metodologia de Merrifield.....	36

Figura 1.27 - Síntese de peptídeos em fase sólida – Estratégia Fmoc.....	37
Figura 2.1 - Suporte sólido utilizado para a síntese de peptídeos.....	40
Figura 2.2 - Reação de ninhidrina para detecção de amina primária (Teste de <i>Kaiser</i>) .	41
Figura 2.3- Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas.....	48
Figura 3.1- Perfil de CLAE de amostra da síntese do peptídeo DD K bruto.....	59
Figura 3.2 - Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo DD K.....	60
Figura 3.3- (A) Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) da amostra purificada da síntese de DD K. (B) Perfil de CLAE da amostra purificada de DD K.....	61
Figura 3.4 – Curva da cinética da liberação de CF de LUVs com adição de DD K.....	62
Figura 3.5 - Razão de liberação de CF, K_{obs} , em função da razão molar da DD K/PC...	64
Figura 3.6 - Porcentagem de liberação de CF em função da razão molar DD K/PC.	65
Figura 3.7 - Valores de titulação isotérmica de DD K com PC-LUVs.	66
Figura 3.8 - Valores de titulação isotérmica de DD K com LUVs-Col.	68
Figura 3.9 - Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) de LUVs em função da razão molar DD K/PC.....	70
Figura 3.10 – Estudo das preferências conformacionais de DD K por CD.....	72
Figura 3.11 - Região de deslocamento químico de núcleos de ^1H amídicos e aromáticos de espectro unidimensional de RMN (800 MHz) de $800 \mu\text{mol.L}^{-1}$ DD K a 25°C	74
Figura 3.12 - Região de deslocamentos químicos de núcleos de ^1H amídicos e aromáticos de espectro de RMN ^1H (800 MHz) de 2 mmol.L^{-1} de DD K a 25°C	75
Figura 3.13 - Mapa de contornos TOCSY parcial de DD K em solução micelar de 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	76
Figura 3.14 - Mapa de contornos NOESY parcial de DD K em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	77
Figura 3.15 - Diagrama de conectividade de nOes para o peptídeo DD K (1 mmol^{-1}) em solução micelar de DPC (400 mmol^{-1}).....	78
Figura 3.16 - Análise das restrições de distâncias e ângulos diedros obtidas por RMN (800 MHz) de DD K em solução micelar 400 mmol.L^{-1} DPC..	82
Figura 3.17 - Estruturas de RMN em solução de 1 mmol.L^{-1} de DD K diferentes meios..	84
Figura 3.18 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de DD K em micelas de DPC- d_{38}	86
Figura 3.19 - Perfil de cromatografia de fase reversa do peptídeo HMT-1.	89
Figura 3.20 - Espectro de Massas (MALDI) de amostra da síntese de HMT-1.....	90
Figura 3.21- Perfil de cromatografia de fase reversa do peptídeo HMT-1	91
Figura 3.22 - Espectro de Massas (MALDI) da amostra purificada da síntese de HMT-1 em condições semi-preparativas.	92
Figura 3.23 – (A) Espectro de Massa MALDI-ToF da amostra do peptídeo HMT-1 purificada. (B) Espectro ampliado mostrando os adutos de Na^+ e K^+ de HMT-1. (C) Perfil de cromatografia de fase reversa da amostra de HMT-1 purificada em condições analíticas.	93xiii

Figura 3.24 – Resultados do acompanhamento por cromatografia de fase reversa da obtenção do peptídeo HMT-2..	94
Figura 3.25 - Espectro de Massas MALDI-ToF do produto bruto da obtenção de HMT-2.....	95
Figura 3.26 - Ilustração das possíveis espécies formadas durante a dimerização de HMT-1.....	96
Figura 3.27 – Resultados da análise da amostra purificada em condições semi-preparativas da síntese de peptídeo HMT-2.....	97
Figura 3.28 – Resultados do acompanhamento por cromatografia de fase reversa da obtenção do peptídeo HMT-2 em micelas de SDS.	98
Figura 3.29 - Espectro de Massa (EM-ESI-ToF) da amostra da reação de dimerização em SDS.	99
Figura 3.30 – Resultado da análise da amostra purificada de HMT-2 da dimerização em SDS.	100
Figura 3.31- Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HMT-1.....	102
Figura 3.32 - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HMT-2.....	104
Figura 3.33- Detalhes do conteúdo de hélice de HMT-1 e HMT-2 calculadas em função da adição de: (A) TFE; (B) tampão fosfato; (C) SDS e DPC e (D) LUVs-POPC e LUVs-POPC/POPG.....	105
Figura 3.34 - Região de deslocamentos químicos de núcleos de ^1H amídicos do espectro 1D de RMN de 1 mmol.L^{-1} HMT-1 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (600 MHz).	106
Figura 3.35 - Mapa de contornos parcial TOCSY (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/ H_2O 30:70 v/v.	108
Figura 3.36 - Mapas parciais de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/ H_2O 30:70 v/v.	109
Figura 3.37 - Mapas parciais de contornos NOESY (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/ H_2O 30/70 v/v.	110
Figura 3.38 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC-SOFAST (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/ H_2O 30:70 v/v.	111
Figura 3.39 - Diagrama de conectividade de nOes para o peptídeo HMT-1 em solução aquosa de TFE a 30% v/v.....	112
Figura 3.40 - Região de deslocamento químico de núcleos de ^1H amídicos de espectro 1D de RMN de 1 mmol.L^{-1} de HMT-2 a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (600 MHz). (A) 30% (v/v) TFE- d_2 em H_2O ; (B) 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38} e (C) 400 mmol.L^{-1} SDS- d_{25}	114
Figura 3.41 - Mapa parcial de contornos TOCSY (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	116
Figura 3.42 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	117
Figura 3.43 - Mapas parciais de contornos NOESY (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC.	118
Figura 3.44 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC.....	119

Figura 3.45 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L ⁻¹ de DPC- <i>d</i> ₃₈ .	120
Figura 3.46 - Mapa parcial de contornos TOCSY (800 MHz) de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L ⁻¹ pH 7,0.	122
Figura 3.47 - Mapas parciais de contornos NOESY (800 MHz) de HMT-2 em solução 40 mmol.L ⁻¹ de tampão fosfato.	124
Figura 3.48 - Mapas parciais de contornos NOESY (800 MHz) das interações inter-cadeias de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L ⁻¹ em pH 7,0.	125
Figura 3.49 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo HMT2- em solução tampão fosfato 40 mmol.L ⁻¹ .	126
Figura 3.50 - Gráficos de unicidade (<i>I</i> _{uni}) pelo índice de cada restrição (coluna da esquerda) e gráficos de informação média (<i>I</i> _{med}) por informação única (<i>I</i> _{uni}) para HMT-1 e HMT-2.	130
Figura 3.51- Estruturas calculadas de HMT-1 em TFE/H ₂ O (70/30, v/v) a partir de dados de RMN.	132
Figura 3.52 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de HMT-1 em solução de TFE/H ₂ O.	133
Figura 3.53 - Estruturas calculadas de HMT-2 em solução micelar de 400 mmol.L ⁻¹ DPC a partir de dados de RMN.	135
Figura 3.54 - Gráfico de Ramachandran para as vinte estruturas mais estáveis de HMT-2 em solução micelar de 400 mmol.L ⁻¹ DPC- <i>d</i> ₃₈ .	136
Figura 3.55 - Estruturas da cadeia principal de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L ⁻¹ calculadas a partir de dados de RMN.	138
Figura 3.56 - Resultados da análise de qualidade estrutural e validação dos modelos calculados para HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L ⁻¹ .	139
Figura 3.57 – Valores de calorimetria de titulação isotérmica de HMT-1 em LUVs de POPG/Tris.	142
Figura 3.58- Valores de calorimetria de titulação isotérmica de HMT-2.	143
Figura 3.59 – Efeito dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 no diâmetro hidrodinâmico de LUVs.	146
Figura 3.60 - Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra da síntese do peptídeo LyeTx I bruto.	150
Figura 3.61 - (A) Espectro de Massas (EM-MALDI) do peptídeo LyeTx I bruto. (B) Expansão mostrando picos devidos a LyeTx I e análogos	151
Figura 3.62 – (A) Espectro de Massas (EM-MALDI) do peptídeo LyeTx I purificado (B) Expansão mostrando picos devidos a LyeTx I (C) Perfil de CLAE de amostra purificada de LyeTx I.	151
Figura 3.63 - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo LyeTx I (35 mmol.L ⁻¹).	153
Figura 3.64 - Mapa parcial de contornos TOCSY (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar de DPC- <i>d</i> ₃₈ 400 mmol.L ⁻¹ .	155
Figura 3.65 - Mapas parciais de contornos NOESY (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L ⁻¹ de DPC- <i>d</i> ₃₈ .	157

Figura 3.66 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	158
Figura 3.67 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	159
Figura 3.68 - Mapa parcial de contornos $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC-SOFAST (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	160
Figura 3.69 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo LyeTx I em solução micelar de DPC 400 mmol.L^{-1}	160
Figura 3.70 - Análise das restrições de distâncias e ângulos diedros obtidas por RMN de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38}	163
Figura 3.71 - Estruturas obtidas por RMN em solução de 2 mM de LyeTx I em solução micelar de 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} em água.....	164
Figura 3.72 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de LyeTx I em solução micelar de 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38}	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Exemplos de estruturas primárias de peptídeos catiônicos antimicrobianos	3
Tabela 2.1 - Condições de clivagens para cada síntese.....	44
Tabela 3.1 - Sequência primária do peptídeo antimicrobiano DD K.....	57
Tabela 3.2- Dados do acompanhamento da síntese de DD K.....	58
Tabela 3.3 - Efeito de DD K em K_{obs} para a liberação de CF em PC-LUVs e LUVs-Col.....	63
Tabela 3.4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos pelo experimento de ITC para a interação do peptídeo DD K com PC-LUVs e LUVs-Col a 25 °C.....	67
Tabela 3.5- Deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de ^1H e de ^{13}C para o peptídeo DD K em solução micelar 400 mM DPC- d_{38} , 25 °C (800 MHz).....	80
Tabela 3.6 - Número de restrições totais R(T), restrições intrarresiduais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN.....	81
Tabela 3.7- Relação das restrições que apresentaram valores elevados de informação única (I_{uni}) ou média (I_{med}).....	83
Tabela 3.8- Dados de cálculos estruturais de DD K em micelas de DPC- d_{38}	86
Tabela 3.9 - Sequência primária dos peptídeos HMT-1 e HMT-2.....	87
Tabela 3.10 - Dados do acompanhamento da síntese de HMT-1.....	88
Tabela 3.11 - Peptídeos identificados por MALDI-ToF.....	90
Tabela 3.12 - Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N (em ppm) de HMT-1 em TFE (600 MHz).....	113
Tabela 3.13 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{15}N (em ppm) de HMT-2 em DPC a 400 mmol.L $^{-1}$ (600 MHz).....	121
Tabela 3.14 - Interações de longa distância I(LR) inter-cadeias.....	123
Tabela 3.15 - Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N (em ppm) de HMT-2 em 40 mmol.L $^{-1}$ de tampão fosfato (800 MHz).....	127
Tabela 3.16 - Número de restrições totais R(T), restrições intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN.....	128
Tabela 3.17- Relação das restrições que apresentaram valores elevados de informação única (I_{uni}) e média (I_{med}) para HMT-1 e HMT-2 em meios diferentes.....	129
Tabela 3.18 - Dados dos cálculos estruturais de HMT-1 em TFE/H $_2\text{O}$	134
Tabela 3.19 - Dados dos cálculos estruturais de HMT-2.....	136
Tabela 3.20 - Soluções de LUVs para estudos termodinâmicos.....	141
Tabela 3.21 - Parâmetros termodinâmicos obtidos pelo experimento de ITC para a interação dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 com LUVs a 25 °C.....	144
Tabela 3.22 - Atividade antimicrobiana de HMT-1 e HMT-2.....	148

Tabela 3.23 - Sequência primária do peptídeo LyeTx I.....	148
Tabela 3.24 – Dados do acompanhamento da síntese de LyTex I.....	149
Tabela 3.25 - Atividade antimicrobiana de LyeTx I.....	152
Tabela 3.26 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{15}N e ^{13}C (em ppm) para o peptídeo LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} , 25°C (600 MHz)	161
Tabela 3.27 - Número de restrições totais R(T), restrições intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN	162
Tabela 3.28 - Resumos dos dados de cálculos estruturais de LyeTx I em DPC- d_{38}	165

Resumo

Muitos organismos empregam substâncias químicas ativas como, por exemplo, amins, derivados de esteróides, alcalóides e peptídeos para se defender de predadores e de microrganismos patogênicos. Dentre essas substâncias químicas destacam-se os peptídeos que podem ser encontrados em uma vasta variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios, aracnídeos e mamíferos. A grande maioria destes peptídeos apresenta propriedade antimicrobiana cujo mecanismo de ação não depende da interação com um receptor específico, tornando-os opções alternativas aos antibióticos disponíveis comercialmente. Entretanto, o mecanismo pelo qual peptídeos exercem sua atividade antimicrobiana ainda não é completamente definido e muitos estudos são necessários para uma maior compreensão do modo de ação destas moléculas em células bacteriana. O presente estudo teve como objetivo geral obter informações termodinâmicas e estruturais de peptídeos antimicrobianos em ambientes que mimetizam membranas biológicas, buscando contribuir para o entendimento de seus mecanismos de ação.

Neste trabalho foram sintetizados por técnica manual, pela síntese em fase sólida, os peptídeos dermadistinctina K (DD K), homotarsinina (HMT-2) e LyeTx I.

O peptídeo antimicrobiano DD K foi isolado previamente da pele do anfíbio *Phyllomedusa distincta*. O efeito do colesterol na interação do peptídeo sintético DD K com lipossomas de 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina foi investigado por medidas de cinética de extravasamento de carboxifluoresceína (CF), espalhamento de luz dinâmica (DLS) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A taxa de liberação de CF foi significativamente reduzida pela presença de colesterol. Os resultados de DLS mostraram um aumento no tamanho dos lipossomas sem colesterol quando titulados com DD K, porém a adição de colesterol reduziu o efeito de DD K no aumento do tamanho dos lipossomas. Os estudos por ITC demonstraram também que a ligação de DD K com lipossomas é significativamente afetada pelo colesterol, o que contribui para explicar a baixa atividade hemolítica do peptídeo. As preferências conformacionais de DD K foram estudadas por espectroscopia de dicroísmo circular (CD) na presença de ambientes miméticos de membranas, como trifluoroetanol/água (TFE/H₂O), micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) e lipossomas de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e de palmitoil-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG). Os resultados mostraram que o DD K apresenta uma estrutura randômica em meio aquoso,

porém ao se associar à membrana adota uma conformação helicoidal. Assim, a estrutura tridimensional de DD K foi estudada na presença de micelas DPC por espectroscopia bidimensional de RMN em solução. Os resultados mostraram uma conformação α -hélice anfipática a partir do sétimo resíduo e que se estende até a região C-terminal.

Neste trabalho foram realizados também os estudos estruturais, termodinâmicos e biológicos comparativos entre o peptídeo antimicrobiano homotarsinina (HMT-2), isolado de anuros da espécie *Phyllomedusa tarsius*, e sua forma monomérica (HMT-1). O peptídeo de ocorrência natural HMT-2 mostrou-se mais ativo contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* do que sua cadeia monomérica HMT-1. Os resultados termodinâmicos indicaram maior interação do peptídeo dímérico com lipossomas de POPC e POPG em relação ao peptídeo monomérico, justificando a maior atividade antimicrobiana de HMT-2. Comparações entre resultados de CD revelaram maior propensão à formação de estrutura α -helicoidal de HMT-2 do que HMT-1. Os estudos detalhados das estruturas tri-dimensionais por RMN mostraram diferenças significativas na orientação das cadeias monoméricas de HMT-2 em meio aquoso e em ambiente de membrana. A estrutura mais fechada de HMT-2 em solução aquosa pode indicar um mecanismo de proteção do peptídeo frente a proteases, enquanto uma estrutura estendida, formada em micelas de DPC, leva a uma maior superfície de contato entre peptídeo e membrana.

O peptídeo LyeTx I, isolado do veneno de *Lycosa erythrognata*, conhecida como aranha lobo, foi sintetizado para estudos de sua atividade antimicrobiana e determinação estrutural por CD e RMN. As comparações dos ensaios antimicrobianos de LyeTx I e fármacos comerciais mostraram que o peptídeo é ativo contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados de CD mostraram que LyeTx I na presença de POPC contendo colesterol tem uma diminuição na conformação helicoidal e, juntamente com a baixa atividade hemolítica, indicam que as membranas bacterianas são alvos preferenciais em relação a membranas de vertebrados. Os resultados de RMN de LyeTx I apontam para uma pequena estruturação da região N-terminal seguida por uma α -hélice do sexto resíduo até a região C-terminal amidada, o que pode favorecer a interação peptídeo-membrana.

Abstract

Many organisms employ noxious chemicals (e.g., amines, steroid derivatives, alkaloids and peptides) to defend themselves against predators and pathogenic microorganisms. Among these chemical agents stand out peptides that can be found in a wide variety of organisms including bacteria, fungi, plants, insects, fish, amphibians, arachnids and mammals. The vast majority of these peptides has antimicrobial property whose mechanism of action is independent of specific receptors and because of this, these molecules have been considered as an alternative to the available antibiotics. However, the mechanism through which peptides exert their antimicrobial activity is still not completely defined. Studies are needed to better understand the way these molecules act on bacterial cells. The present work describes the thermodynamic and structural studies of antimicrobial peptides in biomimetic environments to explain their mechanisms of interaction with bacterial membranes. In this study the peptides demadisticin K (DD K), homotarsinin (HMT-2), and LyeTx I were manually synthesized by solid phase procedure.

DD K is an antimicrobial peptide which was previously isolated from skin of the amphibian *Phyllomedusa distincta*. The effect of cholesterol on synthetic DD K binding to phosphatidylcholine liposomes was investigated by measurements of kinetics of carboxyfluorescein (CF) leakage, dynamic light scattering (DLS) and isothermal titration microcalorimetry (ITC). The rate and the extent of CF release were significantly reduced by the presence of cholesterol. DLS showed that the liposome size increases when titrated with DD K but addition of cholesterol reduces the liposome size increments. ITC studies also showed that DD K binding to phosphatidylcholine liposomes is significantly affected by cholesterol which contributes to explain the low hemolytic activity of the peptide. The structural alterations of DD K were first investigated in the presence of membranes, micelles or in membrane-mimetic environments using circular dichroism (CD) spectroscopy. The DD K peptide clearly associates with membrane and adopts a high degree of helical conformation. Thus DD K conformation was studied in the presence of DPC micelles by bidimensional NMR spectroscopy in solution. These results indicate an amphipathic α -helical conformation in membrane environments starting at residue 7 and extending to the C-terminal carboxamide.

In this work it was also carried out structural, thermodynamic and biological studies of the antimicrobial peptide homotarsinin (HMT-2), isolated from frog species *Phyllomedusa tarsius*, and its monomeric chain (HMT-1). The natural peptide HMT-2 was more active against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* than the monomeric form HMT-1. The results indicated greater thermodynamic interaction of the dimeric peptide with POPC and POPG liposomes in relation to the monomeric peptide, corroborating the higher antimicrobial activity observed on HMT-2. The analysis of the CD results showed that HMT-2 has a higher propensity to adopt α -helical conformation in comparison to HMT-1. Detailed studies of three-dimensional structures by NMR showed significant differences in the orientation of each monomeric chain of HMT-2 in aqueous and membrane environment. Whereas a more closed structure of HMT-2 in aqueous solution may indicate a protection mechanism of the peptide to proteases, a more opened structure is formed in DPC micelles, leading to greater surface contact between peptide and membrane.

LyeTx I is a peptide isolated from the venom of *Lycosa erythrognatha*, also known as wolf spider, and in this work its antimicrobial activity and structural profile were investigated through CD and NMR techniques. Comparisons among LyeTx I and commercial drugs showed to be active against bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). The CD results showed LyeTx I in presence of POPC containing cholesterol has a decrease in helical conformation content, and along with the observed low hemolytic activity in other studies, these results indicate that bacterial membranes seem to be the preferential targets rather than vertebrate membranes. The secondary structure of LyeTx I has shown a small random-coil region at the *N*-terminus followed by an α -helix that reached the amidated *C*-terminus, which might favour the peptide-membrane interaction.

Introdução e Objetivos

Esta tese está organizada em três capítulos. O primeiro capítulo consta de algumas considerações sobre peptídeos antimicrobianos, suas estruturas e relação com mecanismos de ação, bem como os diferentes métodos empregados em seus estudos estruturais e de interação com meios biomiméticos. Materiais e métodos estão descritos no Capítulo 2 e os Resultados e Discussão são apresentados no Capítulo 3, seguido das Conclusões e Perspectivas.

O objetivo deste trabalho foi aprofundar o conhecimento científico sobre quatro peptídeos antimicrobianos, para os quais nenhum estudo conformacional foi realizado anteriormente:

- O peptídeo antimicrobiano dermadistinctina K (DD K), isolado de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta*, que é encontrada na Floresta Atlântica (Batista *et al.*, 1999). Este peptídeo é constituído de 33 resíduos e apresenta baixa atividade hemolítica (Batista *et al.*, 2001). Embora testes biológicos tenham sido relatados na literatura, nenhum estudo sobre suas propriedades conformacionais foi encontrado.

- O peptídeo homodimérico homotarsinina (HMT-2), isolado do anuro da espécie *Phyllomedusa tarsius* e sua cadeia monomérica (HMT-1). Esse homodímero é composto por duas cadeias de vinte e quatro resíduos de aminoácidos, unidas por uma ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína (Prates, 1999). As atividades biológicas de HMT-2 e HMT-1 ainda estão sendo investigadas, não havendo relatos na literatura. Portanto, esta tese tem como um de seus objetivos o desenvolvimento de estudos biológicos, estruturais e termodinâmicos deste peptídeo dimérico e de sua forma monomérica.

- O peptídeo catiônico LyeTx I, isolado do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha* composto por vinte e cinco aminoácidos (Santos *et al.*, 2009). Este peptídeo foi recentemente isolado pelo grupo do Núcleo de Biomoléculas coordenado pela professora Maria Elena Lima do ICB, UFMG, com o qual foi estabelecida uma colaboração para realização dos estudos estruturais apresentados nesta tese.

Para alcançar os objetivos apresentados acima foi necessário: sintetizar todos os peptídeos descritos utilizando-se a síntese em fase sólida, otimizar a cinética e o rendimento da reação de formação da ligação de dissulfeto do peptídeo homodimérico (HMT-2), obter informações sobre a estrutura de todos esses peptídeos por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em ambientes que mimetizam as condições de membranas biológicas. Além disso, em alguns casos, foram realizados estudos termodinâmicos da interação peptídeo-membrana por medidas de extravasamento de carboxifluoresceína (CF), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).

Capítulo 1

Considerações gerais sobre estudos estruturais e termodinâmicos de peptídeos antimicrobianos

1.1 Peptídeos Antimicrobianos

Atualmente é descrita uma grande variedade de organismos vivos capazes de produzir moléculas de peptídeos que atuam na primeira linha de suas defesas. Tais moléculas podem ser sintetizadas constantemente pelo organismo ou somente após uma lesão ou infecção, tendo-se revelado responsáveis pelo sistema imune inato com amplo espectro de atividade biológica. Embora o estudo seja relativamente recente, milhares destas moléculas já foram isoladas e tiveram suas atividades biológicas comprovadas. Destas, a grande maioria apresenta atividade antimicrobiana, de grande importância no sistema de defesa do organismo (Jenssen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Alguns estudos com anfíbios demonstram que a secreção de peptídeos antimicrobianos aumenta com a exposição destes animais a microrganismos e patógenos, atuando como uma barreira inicial a estes organismos (Nascimento *et al.*, 2003). Em contrapartida, outros estudos mostram que em certos invertebrados, como aranhas, moluscos e camarões, os peptídeos antimicrobianos são sintetizados constitutivamente nos hemócitos e armazenados em seus grânulos (Bachere *et al.*, 2004). Os peptídeos antimicrobianos de plantas e animais geralmente são compostos por 12 a 50 resíduos de aminoácidos, além disso, são moléculas catiônicas, devido ao excesso de resíduos de lisina, arginina e histidina ($\text{pH} \leq 7$), anfipáticos e relativamente pequenos (Hancock e Scott, 2000). Na Figura 1.1 (p. 3) são apresentados exemplos de estruturas secundárias de alguns peptídeos.

Apesar dos peptídeos antimicrobianos poderem apresentar uma grande diversidade estrutural, é possível agrupá-los em quatro classes distintas de estruturas secundárias (Jenssen *et al.*, 2006). As estruturas mais comumente observadas são as α -hélices (Figura 1.1A), formadas apenas quando o peptídeo entra em contato com a membrana, e as folhas- β (Figura 1.1B), estabilizadas por ligações dissulfeto 2-4 e que ocasionalmente apresentam pequenas porções de estrutura α -hélice. As demais estruturas, menos comuns, são as estruturas curvadas (Figura 1.1C), formadas por ligações dissulfeto simples ou devido à presença de resíduos de prolinas na estrutura

(Resende *et al.*, 2008), e estruturas estendidas que são caracterizadas pela predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos na sequência primária (Figura 1.1D).

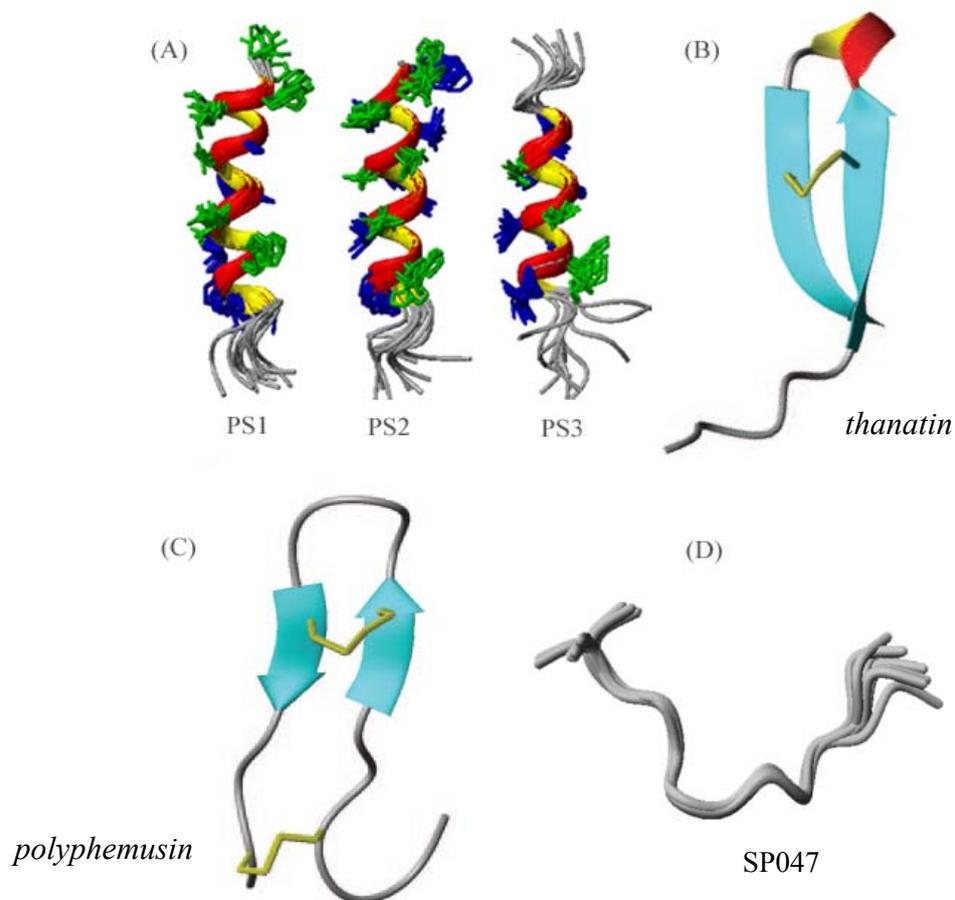


Figura 1.1 - Diferentes estruturas tridimensionais de peptídeos antimicrobianos. (A) estruturas α -helicoidais de PSI, PS2 e PS3 (PDB 2JQ0, 2JPY e 2JQ1, respectivamente); (B) folha- β de *thanatin* (PDB 8TFV); (C) estrutura dobrada de *polyphemusin* (PDB 1RKK) e (D) estrutura estendida de SP047, derivado do antígeno A2 (Resende *et al.*, 2008).

A Tabela 1.1 apresenta alguns exemplos de estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos com diferentes conformações.

Tabela 1.1 - Exemplos de estruturas primárias de peptídeos catiônicos antimicrobianos

Peptídeo	Estrutura	Sequência	Referência
β -defensina 1 humana	Folha- β	DHYNC ₁ VSSGQC ₂ LYSAC ₃ PIFTKIQGTC ₂ YRGKAKC ₁ C ₃ K	Bastian <i>et al.</i> , 2001
Protegrina 1 suína	Folha- β	RGGRLC ₁ YC ₂ RRRFC ₂ VC ₁ VGR	Yasin <i>et al.</i> , 2000
LL-37	α -hélice	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	Gudmundsson <i>et al.</i> , 2004
Magainina 2	α -hélice	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Gessel <i>et al.</i> , 1997
Indolicidina	Estendida	ILPWKWPWWPWRR	Rozek <i>et al.</i> , 2000
Bactenecina	Loop	RLC ₁ R ₁ VV ₁ RVC ₁ R	Wu <i>et al.</i> , 1999

1.2 Relação estrutura e atividade antimicrobiana

O interesse no estudo das atividades antimicrobianas apresentadas por peptídeos isolados da secreção cutânea de anuros surgiu após o isolamento e a purificação do peptídeo *bombinin*, da rã *Bombina variegata* (Csordas e Michl, 1969). Desde então, vários peptídeos têm sido sequenciados, sintetizados ou produzidos por tecnologia do DNA recombinante, em sua forma original ou com alguma modificação química com o objetivo de identificarem-se fatores estruturais que sejam determinantes ou que contribuam para a atividade biológica destas moléculas. Nesta seção, serão apresentados, em diferentes tópicos, alguns parâmetros como preferências conformacionais, carga formal e anfipaticidade, os quais são características fundamentais para a interação de peptídeos antimicrobianos com membranas fosfolipídicas.

Peptídeos antimicrobianos apresentam uma grande variedade estrutural, entretanto, é possível agrupá-los em dois conjuntos característicos de estruturas secundárias: aqueles com estrutura em α -hélice e em folha- β (Jenssen *et al.*, 2006). As estruturas helicoidais ocorrem em grande parte no meio extracelular e são formadas durante a interação do peptídeo com a superfície externa de membranas, pois os peptídeos têm como característica apresentarem conformação randômica em soluções aquosas (Yeaman e Yount, 2003). A estabilidade da forma helicoidal em peptídeos ou proteínas depende de diversos fatores, como, por exemplo, a disposição de resíduos de aminoácidos na sequência peptídica. Resíduos de aminoácidos com cadeias laterais de mesma carga (positiva ou negativa) que estejam muito próximos entre si podem desestabilizar a forma devido a interações repulsivas. A presença de resíduos de prolina, glicina ou de *D*-aminoácidos na sequência primária destes peptídeos também desestabiliza as estruturas α -helicoidais, podendo ainda afetar a ação destas moléculas contra células bacterianas (Papo e Shai, 2003), mostrando que a conformação α -helicoidal é de fundamental importância para a manutenção da atividade biológica. Estudos recentes mostram ainda que distorções da α -hélice canônica são fundamentais para o modo de ação de peptídeos que penetram membranas fosfolipídicas (peptídeos *trans*-membrana) (Bordag e Keller, 2009). Muitos destes peptídeos podem apresentar adaptações estruturais durante a interação com membranas fosfolipídicas, resultando em uma inclinação ou torção da estrutura helicoidal, e ainda reorientações de cadeias laterais (Nyholm *et al.*, 2007). Algumas características são fundamentais para originar estas modificações na linearidade da estrutura α -hélice de peptídeos *trans*-membrana,

como, por exemplo, diferenças no comprimento da região hidrofóbica da sua hélice em relação à cadeia acila do lipídeo e sequências específicas com ocorrência elevada de resíduos carregados como histidina, lisina, aspartato e glutamato (Melnik *et al.*, 2003; Krishnakumar e London, 2007; Ozdirekcan *et al.*, 2007). Estas características, além de alterarem a solubilidade, podem ajudar a garantir uma topologia adequada dos peptídeos em α -hélice para a interação com a bicamada lipídica. Os peptídeos estruturados em folha- β , assim como os estruturados em α -hélice, podem apresentar uma grande variação na estrutura primária, mantendo, contudo, uma composição com características anfipáticas. Este tipo de estrutura é formado pelo emparelhamento de cadeias polipeptídicas, podendo formar dois padrões distintos de folha- β : a forma antiparalela e a forma paralela. Na forma antiparalela, as cadeias principais encontram-se em sentidos alternados, enquanto que, no arranjo paralelo, essas cadeias laterais encontram-se dispostas de forma alinhada. Em ambos os casos, podem ocorrer uma separação de cargas que facilita a formação de estruturas terciárias (Dennison *et al.*, 2005). Algumas destas estruturas em folha- β apresentam uma grande abundância de um determinado resíduo de aminoácido, como as defensinas ricas em resíduos de cisteína (Braff e Gallo, 2006).

Peptídeos lineares estão presentes em várias espécies incluindo fungos, plantas, anfíbios e mamíferos (García-Olmedo *et al.*, 1998; Zasloff, 2002b; Boman, 2003). Embora uma vasta diversidade de sequências peptídicas tenha sido identificada, as quais se diferem em composição de aminoácidos, tamanho da cadeia e estrutura, muitas destas moléculas apresentam propriedades físico-químicas comuns, como a tendência de adotarem uma estrutura anfipática quando interagem com membranas fosfolipídicas (Figura 1.2) (Hancock e Scott, 2000; Brogden, 2005).

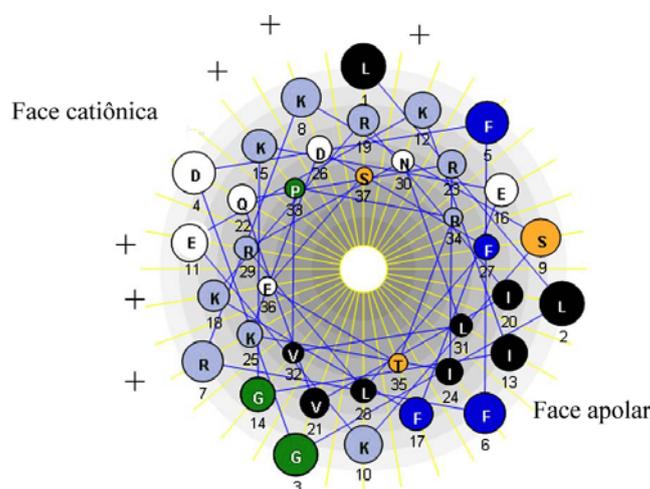


Figura 1.2 - Hélice circular de catelicidina LL-37 em estrutura de α -hélice. Figura retirada e modificada de Gudmundsson (2004).

A anfipaticidade é caracterizada pela separação de uma face hidrofóbica e de uma hidrofílica, normalmente carregada positivamente, e ocorre em estruturas α -helicoidais de peptídeos antimicrobianos lineares. O caráter anfipático pode ser formado com uma sequência periódica de resíduos polares e apolares em um intervalo entre três a quatro resíduos de aminoácidos. Dessa forma, as cadeias laterais polares e apolares dos resíduos de aminoácidos posicionam-se adequadamente para uma separação em faces opostas (Figura 1.2).

Peptídeos antimicrobianos são constituídos normalmente por 15 a 20 resíduos de aminoácidos e têm como característica apresentarem carga líquida igual ou superior a +2. Este caráter catiônico ocorre devido à presença de excesso de resíduos de aminoácidos básicos, tais como arginina, lisina e histidina, sendo o último carregado positivamente somente em $\text{pH} \leq 7$. Alguns estudos relacionam a atividade antimicrobiana com mudanças na carga líquida de peptídeos. Estudos do peptídeo antimicrobiano dermaseptina S4 mostram que um aumento da carga positiva do peptídeo leva a uma maior seletividade na atividade antimicrobiana e, como consequência, reduz sua atividade hemolítica em células eucarióticas (Lorin *et al.*, 2005). Muitos modelos mostram que o caráter catiônico é determinante para a atração inicial de peptídeos antimicrobianos à superfície das membranas de bactérias e de outros organismos, os quais apresentam uma superfície eletricamente negativa devida aos grupamentos fosfato dos fosfolipídeos (Bechinger, 2004). Por outro lado, a interação destes peptídeos com membranas eletricamente neutras (pois apresentam um grupamento catiônico que anula a carga dos fosfatos), como a membrana plasmática de eritrócitos, apresenta-se consideravelmente mais fraca (Lohner e Prenner, 1999). Este comportamento resulta em uma seletividade alta às membranas bacterianas por parte dos peptídeos antimicrobianos catiônicos.

1.3 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos

Diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos clássicos, que se baseiam em inibições enzimáticas, sendo relativamente lentos (Lohner e Prenner, 1999), peptídeos antimicrobianos interagem na superfície de células bacterianas causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica, ocasionando lise celular (Zasloff, 2002a). Atualmente vários modelos indicam que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos (Sanderson, 2005). Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, onde sofrem mudanças conformacionais

adotando uma estrutura anfipática (Bechinger, 2004). Entretanto, o mecanismo pelo qual os peptídeos permeabilizam a membrana bacteriana e como exercem sua atividade antimicrobiana ainda não são completamente definidos, e vários mecanismos têm sido propostos para descrever a interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas. (Bechinger, 1999; Shai, 2002; Bechinger e Lohner, 2006). Em princípio, dois mecanismos foram propostos para peptídeos em α -hélice, denominados *Carpet-like* (formação de tapete) e *barrel-stave* (formação de barril) (Shai, 2002). Outro modelo que define o modo de interação da maioria dos peptídeos antimicrobianos é conhecido como Shai, Matsuzaki e Huang (SMH), e explica como moléculas de colesterol presente em membranas fosfolipídicas influenciam a atividade biológica do peptídeo (Zasloff, 2002b). Mais recentemente, um mecanismo de ação denominado de *detergent-like* ou mecanismo de detergente, mostrou-se ainda mais geral, abrangendo um grande número de peptídeos antimicrobianos (Bechinger e Lohner, 2006). A seguir serão descritos estes mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos.

No mecanismo de formação de barril (*Barrel-stave*, Figura 1.3) o modelo aplica-se apenas a um pequeno grupo de peptídeos.

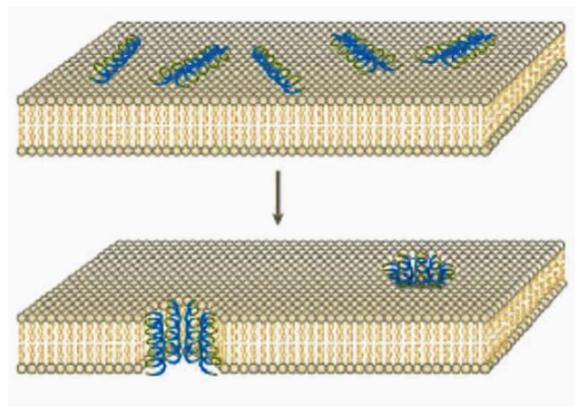


Figura 1.3 - Representação esquemática do mecanismo de formação de barril. Regiões hidrofílicas do peptídeo estão representadas em azul e a região hidrofóbica em verde. Figura retirada e modificada de Brogden (2005).

Neste modelo, peptídeos helicoidais ligam-se a superfície da bicamada lipídica orientando-se de acordo com sua anfipaticidade com a face catiônica voltada para os grupos fosfatos presentes na superfície da bicamada lipídica. Ao atingir uma determinada concentração na superfície da membrana, monômeros do peptídeo agregam-se e inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, formando um poro linear de peptídeo e lipídeo (Sanderson, 2005; Pukala *et al.*, 2006). Neste estágio, o peptídeo mantém as regiões hidrofóbicas ligadas à região apolar da membrana enquanto

as regiões hidrofílicas ficam expostas para facilitar o fluxo livre de íons e moléculas pequenas através da bicamada lipídica (Shai, 2002). O tamanho dos poros formados pode variar consideravelmente de acordo com a concentração de monômeros de peptídeo na membrana (Pukala *et al.*, 2006).

Segundo o mecanismo de formação de carpete (*Carpet-like*) as moléculas de peptídeo são adsorvidas paralelamente na superfície da membrana, formando um agregado que cobre a superfície da bicamada lipídica, como um “carpete” de moléculas. Inicialmente os peptídeos ligam-se ao grupamento fosfato dos fosfolípídeos através de suas faces hidrofílicas. Em seguida, o peptídeo se reorienta, direcionando as cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos para o interior da bicamada lipídica (região hidrofóbica da membrana). Consequentemente, ocorre uma redistribuição dos lipídeos, o que resulta em uma tensão na curvatura da membrana. O aumento da concentração de peptídeo na bicamada leva também a um aumento desta tensão, causando a desintegração da membrana pelo rompimento de sua curvatura (Figura 1.4) (Reddy *et al.*, 2004; Sanderson, 2005)

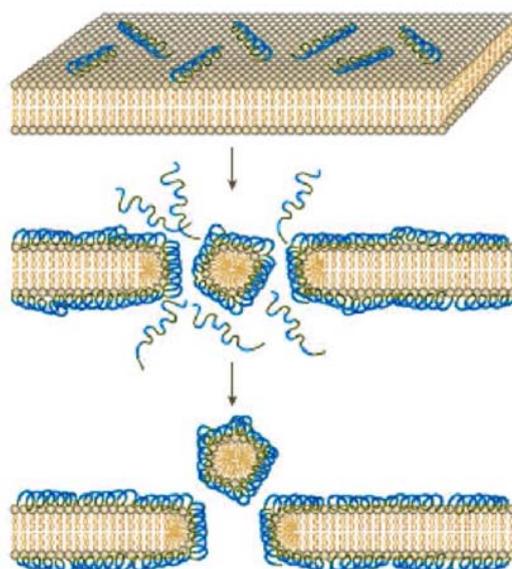


Figura 1.4 - Representação esquemática do mecanismo de formação de carpete. Regiões hidrofílicas do peptídeo estão representadas em azul e a região hidrofóbica em verde. Figura retirada e modificada de Brogden (2005).

O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) aplica-se a grande parte dos peptídeos antimicrobianos, inclusive a peptídeos menores, os quais seriam incapazes de formar poros segundo um mecanismo *Barrel-stave*. O modelo SMH pode ser explicado como uma combinação de interações superficiais e formação de poros. O peptídeo interage com a superfície da membrana como ocorre no mecanismo de “carpete” e desloca as

moléculas de fosfolipídeos, levando a uma desorganização da estrutura da membrana (Shai, 2002; Huang, 2006) (Figura 1.5). Em alguns casos, a desorganização pode levar ao rompimento parcial da estrutura da bicamada lipídica permitindo a entrada de moléculas de peptídeo para o interior da célula-alvo. Assim, o mecanismo SMH propõe modos de ação distintos para peptídeos antimicrobianos, sendo por rompimento da bicamada lipídica ou ainda por interação com alvos intracelulares (Wang *et al.*, 2005).

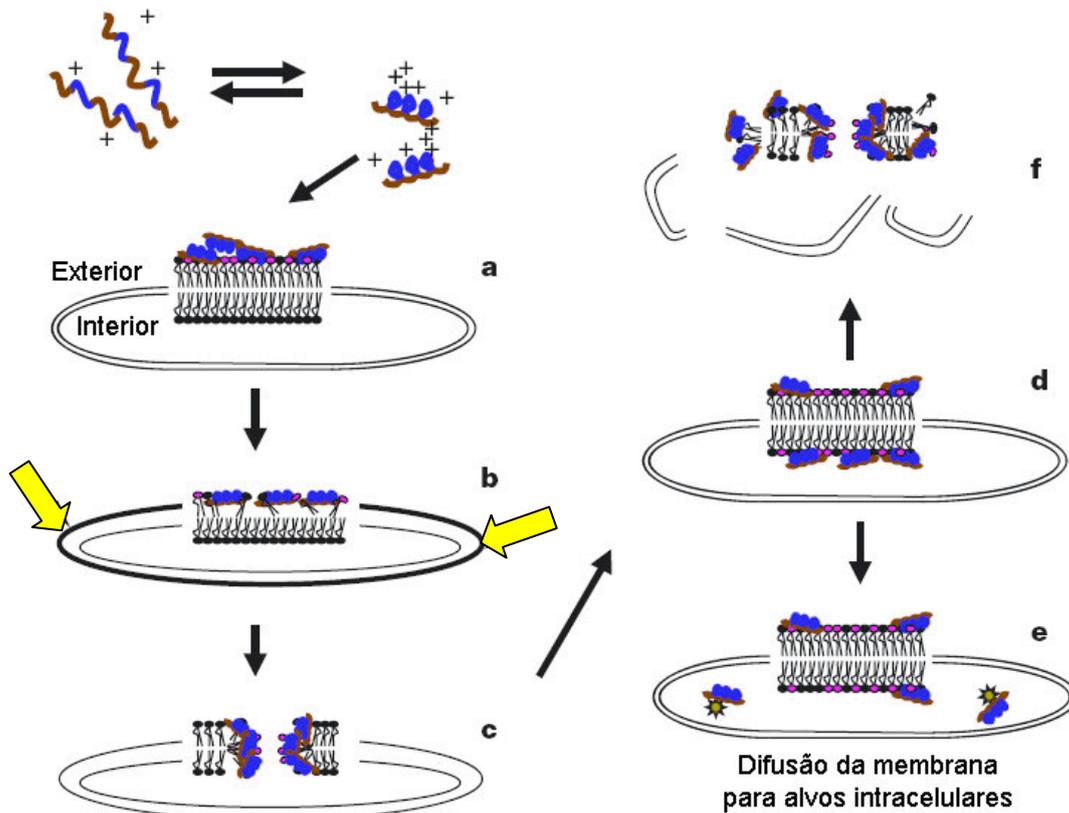


Figura 1.5 - Representação esquemática do mecanismo SMH. Um peptídeo em α -hélice é representado em equilíbrio com a sua estrutura randômica. As partes catiônicas estão em azul e as regiões hidrofóbicas estão em marrom **a**. Interação superficial do peptídeo com a superfície externa da membrana. **b**. Adsorção do peptídeo na membrana afinando sua face externa. As setas em amarelo representam uma expansão da face externa em relação à interna da bicamada. **c**. Formação de poros transitientes. **d**. Transporte de peptídeos da face externa para a face interna da membrana. **e**. Interação de peptídeos com alvos internos (em alguns casos). **f**. Fragmentação da membrana celular. Fosfolipídeos com cabeças em rosa são carregados negativamente enquanto os neutros estão representados em preto. Figura retirada e modificada de Zasloff (2002).

O mecanismo de detergente (*detergent-like*) baseia-se na intercalação de peptídeos em bicamadas lipídicas e representa um mecanismo mais geral para a atividade de moléculas anfipáticas. Sabe-se que moléculas de detergentes acima da concentração micelar crítica (CMC) interagem com membranas lipídicas, formando um estado micelar bastante complexo. Da mesma forma, peptídeos antimicrobianos podem

agregar-se formando estruturas oligoméricas que interagem de forma diferente que seus monômeros e de modo similar a um detergente (Figura 1.6) (Bechinger e Lohner, 2006). Estes oligômeros formados pelos peptídeos agregados ao chocarem-se com a membrana adsorvem algumas moléculas de fosfolipídeos e podem ainda formar um agregado micelar na própria bicamada (Figura 6A).

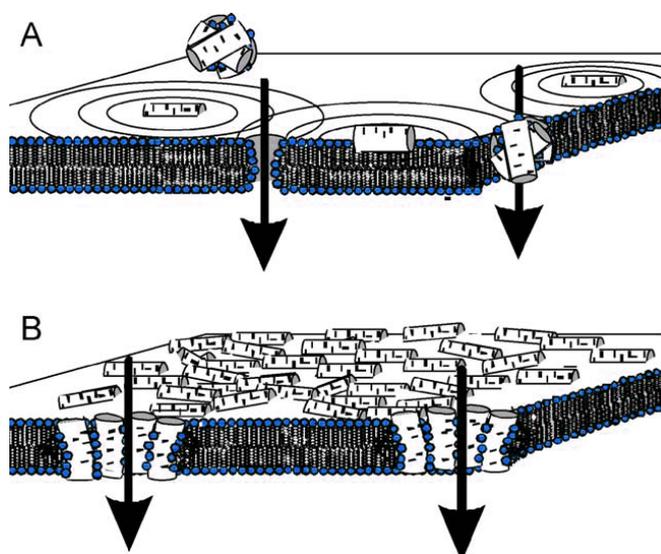


Figura 1.6 - Modelo para o mecanismo de ação tipo detergente exercido por peptídeos antimicrobianos catiônicos. (A) Baixa concentração de peptídeo. Micela peptídica com fosfolipídeos adsorvidos (A, esquerda) e agregado micelar formado na bicamada lipídica (A, direita) (B) Alta concentração de peptídeo na membrana. A desintegração da bicamada ocorre como descrito nos mecanismos anteriores. Figura retirada e modificada de Bechinger (2006).

Ao contrário dos detergentes que, em concentrações baixas (abaixo de sua concentração micelar crítica) não alteram a estrutura da membrana ou ainda as estabilizam, peptídeos antimicrobianos podem desestabilizar a membrana mesmo em concentrações intermediárias (Madden e Cullis, 1982). Assim sendo, o fator predominante neste modelo de detergente é o potencial de agregação e cada peptídeo deve ser analisado separadamente de acordo com sua natureza, como carga e caráter hidrofóbico, as quais são características que influenciam diretamente o grau de agregação das moléculas. Como exemplo, estados de agregação diméricos podem ser observados para a distinctina (Raimondo *et al.*, 2005), estados tetraméricos para a metilina (Terwilliger e Eisenberg, 1982) e estados de agregação superiores para a δ -liusina (Fitton, 1981), cada qual dependendo da concentração e pH específicos. Diferentemente do que ocorre no mecanismo de tapete, cujo estado de agregação forma-se na superfície da membrana, no mecanismo de detergente oligômeros de peptídeos podem ser formados na região hidrofóbica da bicamada lipídica, ou seja, no

seu interior. De fato, estudos recentes mostram que a formação de agregados é termodinamicamente mais favorável no interior da bicamada fosfolipídica do que em solução, e contribuem para a compreensão deste mecanismo de detergente (Babakhani *et al.*, 2008).

1.4 Estudos da interação peptídeo-membrana

Tendo em vista que todos estes modelos não conseguem explicar ainda o modo de ação de muitos peptídeos, há a necessidade de ampliação dos conhecimentos sobre o sistema peptídeo-microrganismo. Para isto, é comum a preparação de meios biomiméticos de composições químicas variáveis, porém compatíveis com os da célula alvo para estudos das interações com peptídeos. Dependendo da composição química e também de condições específicas, como pH, temperatura e concentração, diferentes agregados podem ser formados em solução aquosa (Figura 1.7).

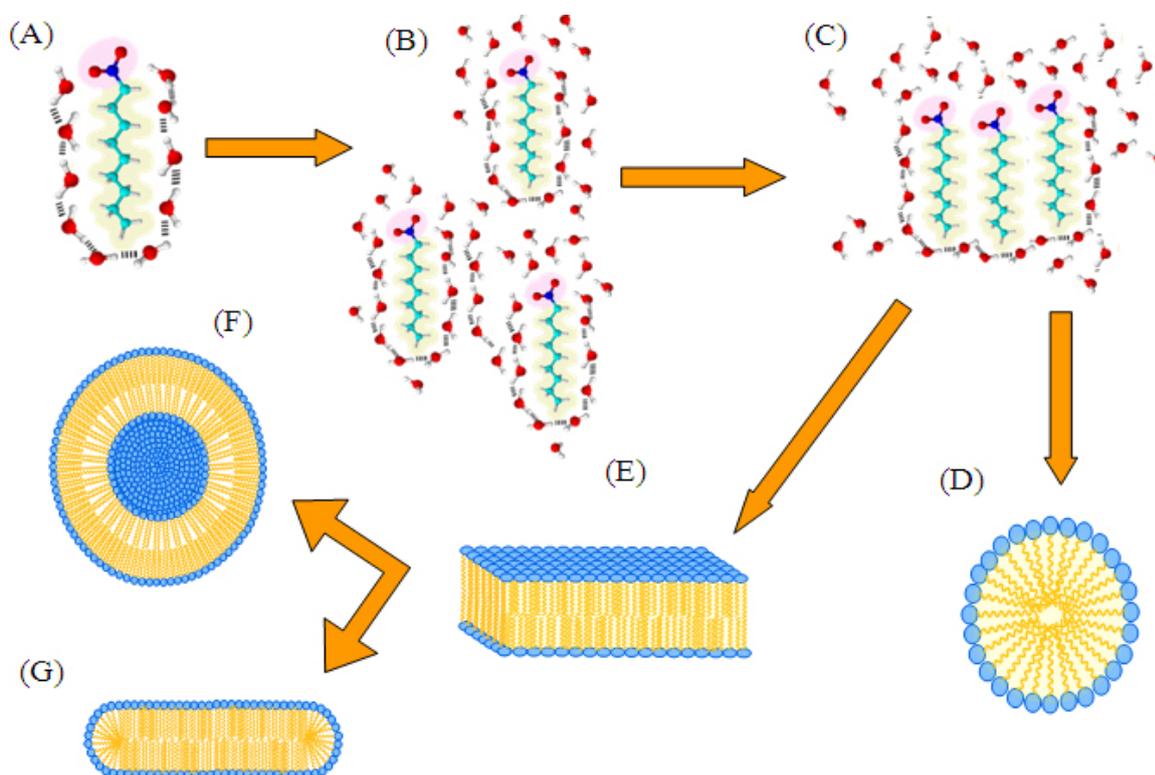


Figura 1.7 – Diferentes sistemas biomiméticos formados por agregados de moléculas anfifílicas. (A) Orientação das moléculas de água ao redor da molécula anfifílica; (B) aproximação das moléculas anfifílicas; (C) agregação dos fosfolípidos decorrente da dessolvatação devido a interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbonadas; (D) estrutura de micelas; (E) bicamada fosfolipídica; (F) vesículas ou lipossomas; (G) bicelas.

As micelas são estruturas esféricas formadas por um agregado de moléculas anfifílicas, conhecidas como detergentes. Estas moléculas se organizam em uma região

hidrofílica, denominada grupamento cabeça, e outra hidrofóbica, formada por uma cadeia longa hidrocarbonada. Na presença de solução aquosa, a região polar hidrofílica interage favoravelmente com o solvente enquanto que região apolar tende a evitar o contato com as moléculas de água. As interações hidrofóbicas mantêm as cadeias apolares próximas e diminuem o número de moléculas de águas responsáveis por solvatar esta região hidrofóbica. O resultado é uma estabilização termodinâmica do sistema, pois ocorre um aumento do número de moléculas de água livre em solução, implicando na sua maior entropia (Fendler, 1980). Devido ao fato dos detergentes apresentarem um grupamento hidrofílico com seção transversal superior à da porção hidrofóbica, como ocorre com as moléculas de dodecilsulfocolina (DPC) e dodecilsulfato de sódio (SDS) (Figura 1.8), a auto-associação em estruturas planares torna-se impossível, levando então à formação de micelas (Figura 1.7D, p.11). Neste tipo de estrutura a região hidrofóbica fica concentrada no interior expulsando as moléculas de água (Figura 1.7D), enquanto que uma superfície hidrofílica é formada na superfície externa da micela (Ollivon *et al.*, 1988).

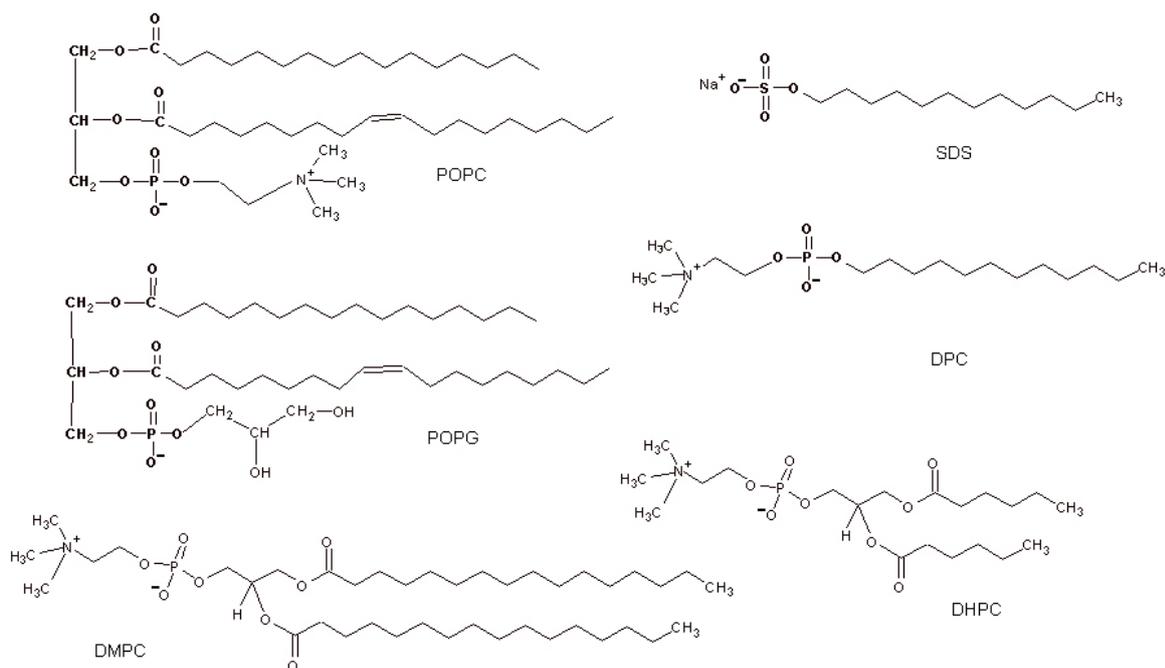


Figura 1.8 – Estruturas químicas de fosfolipídeos comumente empregados em formulações de micelas, bicelas e vesículas.

A bicamada é outro tipo de agregado que pode ser formado, porém pela adição de fosfolipídeos em solução aquosa. Neste caso, duas camadas de fosfolipídeos unem-se formando uma bicamada com superfície superior e inferior hidrofílicas e com o interior composto por uma porção hidrofóbica (Figura 1.7E, p. 11). Este tipo de agregado forma-se quando a seção transversal da porção hidrofílica é similar à da porção

hidrofóbica, como ocorre em moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) (Figura 1.8, p. 12). Entretanto, a região hidrofóbica permanece ainda em contato com a água e este tipo de agregado tende a se reorganizar rapidamente, formando estruturas denominadas de vesículas ou lipossomas (Figura 1.7F, p. 11), que possuem maiores estabilidades termodinâmicas. Nesta estruturação, as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídeos encontram-se completamente isoladas das moléculas de água, resultando em uma maior dessolvatação do sistema. Um último tipo de agregado que se pode formar é conhecido como bicela (Figura 1.7G, p. 11). Este tipo de estrutura é formado em uma mistura de composição definida de fosfolipídeos de cadeias hidrofóbicas longas e curtas, como 1,2-dimiristoil-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-diexanoil-glicero-3-fosfocolina (DHPC), respectivamente (Figura 1.8, p. 12). Tal estrutura pode ser descrita também como uma bicamada formada pelos fosfolipídeos de cadeias longas, circundados por fosfolipídeos de cadeias curtas que protegem a porção hidrofóbica do contato com moléculas de água.

Atualmente, uma variedade de técnicas físico-químicas e biofísicas vem sendo desenvolvida e mesmo adaptada para o estudo da interação destes meios miméticos de membranas bacterianas e peptídeos antibacterianos, gerando dados complementares ao entendimento deste sistema supramolecular formado por ambos. Dentre as diferentes técnicas, pode-se ressaltar o Dicroísmo Circular (CD), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

1.5 Dicroísmo Circular

A necessidade de se estudar mudanças estruturais de peptídeos e proteínas que, por muitas vezes, são essenciais para a sua função biológica, juntamente com a possibilidade do estudo estrutural destas moléculas em ambientes que mimetizam as condições fisiológicas e de membrana celular, tornaram a espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular (CD) uma técnica cada vez mais difundida (Kelly *et al.*, 2005). Neste item serão abordadas características importantes para a compreensão da espectroscopia de CD aplicada a estudos estruturais de peptídeos e proteínas.

Considerando que o plano da luz linearmente polarizada pode ser visto como um somatório de duas componentes circularmente polarizadas e de mesma magnitude, porém girando em sentidos contrários, tem-se uma em sentido horário (E_R) e outra em sentido anti-horário (E_L) (Figura 1.9A, p. 14). A espectroscopia eletrônica de dicroísmo circular baseia-se na absorção preferencial de uma das componentes circulares da luz

polarizada linearmente pelos cromóforos de uma determinada amostra opticamente ativa. Se, após atravessarem a amostra, as magnitudes dos vetores elétricos da luz circularizada E_L e E_R são proporcionalmente alteradas, ou seja, as componentes E_L e E_R são absorvidas igualmente, a recombinação regenera a radiação linearmente polarizada original (Figura 1.9A). Entretanto, se ao atravessarem a amostra, E_L e E_R são absorvidas em extensões diferentes, a luz passa a apresentar uma diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares, resultando numa polarização elíptica e sendo esta radiação resultante denominada de luz elipticamente polarizada (Figura 1.9B).

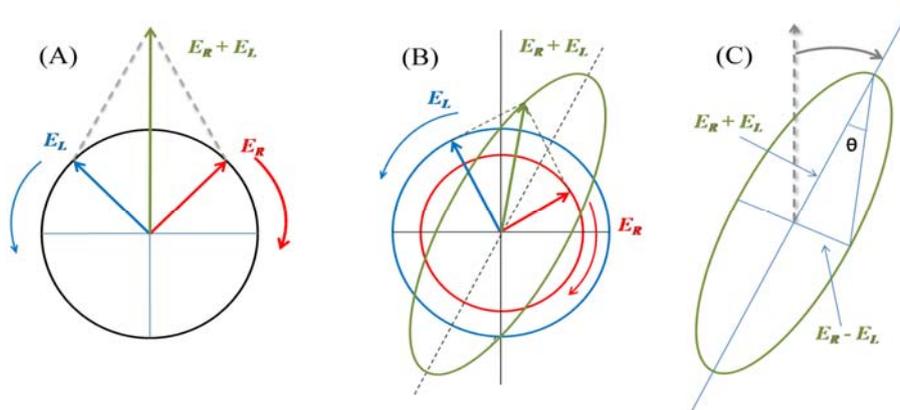


Figura 1.9 - Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas E_R (sentido horário e em vermelho) e E_L (sentido anti-horário e em azul). (A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação plano polarizada (em verde); (B) componentes de magnitude diferente que resultam em uma luz elipticamente polarizada (elipse em verde). (C) Elipicidade θ , tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Figura adaptada de Kelly (2005).

Os instrumentos de CD medem a diferença de absorvância das componentes circulares da luz polarizada linearmente ($\Delta E = E_L - E_R$) em função do comprimento de onda (λ). Esta diferença é descrita normalmente em termos de elipicidade (θ), a qual representa a tangente obtida da razão entre o menor e o maior eixo da elipse (Equação 1.1), conforme representada na Figura 1.9C.

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (1.1)$$

A elipicidade pode assumir valores positivos ou negativos em função de qual componente da luz é preferencialmente absorvida. Nos estudos estruturais de peptídeos e proteínas, o efeito de CD é geralmente pequeno, correspondendo a uma diferença de absorvância ($\Delta E = E_L - E_R$) da ordem de 3×10^{-4} . Dessa forma, é imprescindível uma

quantificação da concentração de peptídeos e proteínas para garantir que os dados obtidos sejam realmente significativos. Assim, sabendo-se a concentração molar (m) da amostra, a elipcidade molar no comprimento de onda λ ($[\theta]_{\text{molar},\lambda}$) pode ser determinada segundo a Equação 1.2:

$$[\theta]_{\text{molar},\lambda} = \frac{100 \times \theta_{\lambda}}{m \times d} \quad (1.2)$$

onde θ é a elipcidade observada (em graus) no comprimento de onda λ e d é o comprimento do caminho ótico (cm). Os sinais de CD, devido às variações de θ , surgem somente quando ocorre absorção de radiação por parte de grupos cromóforos. No caso de peptídeos, o grupo amido ($R_1\text{-(C=O)-NH-R}_2$) que forma a ligação peptídica é o de maior importância nos estudos por dicroísmo circular, embora possam ainda existir contribuições de grupos aromáticos (Krittanaí e Johnson, 1997). A absorção em comprimentos de onda (λ) menores que 240 nm deve-se a transições eletrônicas na ligação peptídica, cujas intensidades e energias intrínsecas dependem dos ângulos de rotação ϕ e ψ (Figura 1.10). Esses ângulos, por sua vez, dependem da conformação, do estado de agregação e das interações que a molécula pode fazer com o solvente ou com outras espécies (ex. detergente ou fosfolípidos). Os ângulos ϕ e ψ definem as condições de coplanaridade dos orbitais envolvidos na ligação peptídica, sendo característicos para cada tipo de estrutura secundária regular (Figura. 1.10) (Waltho *et al.*, 1993).

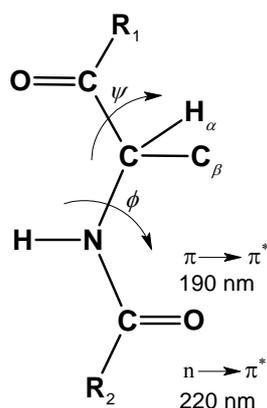
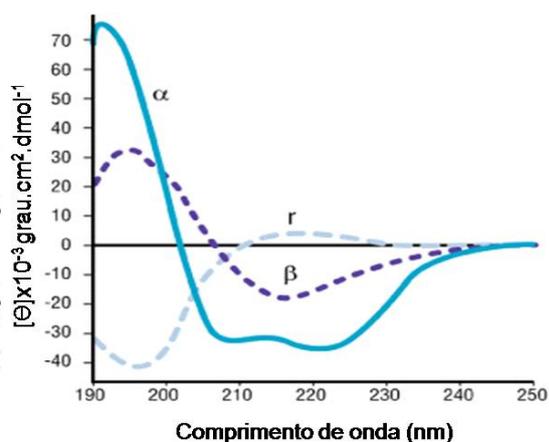


Figura 1.10 - Sistema $R_1\text{-(C=O)-NH-R}_2$ com suas respectivas transições eletrônicas.

Como resultado, bandas espectrais devidas às absorções características associadas aos ângulos ϕ e ψ de cada estrutura secundária podem ser facilmente atribuídas a diferentes conformações do peptídeo. Os espectros de dicroísmo circular dos padrões para estruturas canônicas (α -hélice, folha- β e randômica) podem ser

visualizados na Figura 1.11, juntamente com os principais comprimentos de onda de absorção e as respectivas transições eletrônicas para cada tipo de estrutura.



Estrutura	Transição	λ/nm
Randômica (r)	$n \rightarrow \pi^*$	Positivo a 212
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 195
Folha-β	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 196
	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 218
α-hélice	$\pi \rightarrow \pi^*$	Positivo a 192
	$\pi \rightarrow \pi^*$	Negativo a 209
	$n \rightarrow \pi^*$	Negativo a 222

Figura 1.11 - Espectros de dicroísmo circular típicos de peptídeos estruturados. A tabela à direita apresenta os principais comprimentos de onda de absorção e as respectivas transições eletrônicas, representativos de cada tipo de estrutura.

Finalmente, a determinação da estrutura secundária média pode ser realizada então por comparação dos espectros de CD de uma dada amostra com espectros de padrões de estrutura secundária conhecida e a quantificação do conteúdo de estruturação pode ser realizada por meio de cálculos de desconvolução. Nestes cálculos é considerado que o espectro de CD do peptídeo seja uma combinação linear de diferentes espectros.

Portanto, as informações obtidas por CD facilitam a obtenção das condições ideais para a realização de um experimento de RMN, pois, indicam as preferências conformacionais do peptídeo em um dado sistema.

1.6 Ressonância Magnética Nuclear

Nas últimas duas décadas, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) surgiu como uma ferramenta indispensável para a elucidação estrutural de moléculas biológicas em solução, particularmente proteínas e peptídeos (Wüthrich, 1986; Cavanagh, 1996; Cavanagh *et al.*, 2006). Isto se deve à versatilidade na obtenção de dados nos mais diversos meios, além do fornecimento de informações de dinâmicas estruturais, bem como de estados de agregação e reatividade de sítios específicos. Os primeiros trabalhos com estudos de RMN para a obtenção de estruturas tridimensionais de biomacromoléculas surgem no início da década de 1980 com a determinação estrutural do *glucagon* (Braun *et al.*, 1981) e o estudo conformacional de uma insetotoxina de escorpião em solução aquosa (Arseniev *et al.*, 1984). Posteriormente,

foram realizadas a elucidação estrutural da aI-purotionina, com resultados similares à obtida por difração de raios-X (Clare *et al.*, 1986), e a determinação do inibidor peptidase IIA (Williamson *et al.*, 1985).

A partir de meados da década de 1980, verificou-se o uso crescente de RMN em duas dimensões (RMN 2D) na análise tridimensional de biomacromoléculas. Apesar de a conversão de dados obtidos dos mapas de contornos de RMN em informações estruturais não ser um procedimento trivial, o uso de métodos computacionais, incluindo refinamentos baseados em simulações teóricas, tem sido uma ferramenta importante nesses estudos. Tais métodos tiveram maiores aceitações após a determinação estrutural do tendamistato por RMN (Kline *et al.*, 1986), com resultados similares aos obtidos por difração de raios-X (Pflugrath *et al.*, 1986). Nessa mesma época, Wüthrich introduziu a metodologia de atribuição sequencial, baseada na identificação de sistemas únicos de *spin* em cadeias polipeptídicas e de ácidos nucleicos (Wüthrich, 1986). Por esta metodologia pôde-se sistematizar a obtenção de informações estruturais dos mapas de contornos de RMN 2D. Desde então, a espectroscopia de RMN e sua aplicação aos estudos de biomacromoléculas desenvolveram-se consideravelmente, obtendo-se espectros em aparelhos de alto campo, propiciando resolução elevada e mapas de contornos multidimensionais com pouca ou nenhuma sobreposição de sinais.

Atualmente, uma crescente diversificação de técnicas de RMN combinadas a métodos computacionais tem sido verificada para a determinação estrutural de biomacromoléculas, justificando uma revisão dos seus usos em análises configuracionais (e.g. presença de *D*-aminoácidos ou de ligações peptídicas com configuração *sin*) e conformacionais. As principais técnicas bi-dimensionais e metodologias da RMN na determinação estrutural de peptídeos estão descritas nesta seção.

1.6.1 RMN bi-dimensional: TOCSY e NOESY

Uma característica fundamental explorada pela espectroscopia de RMN é o fato de que os momentos magnéticos de núcleos individuais interagem com pequenos campos magnéticos criados pelos *spins* de núcleos próximos. Este tipo de interação *spin-spin* pode ser usado para correlacionar núcleos diferentes em uma molécula (Figura 1.12A, p.18). Os núcleos de uma molécula podem interagir via ligação química ou através do espaço. A transferência de magnetização para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , por exemplo) via ligação química ocorre pela transmissão de polarização dos

elétrons envolvidos nas ligações, sendo um fenômeno conhecido como acoplamento *spin-spin* ou acoplamento escalar J . O outro tipo de transferência de magnetização ocorre pelo espaço, sendo conhecido como acoplamento dipolar DD e sua ação na relaxação molecular é a base para o efeito nuclear *Overhauser* (nOe) (Figura 1.12B), o qual permite estimar distâncias entre núcleos de hidrogênio. A análise detalhada de espectros de peptídeos e proteínas está baseada nas correlações via ligação química e naquelas através do espaço (Cavanagh *et al.*, 2006).

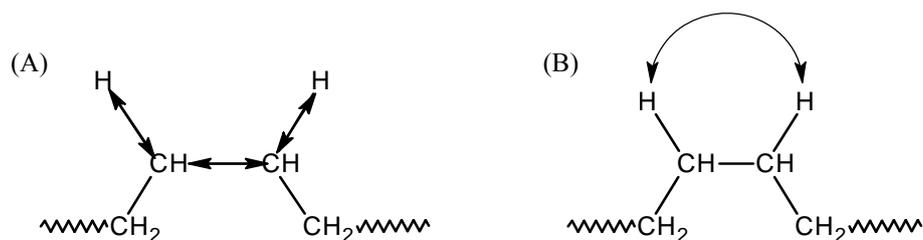


Figura 1.12 - Representação das transferências de magnetização por ligação química e pelo espaço. (A) Interação *spin-spin* pela transmissão de polarização dos elétrons envolvidos na ligação. (B) nOe - Interação direta pelo espaço entre núcleos de hidrogênio. As setas indicam o caminho da transferência de magnetização.

As correlações *spin-spin* são usadas para a identificação de um grupo de *spins* individuais em um sistema de *spins*. Experimentos COSY (*Correlation Spectroscopy*, Figura 1.13A) e TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*, Figura 1.13B) são exemplos de técnicas que correlacionam núcleos diferentes via acoplamento J (Aue *et al.*, 1976; Wider e Wüthrich, 1999).

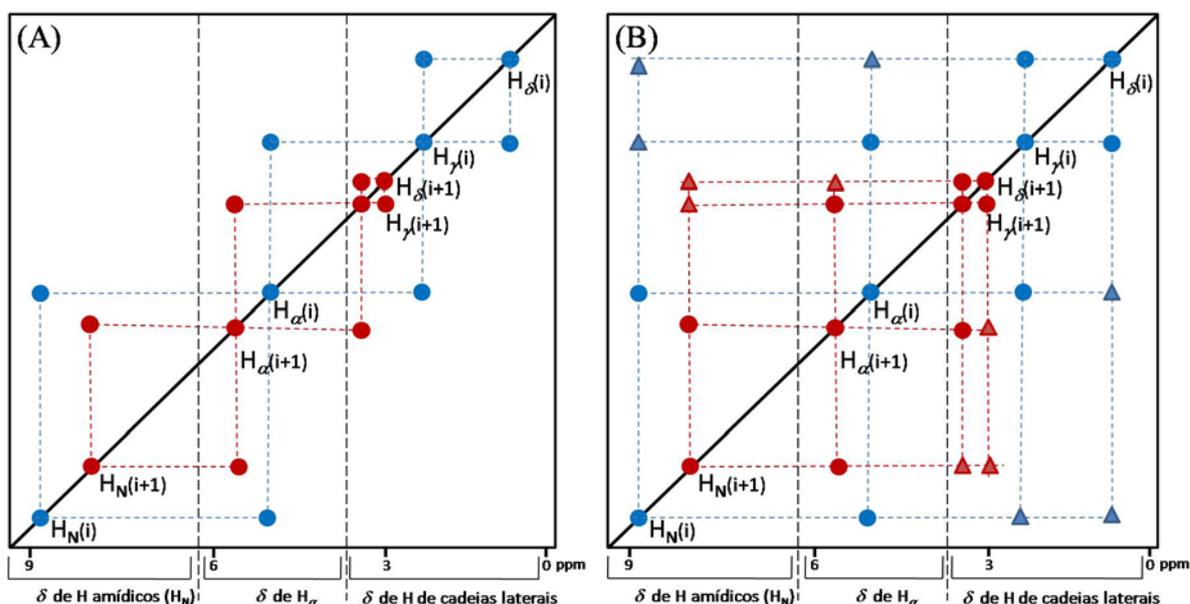


Figura 1.13 - Exemplos de experimentos bidimensionais de RMN para determinação de sistemas de *spin* de resíduos de aminoácidos. (A) COSY e (B) TOCSY. Os pontos em azul e vermelho representam correlações intra-residuais de diferentes resíduos de aminoácidos.

Uma característica importante destes experimentos é a possibilidade de verificar a interação entre diferentes tipos de núcleos. Assim, muitos experimentos de RMN com macromoléculas biológicas utilizam-se das técnicas 2D-COSY ou 2D-TOCSY (Figura 13, p. 18) para obter os padrões de sistemas de *spins* de cada resíduo de aminoácido na molécula, ou seja, correlações intra-residuais.

As correlações no espaço constituem a base para informação geométrica exigida para determinar a estrutura de uma macromolécula e são obtidas através da medida do efeito nuclear Overhauser (nOe) (Wider e Wüthrich, 1999). Os nOes são detectados para pares de átomos de hidrogênio separados no espaço por distâncias máximas de 5 Å. Experimentos de RMN dependentes do nOe são denominados NOESY, acrônimo de nOe *Spectroscopy* (Kumar *et al.*, 1980). Em contraste com as informações obtidas pelas experiências de COSY ou TOCSY, os núcleos envolvidos nas correlações de nOes podem pertencer a resíduos de aminoácidos distantes ao longo do esqueleto primário do peptídeo ou da proteína (interações inter-residuais), mas não no espaço. Na Figura 1.14 é possível observar um esquema do mapa de contornos NOESY, no qual são mostradas as correlações intra-residuais (círculos sólidos) e inter-residuais (símbolos vazados).

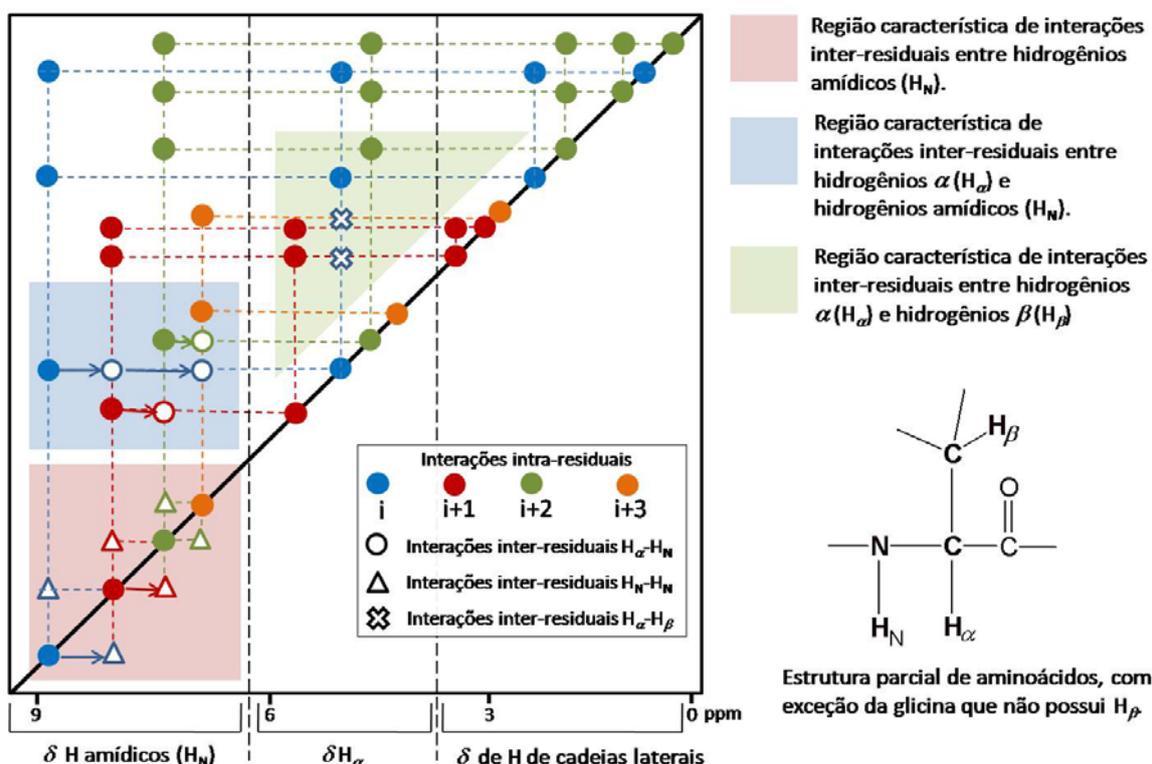


Figura 1.14 - Exemplo de um experimento bidimensional dependente do Efeito Nuclear Overhauser – NOESY. Os círculos cheios representam nOes intra-residuais e os círculos vazados nOes inter-residuais.

As regiões coloridas do mapa de contornos da Figura 1.14 (p. 19) representam regiões características de interações inter-residuais entre núcleos de ^1H de estruturas α -helicoidais, as quais serão detalhadas no próximo subitem (Figura 1.15). O método de RMN para determinação de estrutura terciária de proteínas ou peptídeos é baseado em uma rede densa de limites de distâncias derivados de nOes entre átomos de hidrogênio espacialmente próximos na molécula (Wüthrich, 1986).

1.6.2 Assinalamento sequencial de peptídeos e proteínas

O método de atribuição sequencial proposto por Kurt Wüthrich (1986) combina espectros bidimensionais correlacionados para obter mapas de conectividades intra e inter-residuais de hidrogênios*. Os mapas de contornos 2D-COSY ou 2D-TOCSY permitem obter conectividades através das ligações (acoplamento J) em um único resíduo (intra-residuais, como por exemplo o acoplamento 3J $\text{H}\alpha\text{-C-N-H}$, ver Figura 1.15A), identificando o sistema de *spin* de cada resíduo na sequência peptídica.

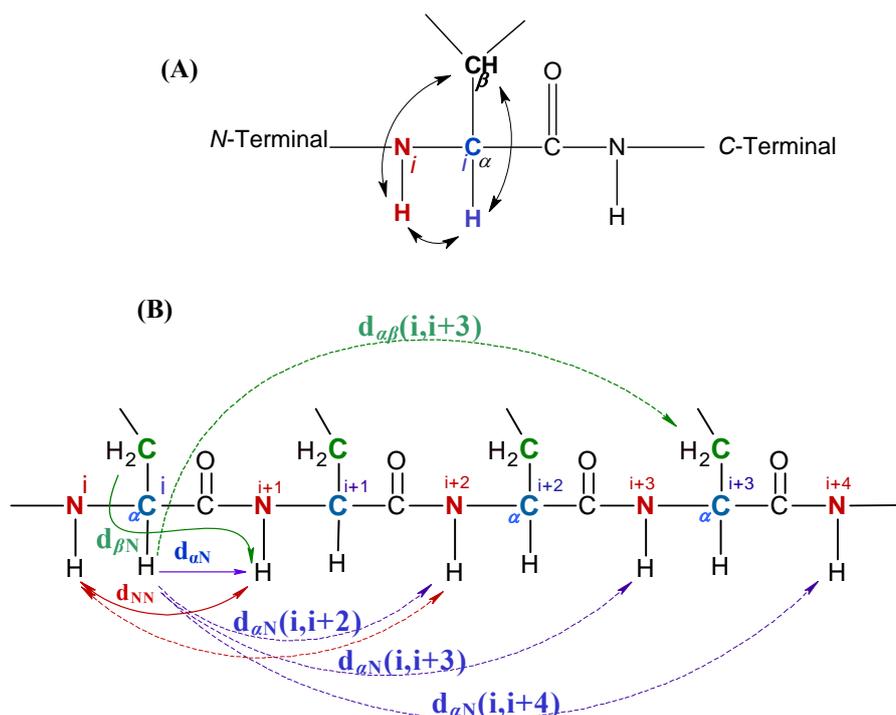


Figura 1.15 - Representação de nOes típicos de estrutura secundária em α -hélice. (A) Possíveis interações entre núcleos de hidrogênios intra-residuais e (B) inter-residuais.

No experimento 2D-NOESY, obtêm-se as conectividades através do espaço (acoplamento dipolar) não apenas no mesmo resíduo mas, também, em resíduos consecutivos ou, até mesmo, separados por mais de uma ligação peptídica, desde que espacialmente próximos (Figura 1.15B). Desta forma, o mapa de contornos 2D-NOESY permite identificar o vizinho mais próximo de um dado resíduo na sequência e,

*Para se empregar a metodologia de Wüthrich de assinalamento sequencial, a estrutura primária do peptídeo deve ser previamente conhecida.

consequentemente, fazer a atribuição de deslocamentos químicos para toda a sequência peptídica.

1.6.3 Obtenção de estruturas tridimensionais

Geralmente, os resultados obtidos por RMN não podem ser usados de forma direta na determinação das estruturas secundária e terciária de peptídeos e proteínas. Normalmente, estes dados são convertidos em restrições geométricas conformacionais e, assim, usados para o cálculo das estruturas (Wüthrich, 1986; Cavanagh *et al.*, 2006). O cálculo de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas frequentemente envolve três tipos de restrições: restrições de distância, restrições de ângulos diedros (ou ângulos de torção) e restrições conformacionais.

As restrições de distância podem ser obtidas de mapas de contornos NOESY ou 2D-COSY. No primeiro, as restrições são derivadas de nOes. A transferência de magnetização ocorre através do espaço, devido à interação de dois núcleos entre si, mesmo que eles estejam distantes na estrutura primária da molécula. A intensidade, ou volume V do sinal de nOe é dependente do valor médio da sexta potência do inverso da distância r_{ij} entre os dois núcleos i e j que interagem entre si, multiplicado por um fator $f(\tau_c)$, que leva em conta efeitos globais e movimentos internos da molécula, conforme apresentado na Equação 1.3.

$$V = \langle r^{-6} \rangle f(\tau_c) \quad (1.3)$$

Estas correlações (nOes) são classificadas de acordo com suas intensidades, como fracas, médias ou fortes, correspondendo às distâncias espaciais entre núcleos de hidrogênios, respectivamente de 3,5 a 5,0 Å, de 2,5 a 3,5 Å e de 1,5 a 2,5 Å (Markley *et al.*, 1998). Embora a classificação seja semi-quantitativa, estes valores de distâncias refletem melhor a dinâmica das moléculas, além de evitar erros de integração dos sinais sobrepostos nos espectros (Nabuurs *et al.*, 2004).

As restrições de distâncias derivadas de ligação de hidrogênio podem ser obtidas a partir de constantes de acoplamento ${}^3J_{\text{NH}}$ provenientes de espectros 2D-COSY e, em especial, de restrições de distâncias sequenciais e de médio alcance (Guentert, 1998a). As restrições consistem em estipular valores máximos e médios de distância de forma que os átomos envolvidos nesse tipo de interação (átomo doador de elétrons e hidrogênio receptor de elétrons) tenham entre si distâncias consideradas ótimas para a ligação de hidrogênio (entre 1,8 e 2,0 Å). Essa relação é ilustrada na Figura 1.16A

(p. 22), que representa a situação mais utilizada em cálculos estruturais, em que são determinadas as restrições entre o hidrogênio amídico da ligação peptídica e o oxigênio de uma carbonila porém pertencente a outro resíduo de aminoácido. Nas estruturas em α -hélice são comumente observadas ligações de hidrogênio inter-residuais na cadeia principal dos tipos $i-i+3, i-i+4$ (mais comuns) e $i-i+5$, entre hidrogênios amídicos e oxigênios carbonílicos, conforme mostrado na Figura 1.16B.

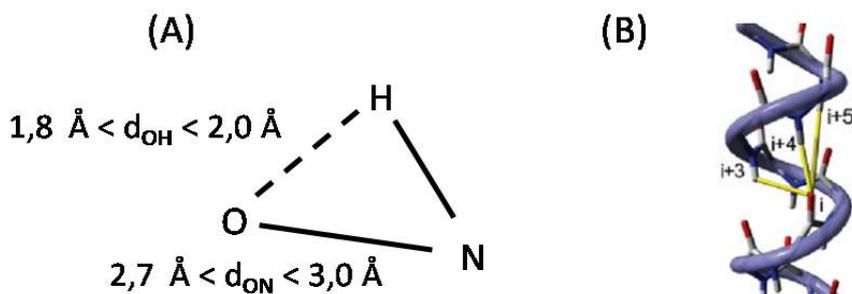


Figura 1.16 – Restrições de distâncias derivadas de ligação de hidrogênio. (A) Limites de valores de distância para as restrições de ligação de hidrogênio. (B) Estrutura α -hélice determinada inequivocamente, com representação, em tubo amarelo, das três restrições de ligação de hidrogênio encontradas para essa molécula. Figura adaptada de Nabuurs (2004).

Nas restrições de ângulos diedros, as distâncias interatômicas, assim como os ângulos ϕ e ψ , podem ter também seus valores restritos, com base em dados advindos de experimentos de RMN. Tradicionalmente, utilizam-se valores de constante de acoplamento escalar do tipo 3J , que podem ser convertidos em valores angulares por meio da relação de Karplus (1959), descrita na Equação 1.4:

$${}^3J(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (1.4)$$

em que θ descreve o ângulo diedro entre os quatro átomos envolvidos (Figura 1.10, p. 15) e os três parâmetros A , B e C foram determinados empiricamente, utilizando-se modelos de estruturas provenientes de experimentos de difração de raios-X.

Os valores de 3J são obtidos normalmente por experimentos de RMN de ${}^1\text{H}$ unidimensionais e, quando há resolução espectral suficiente, por DQF-COSY, TQF-COSY e E.COSY (Griesinger *et al.*, 1985; Mujeeb *et al.*, 1999), além do experimento COSY sensível à fase (Delaglio *et al.*, 2001). Entretanto, experimentos de RMN de ${}^1\text{H}$ unidimensionais são muitas vezes inviáveis, devido à grande sobreposição de sinais, enquanto que os experimentos DQF-COSY, TQF-COSY e E.COSY não costumam fornecer resultados satisfatórios, em especial quando se trabalha com macromoléculas com abundância isotópica natural ou quando as correlações cruzadas não exibem estrutura fina e a maior parte das diagonais dos multipletos se sobrepõe (Delaglio *et al.*,

2001). Além disso, a conversão desses dados em restrições deve ser feita de forma manual, sem levar em consideração a imprecisão do experimento, devido à falta de algoritmos para realizar esse tipo de conversão. No caso do COSY sensível à fase, é possível realizar a conversão dos valores de constante de acoplamento 3J em restrições, mas os diversos tratamentos que devem ser dispensados ao espectro para que se extraiam as restrições tornam essa técnica um tanto proibitiva e pouco utilizada.

As restrições angulares podem, no entanto, ser obtidas por meio de valores de deslocamento químico dos átomos pertencentes à cadeia principal do peptídeo ou proteína em estudo. Para isto são utilizados os programas TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999) e sua versão mais recente TALOS+ (Shen *et al.*, 2009). Ambos os programas baseiam-se no fato de que os valores de deslocamento químico são grandezas extremamente sensíveis ao ambiente químico em que se encontra o núcleo (Wishart *et al.*, 1992; Vranken e Rieping, 2009). Assim sendo, combinações dos ângulos diedros ψ e φ contribuem significativamente para os valores de deslocamento químico dos átomos que compõem a cadeia principal da biomolécula. Esses programas fazem uso de uma base de dados de deslocamentos químicos de átomos de inúmeras estruturas de alta resolução e, utilizando diversos cálculos e tratamentos estatísticos, determinam com precisão significativa as restrições angulares.

As restrições conformacionais descritas até agora foram restrições a curta distância. Elas são de grande importância na análise conformacional de proteínas globulosas e peptídeos de massas moleculares baixas. No caso de peptídeos ou proteínas com disposições espaciais relativamente menos globulares, informações sobre restrições conformacionais de longas distâncias envolvendo principalmente suas extremidades devem ser consideradas na análise conformacional (Clore *et al.*, 1999). O acoplamento dipolar entre núcleos pode ser usado para a obtenção de informações sobre estruturas de moléculas em líquidos, pois permite inferir sobre interações à longa distância que dependem tanto da distância entre dipolos magnéticos quanto de suas orientações em relação ao campo magnético externo B_0 . Em soluções isotrópicas, a dependência do acoplamento dipolar em relação a B_0 é anulada, devido ao fato de as amostras solubilizadas não adquirirem ordenação em razão da rotação das moléculas e do movimento browniano (Lipsitz e Tjandra, 2004).

Por outro lado, biomacromoléculas sob a forma cristalina apresentam restrições de movimento e alinhamento total dos vetores dipolo magnético em um campo B_0 , resultando em acoplamentos dipolares muito grandes, a ponto de interferirem na análise de RMN. Portanto, em soluções isotrópicas e na forma cristalina, torna-se usualmente

difícil a medida do acoplamento dipolar. Entretanto, amostras podem ser ordenadas em meios líquidos fracamente orientados como cristais líquidos e bicelas, fornecendo acoplamentos dipolares pequenos e mensuráveis, que são denominados de acoplamentos dipolares residuais (RDC). Esse acoplamento está relacionado à colisão entre moléculas da amostra e do solvente, resultando em uma ordenação mínima e RDC mensurável (Tjandra e Bax, 1997). Os RDCs podem ser medidos através dos mapas de contornos $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ HSQC ou $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ HSQC sem desacoplamento na dimensão do nitrogênio ou carbono, respectivamente. A Figura 1.17 apresenta exemplos para $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ HSQC.

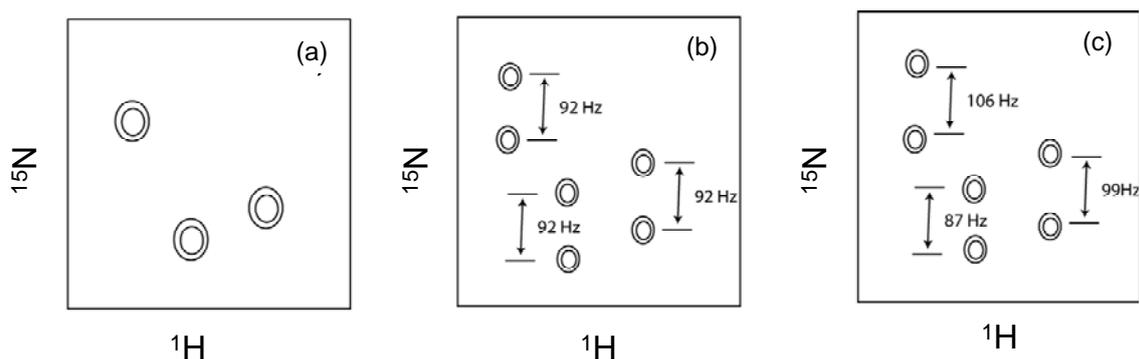


Figura 1.17 – Exemplo de mapas de contornos HSQC para determinação de RDC. (a) desacoplado em ambas as dimensões, com desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ não observados; (b) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , em solução isotrópica, com desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ iguais ao acoplamento escalar $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ (~92 Hz); (c) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , meio parcialmente orientador, desdobramentos $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ somados aos RDCs.

Após a obtenção das restrições conformacionais a partir dos dados de RMN, modelos de estrutura tridimensional deverão ser obtidos a partir dos dados coletados. Existem diversas metodologias de cálculo e, dentre elas, destacam-se como as mais importantes o cálculo em geometria de distâncias (Braun *et al.*, 1981; Havel e Wüthrich, 1984), o cálculo por funções-alvo variáveis (Braun e Go, 1985) e o arrefecimento simulado, também conhecido pela expressão em inglês *simulated annealing* (SA) (Nilges *et al.*, 1988; Brunger *et al.*, 1997). Embora, as duas primeiras técnicas citadas sejam ainda utilizadas, o método de arrefecimento simulado é atualmente o mais empregado no cálculo de estruturas a partir de dados de RMN.

O SA consiste em um procedimento de minimização de energia por dinâmica molecular. O método é baseado em uma técnica comum em metalurgia para preparo de estruturas metálicas mais estáveis através de um aquecimento rápido do metal e, subsequentemente, resfriamento lento e controlado. No estudo de biomacromoléculas, essa variação de temperatura é simulada teoricamente, mostrando-se bastante eficiente para a obtenção de estruturas estáveis (Brunger *et al.*, 1990). A Figura 1.18 mostra

esquemáticamente as mudanças de conformação sofridas durante uma simulação de SA. Como resultado, seria esperada a obtenção de geometrias com energias próximas à do mínimo global das estruturas estudadas (Nilges *et al.*, 1988).

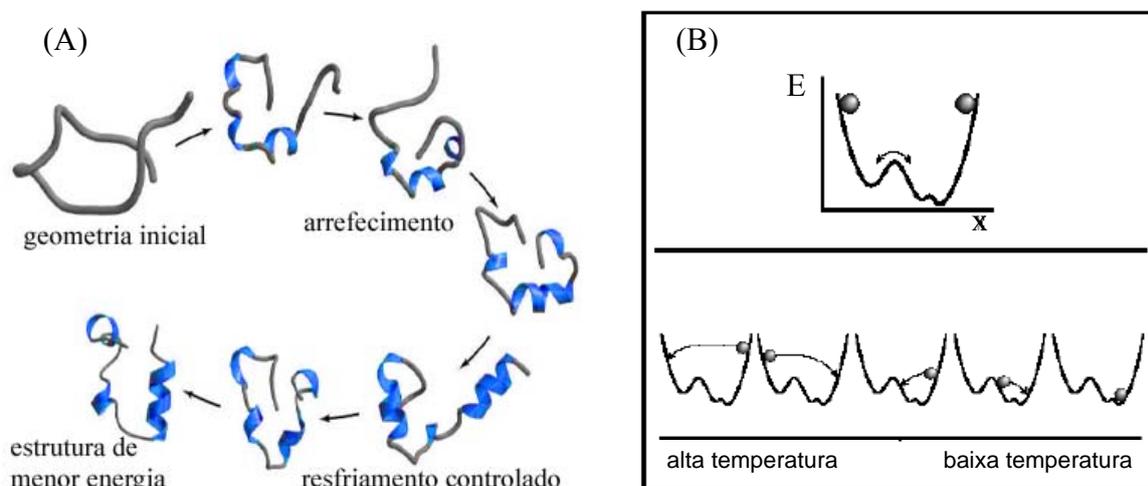


Figura 1.18 - Representação das mudanças sofridas por uma molécula durante o processo de cálculo por arrefecimento simulado. (A) na conformação e (B) na energia (Nilges, 2001).

Apesar de o arrefecimento simulado ser bastante eficiente e rápido na busca de mínimos locais, todo o cálculo estrutural é feito considerando o sistema no vácuo, ou seja, sem considerar efeito algum do solvente. Isso pode resultar em estruturas de baixa energia, mas que não condizem com o sistema real. Para contornar isso, é recomendável analisar detalhadamente parâmetros de qualidade estrutural e realizar refinamentos na presença de moléculas de solventes.

1.7 Titulação calorimétrica

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma das técnicas mais empregadas para descrição termodinâmica de diferentes sistemas biomoleculares. Assim como o CD e a RMN, a calorimetria de titulação isotérmica permite o estudo em ambientes muito similares ao de membranas biológicas, como vesículas de bicamadas fosfolipídicas (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Seelig, 2004). Durante as últimas décadas, esta técnica tem se tornado muito popular no estudo de todos os tipos de interação, incluindo interações proteína-ligante e peptídeo-ligante. O crescente uso desta técnica pode ser atribuído principalmente a três fatores. Primeiramente, o desenvolvimento de calorímetros de alta-sensibilidade que permite a medida de interações em concentrações na ordem de micromolar (Wiseman *et al.*, 1989). Segundo, o fato de que os processos químicos e físicos ocorrem por absorção ou liberação de

calor, podendo ser monitorados diretamente por estes fenômenos sem o emprego de espectroscopia específica ou de marcações isotópicas (Turnbull e Daranas, 2003). E, por último, a capacidade de propiciar a medida da entalpia de interação (ΔH^0) do sistema.

Por meio da técnica ITC pode-se obter a isoterma de interação, possibilitando uma completa descrição termodinâmica do sistema com a obtenção de parâmetros termodinâmicos como ΔH^0 , ΔG^0 e ΔS^0 . Tais parâmetros podem resultar em informações como constantes de interação (K) ou, até mesmo, fornecer evidências sobre o mecanismo de interação do sistema em estudo.

Um equipamento moderno de ITC é composto por uma célula de medida e outra de referência, sendo ambas com o volume de aproximadamente 1 mL. O titulado fica contido na célula de medida, enquanto que o titulante é injetado automaticamente nesta célula por uma micro-seringa, a qual também atua simultaneamente como um agitador mecânico homogeneizando o sistema na célula de medida. Cada volume de injeção da seringa pode variar entre 1 a 30 μL . O calor absorvido ou liberado pela interação é medido empregando-se um sistema de resposta eletrônico (*eletronic feedback system*), que mantém as células de medida e referência sempre a uma mesma temperatura. A célula de referência é sempre mantida sob um pequeno aquecimento constante, o que mantém também a temperatura constante, enquanto que, na célula de medida, o fluxo de aquecimento é ajustado a cada injeção para corrigir a diferença de temperatura entre as duas células. Portanto, em uma reação exotérmica que leva a um aumento de temperatura da célula de medida, o fluxo de calor desta é reduzido para manter constante a temperatura do sistema. A Figura 1.19 mostra a variação do fluxo de calor em função do tempo em uma titulação calorimétrica para um processo exotérmico.

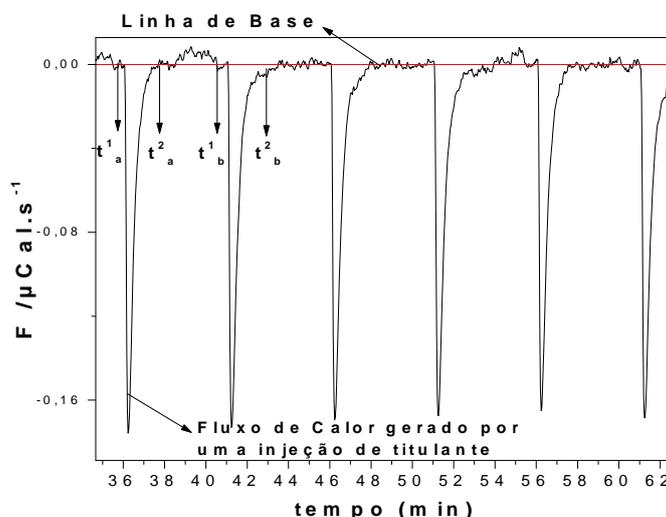


Figura 1.19 - Fluxo de Calor em função do tempo para uma Titulação Calorimétrica de um processo exotérmico.

Cada injeção de titulante produz uma liberação de calor no sistema gerando uma diminuição no fluxo de calor do equipamento durante um intervalo de tempo compreendido entre t_i^1 e t_i^2 , retornando a temperatura da célula de reação antes da próxima injeção. No caso de uma reação endotérmica, o sistema requer um aumento no fluxo de calor para compensar a diminuição da temperatura do mesmo (Hiemenz *et al.*, 1997). Assim sendo, o sinal medido pelo instrumento é justamente esta variação do fluxo de calor a cada injeção, o qual é sensível o bastante para detectar medidas de calor de reação de aproximadamente 1 μcal , o que corresponde a uma detecção de variação de temperatura da ordem de 10^{-5} K (Wiseman *et al.*, 1989). O tempo necessário para restauração do equilíbrio de temperatura entre as células está na faixa de 4 a 10 min. Após este intervalo, uma nova injeção é realizada. Um experimento padrão com objetivo de medir interações é realizado com dez a cinquenta injeções, podendo durar de 40 a 500 min.

O calor envolvido em cada perturbação pode ser determinado pela integração numérica de cada pico no intervalo de tempo $t_i^2 - t_i^1$ que deve ser padronizado em cada experimento (Turnbull e Daranas, 2003). A Equação 1.5 que descreve o sistema, define a entalpia molar de complexação $\overline{\Delta_{comp}H}$ à pressão constante, onde X é a quantidade molar do titulante e Q_p o calor medido à pressão constante.

$$\overline{\Delta_{comp}H} = \left(\frac{dQ_p}{d[X]_{tot}} \right)_p = \int_{t_i^1}^{t_i^2} F dt \quad (1.5)$$

Um gráfico que exemplifica o procedimento completo da titulação é mostrado na Figura 1.20, relacionando $\overline{\Delta_{inj}H^o}$ e a razão molar do titulado.

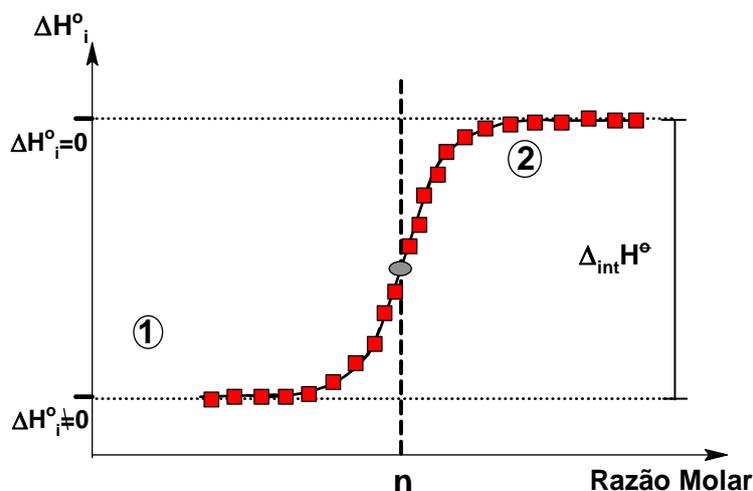


Figura 1.20 - Gráfico qualitativo de um experimento calorimétrico onde uma substância titulada possui um sítio de complexação. Figura retirada e adaptada de Wiseman (1989).

No estudo termodinâmico por ITC para interação entre peptídeo e lipídeo, normalmente, dois experimentos diferentes podem ser realizados por um equipamento de ITC para se obter a entalpia da reação e a isoterma de ligação (Seelig, 2004). A entalpia de reação ΔH^0 pode ser obtida através de um único experimento, no qual a célula do calorímetro contém a suspensão de vesículas de lipídeos, normalmente na faixa de concentração entre 10 e 20 mmol.L⁻¹. Neste mesmo experimento, uma solução do peptídeo com um fator de diluição entre 100 e 200 em relação à concentração de lipídeo é colocada na seringa do calorímetro e pequenas alíquotas (5-10 μ L) são adicionadas à suspensão em intervalos de tempo fixos. A razão molar lipídeo-peptídeo na célula de reação encontra-se então na ordem de 10.000. Quando a afinidade entre lipídeo e peptídeo é suficientemente forte, pode-se considerar que todo o peptídeo injetado estará completamente ligado às vesículas. Um experimento deste tipo foi realizado no estudo da interação do peptídeo antimicrobiano mangainina 2 (M2a) com vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) (Wieprecht *et al.*, 1999). O resultado da titulação de M2a em POPC-SUVs pode ser observado na Figura 1.21A. A Figura 1.21B mostra os calores de cada injeção obtidos a partir da integração dos traços calorimétricos. A entalpia de interação ΔH^0 pode ser calculada dividindo-se o calor de injeção pela quantidade molar de peptídeo injetado.

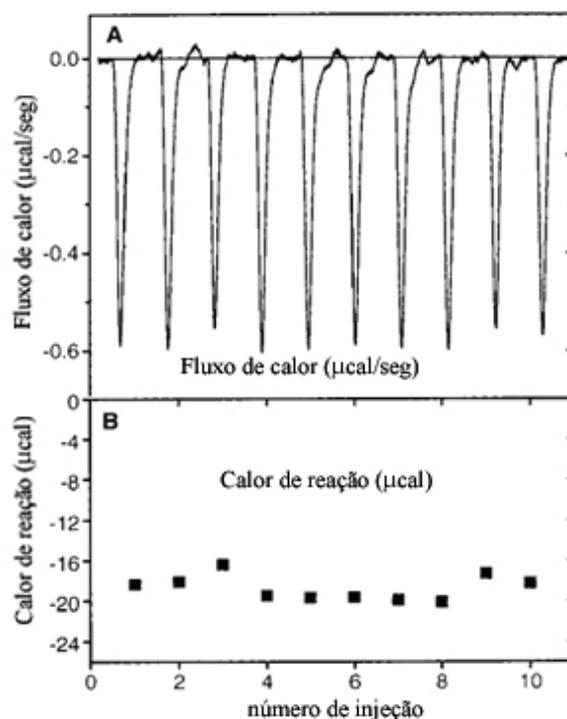


Figura 1.21 - Titulação calorimétrica de POPC SUVs (20 mmol.L⁻¹) com solução de M2a (200 μ mol.L⁻¹) a 15°C. (A) Traços calorimétricos de cada injeção. (B) Calores de reação obtidos da integração de cada traço calorimétrico. Figura retirada e adaptada de Wieprecht (1999).

O experimento inverso pode ser realizado para a obtenção de uma isoterma da interação peptídeo/lipídeo. Neste caso, peptídeo e lipídeo são dispostos inversamente no calorímetro, de forma que a célula de reação seja preenchida com uma solução do peptídeo (6-40 μM) enquanto que a suspensão do lipídeo fica contida na seringa de injeção do calorímetro (1-40 mM). Assim, após cada injeção de uma pequena alíquota de lipídeo, a concentração de peptídeo livre em solução diminui devido à interação deste com as vesículas. Assim sendo, um aumento do número de injeções reduz a quantidade de moléculas de peptídeo livres na solução e o calor de injeção também diminuirá. O resultado deste processo é uma isoterma de interação caracterizada por uma curva que apresenta diferentes valores de calor de injeção e que diminuem até um patamar, permanecendo então, constantes. A Figura 1.22 mostra o resultado da titulação de suspensão de POPC SUVs em $6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de um análogo da mangainina I⁶V⁹W¹²T¹⁵I¹⁷ M2a (Wieprecht *et al.*, 1999).

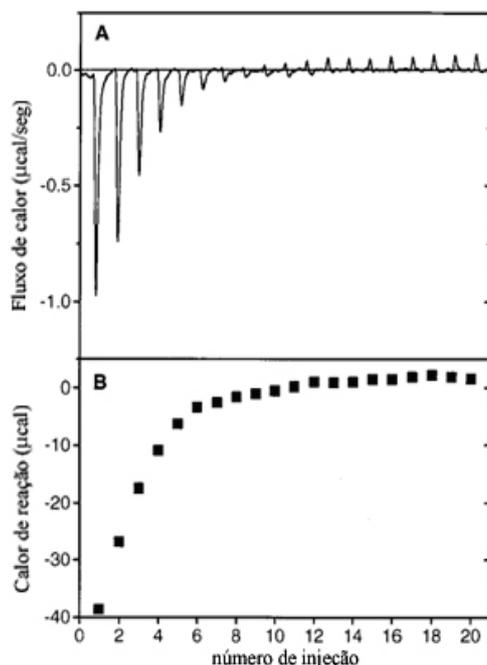


Figura 1.22 - Titulação calorimétrica de I⁶V⁹W¹²T¹⁵I¹⁷ M2a (6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) com POPC SUVs (38 mmol.L^{-1}) a 15 °C. (A) Traços calorimétricos e (B) Calor de reação em função do número de injeções. Figura retirada e adaptada de Wieprecht (1999).

O modelo matemático mais comum utilizado para descrever as isotermas de titulação calorimétricas é denominado de Isoterma de Wiseman (Wiseman *et al.*, 1989), Equação 1.6.

$$\overline{\Delta_{comp}H} = \left(\frac{dQ}{d[X]_{tot}} \right)_P = \Delta_{int}H^o V_o \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - X_R - r}{2\sqrt{(1 + X_R - r)^2 - 4X_R}} \right] \quad (1.6)$$

Esta equação descreve uma curva sigmóide (Figura 1.20, p. 27) e relaciona a entalpia molar parcial de complexação ($\Delta_{comp}H = dQ/d[X]$) à pressão constante, com a razão molar de titulante (X) e do titulado (M) ($X_R = [X]_t/[M]_t$) a qualquer ponto durante o curso da titulação (Rekharsky *et al.*, 2002). O parâmetro r é uma variável de composição ($r = 1/[M]_t K_{eq}$) e os parâmetros $\Delta_{int}H^0$, V_0 e K_{eq} são respectivamente a entalpia molar padrão de complexação, volume efetivo da solução na cela de titulação e constante de equilíbrio.

Na Figura 1.20 (p. 27) o ponto de inflexão da curva é numericamente igual ao coeficiente estequiométrico n do sistema.

Com o valor de K_{eq} obtido pelo ajuste dos pontos à Isoterma de Wiseman, é possível calcular a variação da energia-livre de Gibbs padrão do processo ΔG^0 por meio da Equação 1.7 (Atkins, 1998). Com o valor de $\Delta_{int}H^0$ obtido pelo tratamento descrito acima e pelo uso da Equação 1.8 (Atkins, 1998), calcula-se o termo entrópico.

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} \quad (1.7)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (1.8)$$

A calorimetria de titulação isotérmica tem se mostrado extremamente útil para fornecer parâmetros termodinâmicos no estudo de interações peptídeo-membrana. Um estudo termodinâmico completo de uma reação é descrito normalmente pela energia-livre de Gibbs ΔG^0 , entalpia ΔH^0 , entropia da reação ΔS^0 e pela variação da capacidade de calor ΔC_p . No estudo da interação ou reação entre dois sistemas distintos por ITC, cuja interação seja significativa a ponto de ser detectada pelo equipamento, todos os parâmetros termodinâmicos anteriormente descritos são obtidos e propiciam informações de forças diretoras da reação. Além disso, a calorimetria de titulação isotérmica tem sido empregada atualmente no estudo de processos secundários da interação peptídeo-membrana como: permeabilização de membrana por peptídeo, associação de peptídeos induzida por membranas, mudanças de fase de lipídeos, reação de protonação na superfície da membrana e trocas conformacionais de peptídeos (Deber *et al.*, 2002; Seelig, 2004).

1.8 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma das técnicas mais empregadas para determinação de tamanho de partículas. Atualmente, a DLS vem sendo empregada também no estudo do efeito de peptídeos sobre o tamanho de vesículas fosfolipídicas

(Mendoza-Espinosa *et al.*, 2007).

Através desta técnica, uma radiação monocromática, tal como um laser, incide sobre partículas dispersas que se encontram em movimento Browniano em um meio líquido. Neste ambiente, partículas com tamanhos diferentes movem-se também com velocidades diferentes, de forma que as partículas menores irão se mover com velocidade maior do que as partículas grandes, apresentando um coeficiente de difusão (D) maior. Dessa forma, o coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao tamanho das partículas. Para o caso de sistemas formados apenas por partículas esféricas, com viscosidade η definida e sob temperatura constante T , este coeficiente de difusão D é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas e pode ser descrito segundo a Equação de Stokes-Einstein (Equação 1.9):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta D_h} \quad (1.9)$$

Nesta técnica, a radiação espalhada pelas partículas apresenta o mesmo comprimento de onda da irradiação incidente (Tanford, 1961). Contudo, a luz espalhada sofre variações na intensidade com o passar do tempo devido a interferências construtivas e destrutivas. Analisando esta variação da intensidade de luz espalhada em um determinado intervalo de tempo, é possível verificar uma relação com o tamanho das partículas. Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, as quais se movimentam com velocidades maiores, a variação da intensidade de luz espalhada também é maior. Isto ocorre, pois esta velocidade maior das partículas permite que elas cruzem a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo (Figura 1.23).

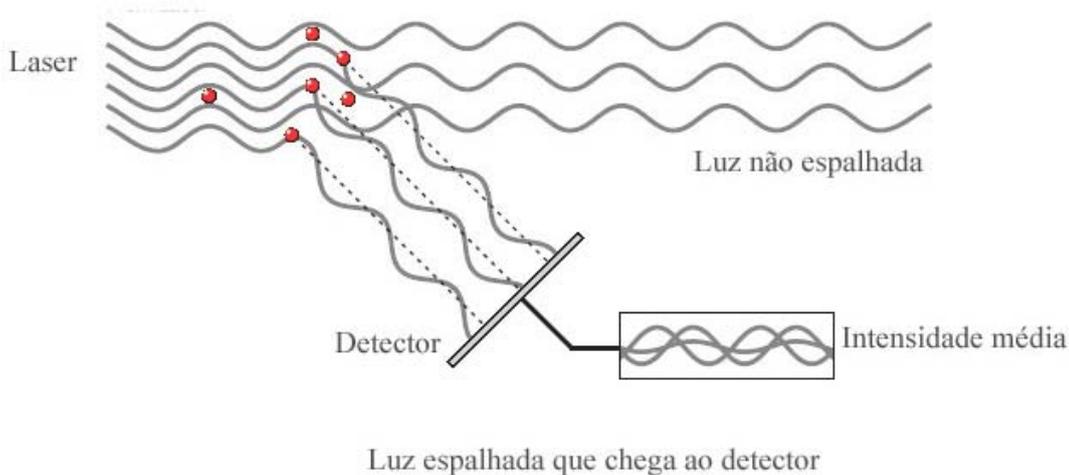


Figura 1.23 – Representação do processo de espalhamento de luz no equipamento de DLS. Figura adaptada de Zetasizer Nanoseries (2004).

Assim sendo, é possível descrever a variação da intensidade de espalhamento com o tempo através de uma função de auto-correlação temporal $G(t)$, como mostrada na Equação 1.10, onde $I(t_0)$ é a intensidade de luz incidente e $I(t_n)$ a intensidade de luz espalhada.

$$G(t) = \langle I(t_0).I(t_n) \rangle \quad (1.10)$$

Para uma dispersão de partículas pequenas, observa-se um decaimento mais rápido na função de auto-correlação $G(t)$ do que no caso de dispersões contendo partículas grandes (Pecora, 1985; Everett, 1988). Segundo a Equação 1.10, a intensidade de luz espalhada no instante t_0 é mínima e a função de auto-correlação entre as intensidades de luz tem o valor máximo. Entretanto, após um determinado tempo (t_n), as intensidades de luz espalhada $I(t_n)$ e de luz incidente $I(t_0)$ não possuem mais correlação alguma e, dessa forma, a função de auto-correlação $G(t)$ tende a zero. O decaimento de $G(t)$ com o tempo ocorre de forma exponencial como pode ser verificado na Figura 1.24.

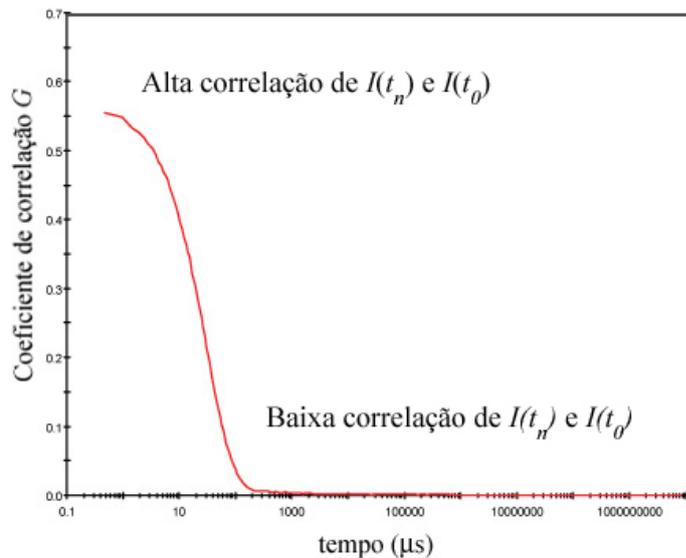


Figura 1.24 - Gráfico da variação do fator de correlação G em função do tempo. Representação do decaimento da função de auto-correlação $G(t)$.

Para o caso de soluções de partículas esféricas e monodispersas, $G(t)$ pode ser representada pela função exponencial a seguir (Equação 1.11):

$$G(t) = e^{-\Gamma t} \quad (1.11)$$

onde t é o tempo de análise e Γ é a razão de decaimento da curva exponencial obtida da função de auto-correlação. Esta razão de decaimento é diretamente proporcional ao coeficiente de difusão translacional D e pode ser dada por:

$$\Gamma = Dq^2 \quad (1.12)$$

onde q é o vetor de onda da luz espalhada, dado por:

$$q = (4\pi\eta / \lambda_0) \text{sen}(\theta / 2) \quad (1.13)$$

onde η é o índice de refração do meio, λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente e θ é o ângulo no qual o detector está localizado. Atualmente, muitos equipamentos utilizam-se de *softwares* que encontram uma curva de decaimento que melhor se ajusta aos pontos gerados pela função de auto-correlação, ou seja, encontram o melhor valor para Γ (Zetasizer, 2003). Uma vez obtido o valor de Γ , obtém-se os valores de D a partir das Equações 1.12 e 1.13 (p. 31) e, finalmente, o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (D_h) através da equação de Stokes-Einstein (Equação 1.9, p. 31).

1.9 Síntese de peptídeos

Para os estudos de determinação estrutural por RMN de moléculas biológicas (peptídeos e proteínas) e análogos (derivados com modificações pontuais) é necessário sintetizá-las, já que boa parte das suas fontes naturais apresenta baixa concentração destes compostos (Zaslouff, 2002), dificultando o isolamento em quantidades suficientes para análises. Métodos eficientes de síntese são empregados para obtenção de material em quantidades adequadas para tal estudo, ou seja, 10 a 100 mg. Dentre estes, destaca-se a síntese de peptídeos em fase sólida – SPFS - (Merrifield, 1963) utilizando um suporte polimérico. A seguir, serão abordadas as principais características da SPFS, que foi a técnica de síntese empregada neste trabalho.

1.9.1 Síntese orgânica de peptídeos em fase sólida

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi apresentada à sociedade científica por Merrifield (1963) e resultou em uma grande mudança nas perspectivas de síntese de peptídeos. O método é atualmente um dos mais utilizados para reproduzir e criar peptídeos e proteínas em laboratórios de uma maneira sintética. A SPFS permite a obtenção de peptídeos naturais pouco abundantes e que são difíceis de serem sintetizados em bactérias. Além disso, propicia a incorporação de aminoácidos não naturais e *D*-aminoácidos, modificações da cadeia principal e de suas extremidades amino e carboxi-terminais (Amblard *et al.*, 2006).

A SPFS é realizada usando um suporte sólido que consiste de pequenos grãos, porosos e insolúveis tanto em solução aquosa quanto em solventes orgânicos. Estes grãos são polímeros com grupamentos funcionais que propiciam a ligação com o

peptídeo, no qual podem ser construídas as cadeias peptídicas. O peptídeo permanece ligado covalentemente ao suporte polimérico durante toda a síntese e, finalmente, é clivado, usualmente por acidólise na presença de seqüestradores dos carbocátions gerados durante a desproteção de grupamentos funcionais das cadeias laterais.

A construção de cadeias peptídicas em suportes sólidos insolúveis tem grandes vantagens: separação de peptídeos intermediários de reagentes solúveis, retirada de solventes por filtração simples, lavagem em menor tempo e a capacidade de suportar condições mais agressivas do que as utilizadas na síntese em solução. Muitas destas operações tornam possível o emprego de excesso de reagente a fim de garantir rendimentos altos e minimizar perdas físicas do peptídeo, uma vez que este se encontra preso ao suporte sólido durante o processo (Chan e White, 2000). O princípio geral de SPFS está ilustrado na Figura 1.25 e consiste em ciclos repetidos de formação da ligação peptídica (acoplamentos) e desproteção.

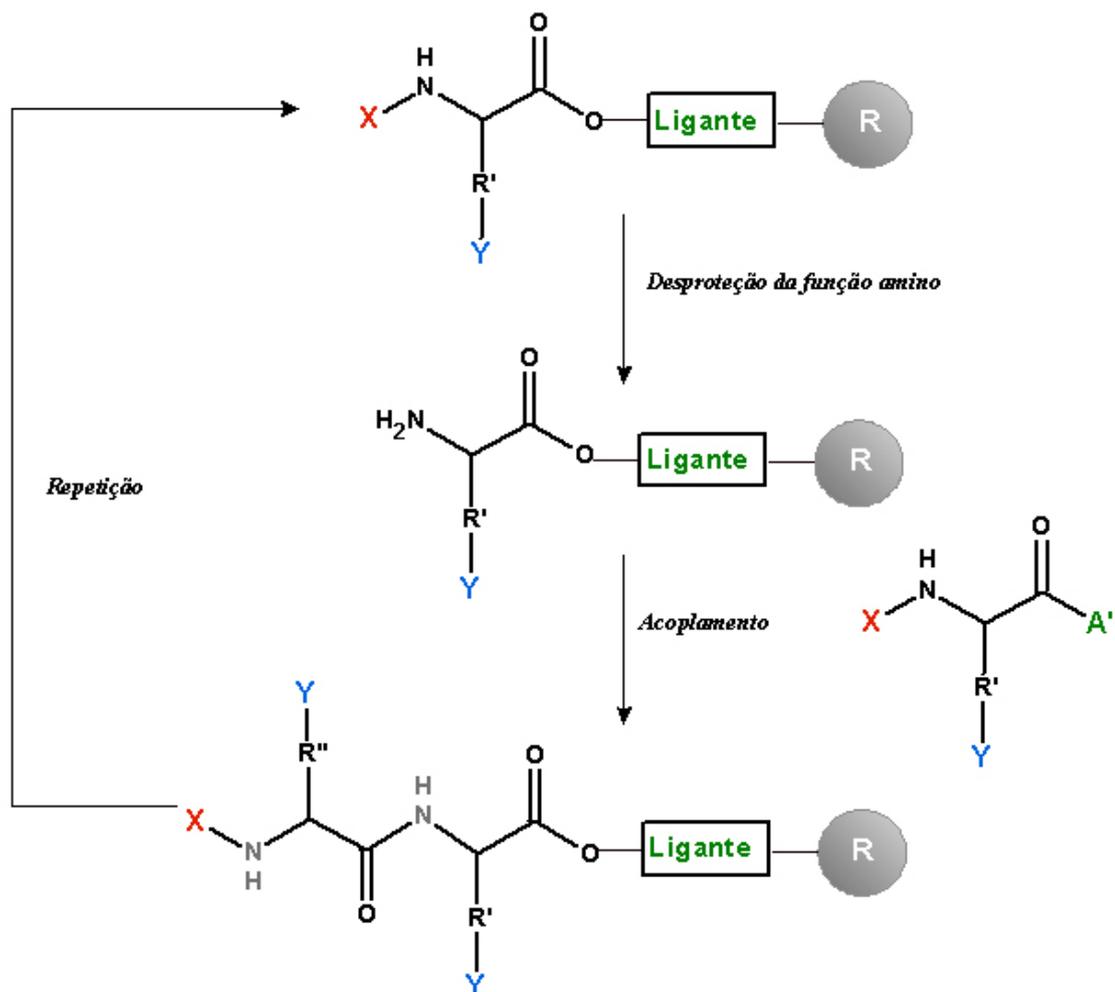


Figura 1.25 - O princípio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Em vermelho está representado o grupo *N*-protetor do derivado de aminoácido. Em azul o grupo protetor de cadeias laterais de derivados de aminoácidos. Figura modificada de Amblard (2006).

O peptídeo é fixado pelo seu grupo carboxi a um ligante da fase sólida (grupo amino terminal livre, halogênio ou hidroxila) por um derivado de aminoácido *N*-protegido. Este aminoácido é, então, desprotegido, gerando um novo grupo amino *N*-terminal ao qual será acoplado outro aminoácido. Todos os aminoácidos empregados nesta síntese possuem as cadeias laterais, quando reativas, também protegidas, garantindo sua integridade durante toda a síntese da cadeia peptídica. As etapas de acoplamento e desproteção do grupamento *N*-terminal são repetidas, alternadamente, até que o peptídeo seja obtido, obedecendo à sequência desejada. Na etapa final, o peptídeo é liberado de seu suporte sólido e os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos. Geralmente, a resina e os grupos protetores das cadeias laterais são escolhidos de forma que os grupos protetores sejam removidos sob mesmas condições (Chan e White, 2000).

A preocupação neste tipo de síntese linear é alcançar rendimentos extremamente altos em cada etapa de acoplamento. Por exemplo, se em cada etapa o rendimento for de 99%, um peptídeo de 26 resíduos seria sintetizado com 77% de rendimento final (considerando 100% de rendimento em cada desproteção). Entretanto, se em cada etapa o rendimento for de 95%, o mesmo peptídeo seria sintetizado com 25% rendimento. Assim, deve ser empregado um excesso de aminoácido em cada etapa de acoplamento para garantir o rendimento máximo e, também, escolher métodos muito eficientes de ativação da carboxila e de formação da ligação peptídica, assim como uma escolha apropriada de grupamentos protetores (Montalbetti e Falque, 2005; Isidro-Llobet *et al.*, 2009). Atualmente, há duas estratégias mais comumente empregadas para SPFS: a estratégia Boc e a Fmoc. Na estratégia Boc, ilustrada na Figura 1.26 (p. 36), o derivado de aminoácido Boc-L-Ser(Bn)-OH (grupo protetor Bn em azul) é ligado a um suporte polimérico pela formação de um éster benzílico com um copolímero funcionalizado de estireno e divinilbenzeno com grupo hidroximetilfenilacetamidometil poliestirenol (resina PAM representada em verde na Figura 1.26) (Kent, 1988). Outros ligantes ou tipos de funcionalização do copolímero podem ser empregados para modular a labilidade em meio ácido da ligação entre o peptídeo e a resina ou para produzir peptídeos com modificações no grupamento carbóxi-terminal (Amblard *et al.*, 2006). A próxima etapa da síntese é a remoção do grupo protetor da extremidade *N*-terminal seguida de neutralização do grupo amino. Nesta técnica, o grupo protetor *N*-terminal empregado é o *t*-butiloxicarbonila (grupamento Boc em vermelho) e sua remoção é feita em meio ácido, empregando-se normalmente solução de ácido trifluoracético (TFA) em diclorometano (DCM) ou em *N,N*-dimetilformamida (DMF).

As proteções permanentes dos grupamentos das cadeias laterais reativas (representados em azul na Figura 1.26) ocorrem mais comumente por derivados do grupo benzila. Anteriormente, a etapa de acoplamento era realizada com diciclohexilcarbodiimida (DCC) em DCM sem a pré-ativação do derivado de aminoácido de entrada, mas atualmente é comum o uso de anidridos simétricos pré-formados, ésteres ativos (e.g. ativação com 1-hidroxibenzotriazol ou reagentes derivados deste) em DMF ou em *N*-metilpirrolidona (NMP) em DMF (Stewart, 1976). A liberação do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais são conduzidas também em meio ácido, porém em condições mais agressivas como, por exemplo, fluoreto de hidrogênio anidro.

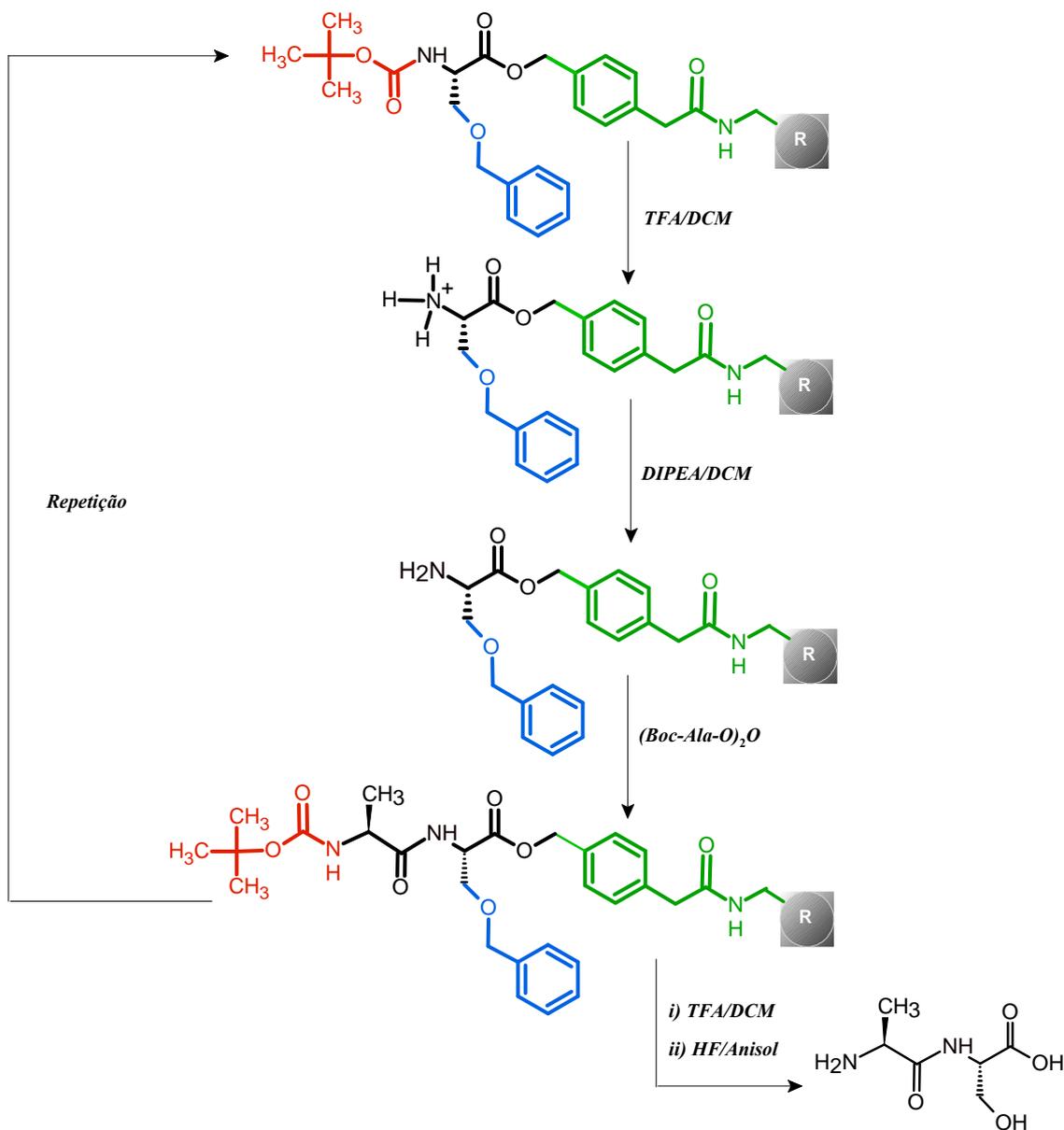


Figura 1.26 - Síntese de peptídeos em fase sólida – Metodologia de Merrifield (Merrifield, 1963).

A outra metodologia de síntese em fase sólida que, inclusive, foi empregada neste trabalho, envolve o uso de 9-fluorenil-metiloxycarbonila (Fmoc) como protetor do grupo amino. A Figura 1.27 ilustra este método, o qual se inicia com a ligação do derivado de aminoácido Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH (grupo protetor *t*-Bu em azul) ao suporte sólido. A próxima etapa da síntese envolve a desproteção do grupo Fmoc, indicado em vermelho na Figura 1.27.

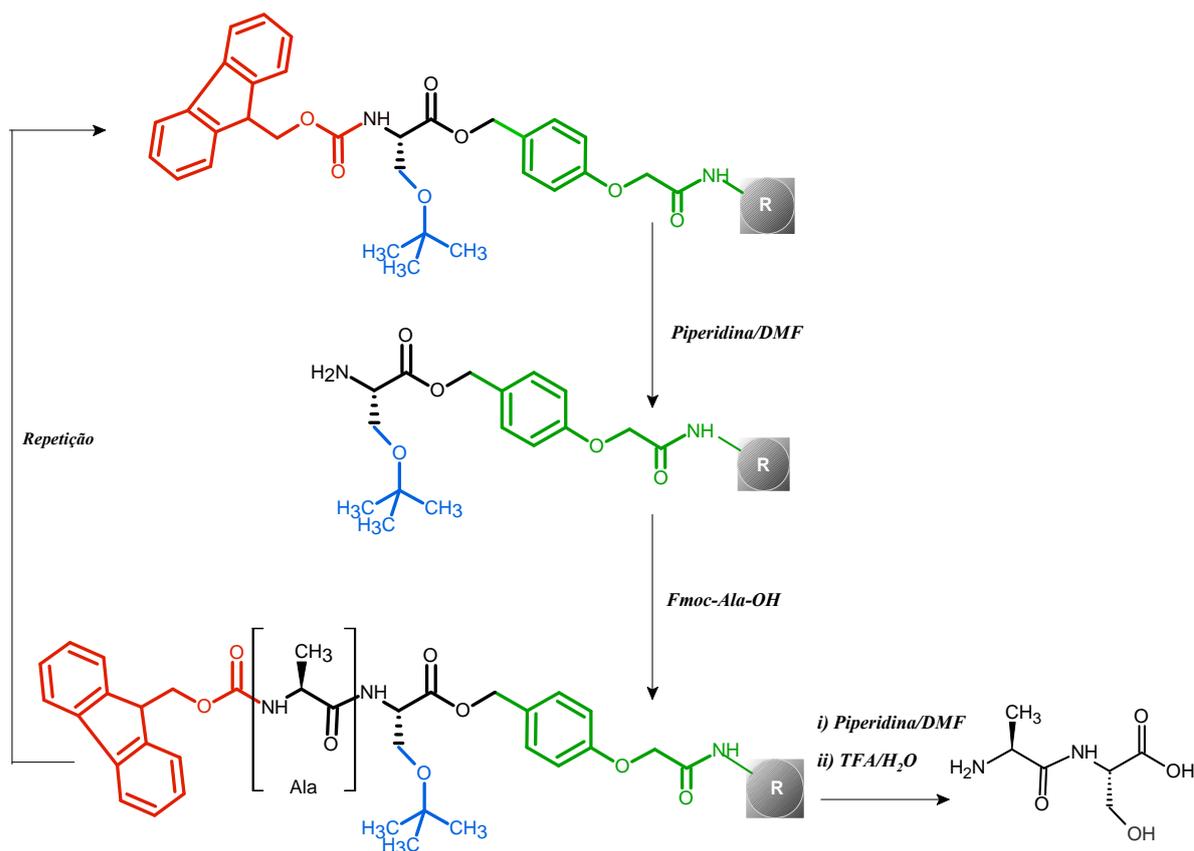


Figura 1.27 - Síntese de peptídeos em fase sólida – Estratégia Fmoc. Figura modificada de Amblard (2006).

A simples troca do grupo protetor *N*-terminal de Boc para Fmoc proporciona consideráveis vantagens à síntese em fase sólida. Ao contrário do método de Merrifield, o qual utiliza um regime de acidólise graduado para conseguir a seletividade na remoção da proteção temporária e permanente, o uso do grupo Fmoc estipula uma estratégia de remoção de grupos protetores em meios completamente diferentes (Carpino e Han, 1972). Enquanto o grupo Fmoc é removido facilmente em meio básico, todos os demais grupos protetores (representados em azul na Figura 1.27) são removidos em meio ácido. Dessa forma, a remoção dos grupos protetores temporários e permanentes ocorre por mecanismos químicos completamente diferentes. Grupos

protetores das cadeias laterais e as resinas podem ser empregados de forma que as condições de remoção sejam mais moderadas do que as utilizadas no método original de Merrifield, pois nenhuma etapa de acidólise é necessária durante a síntese do peptídeo. Na prática, são usados normalmente grupos *t*-butila e tritila para proteção das cadeias laterais e alcóxibenzila para fixação do peptídeo à resina, pois todos estes grupos podem ser removidos com o emprego de TFA. Este último reagente é também um excelente solvente para peptídeos, sendo o mais utilizado. Além disso, pode ser removido por evaporação simples, o que é conveniente para a reação de clivagem.

A facilidade com a qual o método pode ser adaptado para a síntese de muitos peptídeos é, indubitavelmente, a razão para o largo uso do método Fmoc/*t*-butila (Figura 1.27, p. 37). Outra vantagem é que a estratégia Fmoc não exige uma instrumentação especial para a etapa de clivagem e desproteção das cadeias laterais como ocorre na estratégia Boc, na qual se utiliza o fluoreto de hidrogênio.

Sintetizadores automatizados estão disponíveis para ambas as técnicas, entretanto muitos grupos de pesquisa continuam executando SPFS manualmente. A limitação da SPFS surge quando se propõem sínteses de peptídeos e proteínas com números de resíduos de aminoácidos superiores a sessenta ou quando se depara com uma sequência de síntese difícil, usualmente por apresentar tendências agregantes. Nestes casos, são necessárias sínteses convergentes (Chan e White, 2000).

1.9.2 Peptídeos diméricos - Formação de ligação de dissulfeto

Muitas proteínas e peptídeos, tais como enzimas, fatores de crescimento, hormônios ou toxinas, exercem sua função fora das células das quais foram segregados. Em ambientes extracelulares frequentemente agressivos, há vários mecanismos que impedem a desnaturação e a hidrólise de peptídeos e proteínas por ação de peptidases. Dentre esses mecanismos sobressaem-se a formação de ligação de dissulfeto e a glicosilação, que servem como proteções da molécula frente a peptidases e agentes desnaturantes. Ligações dissulfeto introduzem restrições conformacionais na cadeia polipeptídica, melhorando sua estabilidade termodinâmica (Bulaj, 2005). Uma maior estabilidade pode ser traduzida na prática como uma maior resistência às condições ambientais extremas como temperaturas altas, valores extremos de pH, concentrações altas de solventes orgânicos ou, ainda, pelo aumento do tempo de vida de proteínas (Annis *et al.*, 1997).

As ligações de dissulfeto estabilizam as dobras da conformação e desestabilizam a conformação desnaturada de proteínas, diminuindo a entropia conformacional da

macromolécula. Apesar de existirem muitos estudos sobre formação de ligações de dissulfeto em proteínas (e.g. lisozima de T4, RNases, redutase de di-hidrofolato), o mecanismo pelo qual dissulfetos afetam estabilidade ainda não é bem entendido (Wedemeyer *et al.*, 2000).

O mecanismo de formação de uma ligação de dissulfeto em proteínas envolve uma série de trocas tiol/dissulfeto devido a reações entre tiolatos de cisteína e um dissulfeto oxidante. A química de formação da ligação de dissulfeto é idêntica tanto para peptídeos pequenos quanto para proteínas maiores. A oxidação do tiolato de cisteína da proteína (tiol desprotonado) pode ser mediada por enzimas, como a proteína isomerase dissulfeto (PDI), ou por reagentes oxidantes de massa molar baixa, como cistina, cistamina, glutathione oxidada ou ditioneitol, ácido ditioneitol(2-nitrobenzóico). Outros reagentes receptores de elétrons como o oxigênio, iodo, dimetilsulfóxido (DMSO), diamidas e ferricianeto de potássio podem ser usados também (Tam *et al.*, 1991). Considerando-se a possibilidade de ocorrência de reações secundárias para resíduos susceptíveis à oxidação como o triptofano e a metionina, em polipeptídeos menores, frequentemente são empregadas apenas soluções tampão oxigenadas para promover a oxidação das cisteínas (Chan e White, 2000).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Síntese dos peptídeos DD K, LyeTx I e HMT-1

Os peptídeos DD K, LyeTx-I e HMT-1 foram sintetizados manualmente, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida, via estratégia Fmoc (Chan e White, 2000). As resinas TentaGel-SRAM (Iris Biotech, Marktredwitz, Alemanha) e Rink-Amide (Iris Biotech, Marktredwitz, Alemanha) (Figura 2.1) com graus de substituição $0,27 \text{ mmol g}^{-1}$ e $0,63 \text{ mmol g}^{-1}$ respectivamente, e que fornecem o peptídeo amidado como produto final, foram empregadas como suporte sólido.

Os derivados de aminoácidos utilizados foram: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(*Ot*-Bu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gln(*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(*Ot*-Bu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(*t*-Bu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH e Fmoc-Val-OH. Todos os derivados de aminoácidos foram obtidos da Iris Biotech (Marktredwitz, Alemanha).

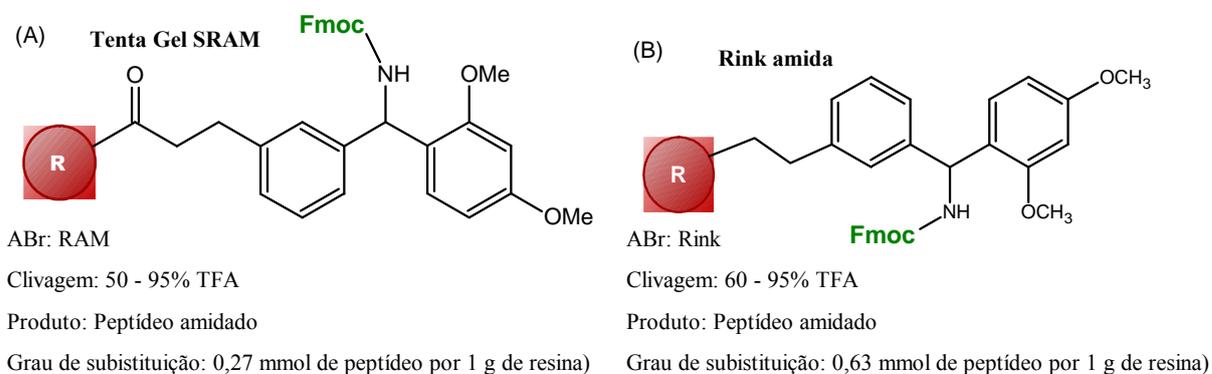


Figura 2.1 - Suporte sólido utilizado para a síntese de peptídeos.

As pesagens foram feitas em balança analítica Metler AE 166, com precisão de 0,0001 g.

As lavagens da resina após as etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas sequencialmente com *N,N*-dimetilformamida (DMF) e álcool isopropílico (IPA), seguidas por uma lavagem final com diclorometano (DCM).

DMF – *N,N*-dimetilformamida foi obtida pura por destilação a pressão reduzida ($100 \text{ }^\circ\text{C}$), seguida por outra destilação fracionada ($110 \text{ }^\circ\text{C}$).

DCM – O diclorometano foi previamente lavado com água e solução aquosa de

carbonato de sódio 1 mol.L⁻¹. Em seguida foi secado com CaCl₂ e submetido à destilação fracionada.

Durante as etapas de acoplamento foram empregados como agentes ativadores do grupo carboxila a N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazola (HOBT), sendo utilizados DMF e DCM como solventes.

Para as etapas de remoção do grupo Fmoc foram empregadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (20% v/v).

Para acompanhamento da eficiência de cada etapa de acoplamento das sínteses foi utilizado o teste de Kaiser (teste químico qualitativo para confirmação de grupo amino livre, também conhecido como testes de ninhidrina (Figura 2.2), o qual emprega soluções de piridina a 2 % (v/v) em solução aquosa de KCN a 1 mmol L⁻¹, fenol a 80 % (m/v) em etanol e ninhidrina a 5 % (m/v) em piridina, nas proporções 1:2:1 (v:v:v) e nesta ordem, respectivamente (Troll e Cannan, 1953).

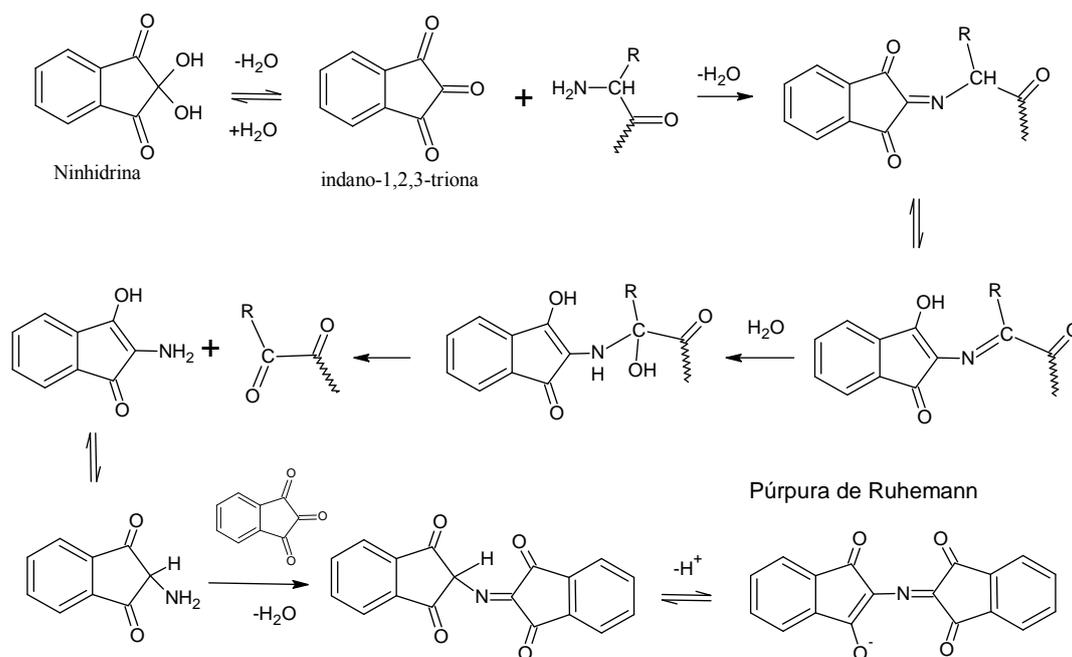


Figura 2.2 - Reação de ninhidrina para detecção de amina primária (Teste de Kaiser) (Troll e Cannan, 1953).

2.1.1 Preparação da resina para a SPFS

Antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido na síntese de cada peptídeo, a resina foi previamente preparada segundo o protocolo apresentado no Quadro 2.1 (p. 42). Foram pesadas quantidades suficientes para a obtenção de 250 mg de cada peptídeo.

- 1 – Colocar a resina seca em um frasco para síntese de peptídeo.
- 2 – Adicionar uma quantidade suficiente de DCM (\cong 5 mL) para cobrir a resina no frasco.
- 3 – Expor a resina ao DCM por pelo menos 10 min.
- 4 – Remover o DCM por filtração.
- 5 – Repetir o processo por três vezes.

Quadro 2.1 – Protocolo para preparação da resina suporte da SPFS.

As resinas tentagel SRAM e Rink-amide, assim como os derivados de aminoácidos, foram todos protegidos com o grupo Fmoc, o qual foi removido por tratamento com solução de PIPE em DMF 20% v/v, conforme apresentado no Quadro 2.2.

- 1 – Adicionar ao frasco de reação aproximadamente 2,5 mL de solução 25% (v/v) de PIPE em DMF.
- 2 – Submeter em seguida o sistema à agitação por 5 min.
- 3 – Remover a solução de PIPE do frasco de reação, por filtração.
- 4 – Repetir as etapas 1, 2 e 3 duas vezes, com tempo de agitação de 10 min.
- 5 – Fazer o acompanhamento da desproteção com o teste de Kaiser.

Quadro 2.2 – Protocolo para remoção do grupo Fmoc.

A resina desprotegida foi então lavada para a remoção de toda a 4-metil-piperidina do frasco de reação conforme o protocolo apresentado no Quadro 2.3.

- 1 – Preencher o recipiente com DMF e, após, 10 s removê-lo por filtração
- 2 – Repetir a etapa 1, porém com IPA.
- 3 – Repetir as etapas 1 e 2 mais duas vezes.
- 4 – Encerrar o processo com uma última lavagem com DCM.

Quadro 2.3 - Protocolo para lavagem da resina após a etapa de desproteção.

2.1.2 Etapa de Acoplamento

A etapa de acoplamento consiste na formação de uma ligação amídica e consequente introdução de um novo resíduo de aminoácido ao peptídeo. Para isto, empregou-se a formação de ésteres ativos a partir dos derivados de aminoácidos. Os

acoplamentos foram então conduzidos com DIC e HOBt com tempos de reação variando entre 1,5 e 3 h, utilizando-se DMF ou uma mistura de DMF e DCM (1:1, v:v) como solvente (Quadro 2.4).

3 eq Fmoc-Aminoácido
3 eq HOBt
3 eq DIC
Solvente – 5 mL DMF ou DMF/DCM (1:1)

Quadro 2.4 – Condições para acoplamento de aminoácido em SPFS.

Ao final desta etapa, a solução contendo os ativadores foi removida por filtração. Em seguida, repetiu-se o procedimento descrito no Quadro 2.3 (p. 42) para lavagem da resina e realizou-se o teste de *Kaiser* para acompanhamento da reação.

2.1.3 Etapa de Desproteção

Após a adição de um novo derivado de aminoácido na sequência peptídica, o peptídeo encontra-se novamente protegido no grupamento *N*-terminal. Para a remoção do grupo Fmoc repetiu-se o procedimento descrito no Quadro 2.2 (p. 42).

2.1.4 Reação de clivagem do peptídeo da resina

As reações de clivagem seguiram o protocolo apresentado no Quadro 2.5 com o emprego do ácido trifluoracético (TFA) para a remoção simultânea da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais.

- 1 – Transferir a resina seca para um tubo de polipropileno de 50 mL onde é adicionada a solução de TFA apropriada (10 – 25 mL/g de resina). Em seguida submeter a mistura à agitação mecânica vigorosa.
- 2 – Remover a resina por filtração e lavar com TFA.
- 3 – Remover o TFA do filtrado, por aplicação de nitrogênio gasoso e, então, adicionar cerca de 3 mL de éter diisopropílico previamente resfriado em nitrogênio líquido, para precipitar o peptídeo.
- 4 – Remover o éter rapidamente após centrifugação.
- 5 – Repetir o processo mais quatro vezes.
- 6 – Liofilizar o peptídeo ao final.

Quadro 2.5 - Protocolo para reação de clivagem do peptídeo da resina.

No entanto, a solução de clivagem e o tempo de reação dependem, além da resina, da sequência peptídica, uma vez que grupos protetores diferentes de cadeias laterais requerem tempos distintos de reação para sua remoção completa e a adição de nucleófilos para a neutralização dos carbocátions gerados. Assim sendo, as soluções de clivagem para cada peptídeo foram estabelecidas previamente, segundo a sequência primária de cada peptídeo (Chan e White, 2000), e estão apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Condições de clivagens para cada síntese

Peptídeo	Tempo de Reação(h)	Mistura de Clivagem (em volume)
DD K	2	95% TFA, 2,5% água, 2,5% TIS
HMT-1	3	95% TFA, 2% água, 2% EDT, 1% TIS
LyeTx-I	2,5	95% TFA, 2,5% água, 2,5% TIS

2.2 Síntese do peptídeo HMT-2 – Reação de dimerização via formação de ligação dissulfeto

A síntese do peptídeo dimérico HMT-2 foi realizada através da formação de ligação de dissulfeto entre duas cadeias lineares de HMT-1. Esta reação de dimerização foi realizada em dois meios distintos. Primeiramente, em solução tampão de Tris-HCl a 300 mmol.L⁻¹ ajustando-se o pH para 8,5 com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol.L⁻¹. Segundo, em solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 400 mmol.L⁻¹ com pH ajustado para 8,5. Em ambos os meios de síntese foram empregados uma concentração de 1 mmol.L⁻¹ do peptídeo HMT-1 purificado. Durante as reações foram realizados acompanhamento da formação do dímero conforme descrito a seguir.

2.3 Acompanhamento da reação de obtenção de HMT-2

O acompanhamento da reação de dimerização foi conduzido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando gradientes de dois eluentes diferentes: água deionizada (tipo I) acidulada com ácido trifluoracético (0,1% em volume TFA, fase A) e acetonitrila grau UV/HPLC em TFA (ACN/0,08% TFA, fase B). A detecção foi realizada na região do ultravioleta (UV) no comprimento de onda referente à absorção do grupo amido (λ 210-215 nm). Para o acompanhamento da reação foi empregada a escala analítica (1 mg.mL⁻¹ de peptídeo e fluxo de 1 mL.min⁻¹). As alíquotas para injeção no cromatógrafo (25 μ L) foram retiradas diretamente das reações, em diferentes intervalos de tempos.

2.4 Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi empregada também para purificação do peptídeo. Foram utilizados gradientes de dois eluentes: um deles foi água deionizada acidulada com ácido trifluoroacético (0,1% TFA, fase A) e o outro foi acetonitrila grau UV/HPLC em TFA (ACN/0,08% TFA, fase B). Para a detecção empregou-se detector de ultravioleta (UV), sendo utilizado $\lambda_{\text{máx}}$ de 214 nm (210-215 nm faixa de absorção do grupo amido). A purificação foi conduzida em escala semipreparativa (5 mg de amostra bruta e fluxo de 3 mL.min⁻¹). A escala analítica (até 1 mg de peptídeo bruto e fluxo de 1 mL.min⁻¹) foi usada para a definição das condições da escala semipreparativa e análise subsequente das frações obtidas durante a purificação. Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente.

Na CLAE foi empregado cromatógrafo Varian modelo Pro Star 210 com detector na região do ultravioleta modelo Pro Star 330, válvula de injeção marca Rheodyne, do Departamento de Química do ICEx da UFMG. Foram utilizadas as seguintes colunas: analítica Vydac C18 (250 x 4,6 mm), semi-preparativa Vydac C18 (250 x 10 mm, 5 μ m) e loops de 5 μ L, 250 μ L, respectivamente. A água deionizada foi obtida em aparelho da marca Millipore modelo QPAK[®], do Departamento de Química do ICEx da UFMG.

2.5 Secagem das amostras

As frações obtidas da purificação de cada peptídeo foram coletadas em tubos de polipropileno de 15 ou 50 mL e liofilizadas em aparelho LABCONCO, modelo 8910 e bomba de marca WELCH modelo Directorr 8915, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

2.6 Análise por espectrometria de massas

Os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas com ionização *electrospray* (ESI) e ou *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) em espectrômetros de massas ESI-Q-ToF Micromass Micro[™] (Micromass, Manchester, UK) e MALDI-ToF/ToFMS (Applied Biosystems, USA) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG, operando em modo positivo. Nas análises por ESI-Q-ToF as amostras foram diluídas em uma mistura de água (Milli-Q[®] water) e solução aquosa de acetonitrila (50% v/v), contendo 0,1% TFA e transferidas para uma seringa para serem injetadas no equipamento a um fluxo de 2 μ L.min⁻¹. Os dados foram

analisados pelo programa MassLynx® 4.0. Nas análises por MALDI-ToF/ToFMS as amostras diluídas em uma solução de ácido acético (0.1% v/v) foram aplicadas juntamente com uma solução saturada de matriz do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em uma placa de MALDI onde foram secadas a temperatura ambiente.

2.7 Padronização das soluções estoque de peptídeo

Após a constatação da pureza, cada solução contendo peptídeo foi padronizada por diferentes métodos, para a obtenção de dados experimentais.

Para DD K e LyeTx-I, os quais possuem resíduos de triptofano nas respectivas sequências, foi empregado o método de Edelhoch (1967) para determinação teórica da absorvidade molar (ϵ) em λ 280 nm (Equação 2.1). Para maior exatidão dos valores de concentração, as absorvâncias foram medidas também a λ 205, 215 e 225 nm, segundo método proposto por Murphy e Kies (1960). Assim, tem-se:

- Método de Edelhoch para determinação da ϵ de peptídeos e proteínas, Equação 2.1:

$$\epsilon (\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}) = (\text{n}^\circ \text{ de Trp}).(5500) + (\text{n}^\circ \text{ de Tyr}).(1490) + (\text{n}^\circ \text{ de Cys}).(125) \quad (2.1)$$

O valor de ϵ é aplicado na lei de *Lambert-Beer* para determinação da concentração da amostra (Equação 2.2).

$$\text{Lei de Lambert-Beer} \quad A = \epsilon.b.c \quad (2.2)$$

onde A é a absorvância da solução de peptídeo em λ 280 nm, ϵ é a absorvidade molar calculada pelo método de Edelhoch ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), b é o caminho ótico (1 cm) e c a concentração (mol.L^{-1}).

- Método de Murphy e Kie, envolvendo as Equações 2.3 a 2.5:

$$(A_{215} - A_{225}).144 = k \quad (2.3)$$

$$(A_{205}).31 = T \quad (2.4)$$

$$(k + T)/2 = C \quad (2.5)$$

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

Os peptídeos HMT-1 e HMT2 foram submetidos à hidrólise ácida com solução aquosa de HCl 6 mol.L⁻¹, em presença de fenol cristalizado e sob atmosfera de N₂, a 110 °C por 24 h em uma estação de trabalho Pico Tag da Waters. A composição molar dos aminoácidos presentes no peptídeo foi determinada com base nas concentrações dos aminoácidos determinadas em um analisador automático Dionex composto por um amostrador automático (AS40), uma bomba quaternária (GS50), um forno de coluna (LC25), uma coluna de troca iônica (AminoPac PA10), um detector eletroquímico (ED50) e uma plataforma “Chromleon” para controle e aquisição de dados. Neste analisador, os aminoácidos são separados em uma coluna de troca iônica e detectados diretamente (ausência de derivatização) por amperometria. A quantidade de cada aminoácido foi calculada baseando-se em três análises de uma solução padrão contendo 11,75 μmol.L⁻¹ de cada aminoácido.

2.8 Obtenção de lipossomas

Os lipossomas “fluidos” foram preparados a partir de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) em solução tampão de Tris-HCl a 300 mmol.L⁻¹ (pH 8) ou solução tampão de fosfato a 100 mmol.L⁻¹ (pH 7,5) para uma concentração final de lipídeos de 50 mmol.L⁻¹. Lipossomas do tipo DRV “*Dehydration Rehydration Vesicles*”, de tamanho grande (diâmetro médio de 2,0 μm) foram preparados de acordo com metodologia proposta por Kirby e Gregoriads (1984). A apresentação esquemática de todo o processo de preparação dos lipossomas está na Figura 2.3 (p. 48). Em uma primeira etapa, um filme lipídico foi preparado por meio da solubilização dos lipídeos em clorofórmio e evaporação do solvente orgânico a 60 °C, com auxílio de um evaporador rotatório (Labconco, USA).

Os lipossomas contendo concentrações diferentes de colesterol foram preparados adicionando-se diferentes quantidades de colesterol durante a solubilização do fosfolipídeo em clorofórmio. O filme lipídico (bicamada lipídica) foi então hidratado com solução tampão de Tris-HCl (pH 8) ou solução tampão de fosfato (pH 7,5) em banho-maria a 40 °C, para a formação de vesículas multilamelares (MLVs) a partir das quais foram obtidas pequenas vesículas unilamelares grandes (LUVs), por ultrassonicação de MLVs com auxílio de um sonicador do tipo sonda (Misonix, USA). O sistema ainda foi submetido a choque térmico (congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 50 °C) por oito vezes para aumentar sua

homogeneização.

Vesículas unilamelares pequenas (SUV) e de diâmetro definido foram obtidos por extrusão da suspensão de lipossoma do tipo DRV usando um extrusor (Lipex Biomembranes, Canadá). A extrusão foi realizada a temperatura ambiente em duas etapas (com dez filtrações em cada etapa) com o auxílio de membranas de policarbonato. Na primeira etapa foram empregadas membranas de poros com diâmetros de 100 nm e pressão 350 psi e, na segunda etapa, membranas de poros com diâmetros de 200 nm e pressão de 500 psi.

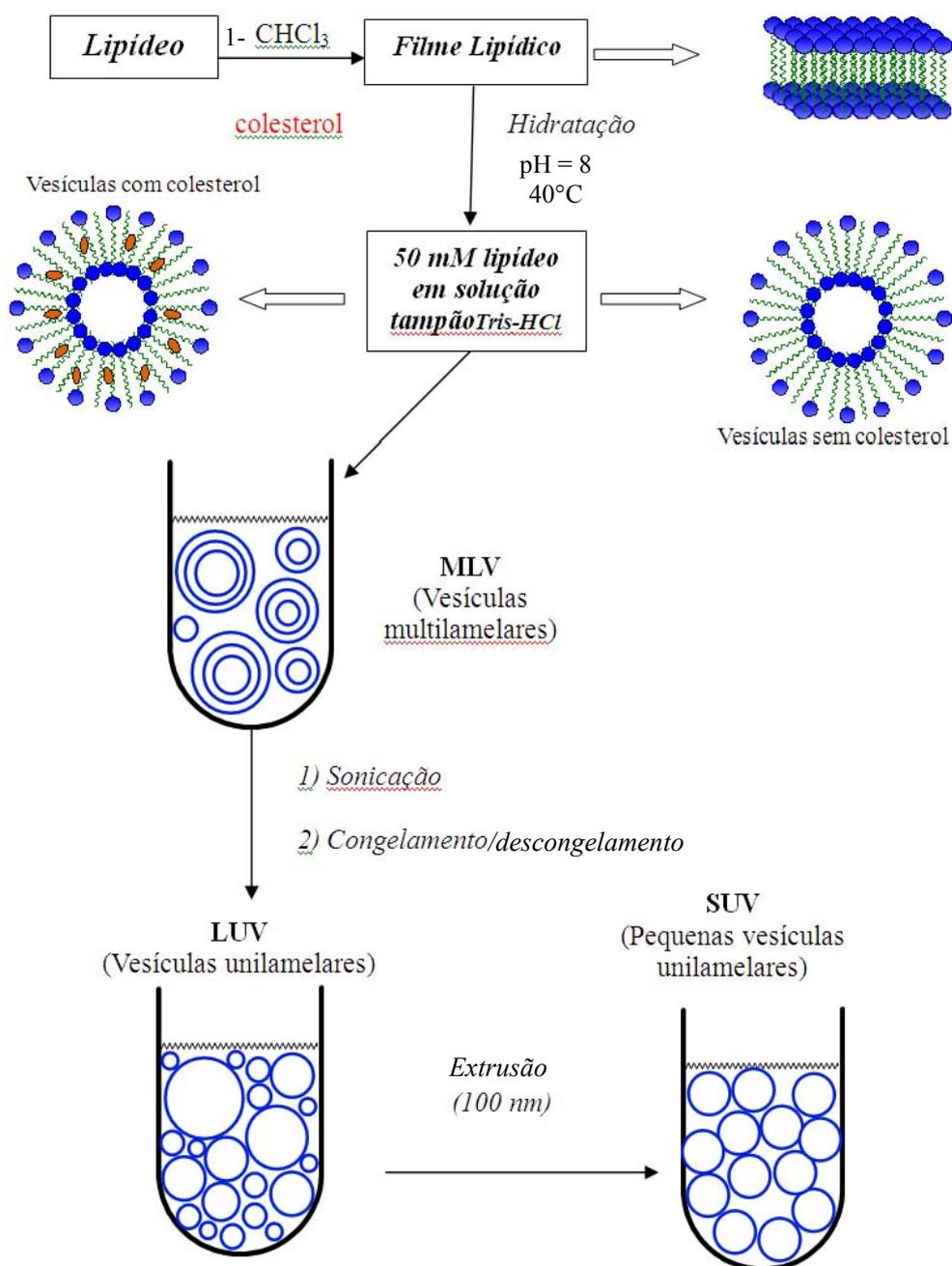


Figura 2.3- Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas.

A distribuição do tamanho das partículas foi analisada por espalhamento dinâmico da luz, usando-se um analisador de tamanho de partículas Zetasizer nano ZS da Malvern modelo BI-900, Brookhaven do Departamento de Química da UFMG.

O teor de fosfolipídeos nas preparações de lipossomas foi determinado por método colorimétrico proposto por Stewart (1980). Este método baseia-se na habilidade dos fosfolipídeos formarem um complexo com ferrotiocianato de amônio em solução orgânica, o qual absorve luz visível em $\lambda_{\text{máx}}$ de 488 nm.

Uma curva padrão (488 nm) em função de diferentes concentrações de fosfatidilcolina (lipídeo base) foi preparada utilizando-se solução padrão deste fosfolipídeo em clorofórmio na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU 160A). A concentração de fosfolipídeos presentes na amostra foi determinada em triplicata, utilizando-se a curva padrão preparada.

2.9 Encapsulamento de carboxifluoresceína em vesículas unilamelares

Primeiramente foram preparadas bicamadas lipídicas de POPC na presença e na ausência de colesterol, solubilizando-se os fosfolipídeos e o colesterol, quando necessário, em DCM. Esta solução foi transferida para um tubo de ensaio e o solvente evaporado com fluxo de nitrogênio gasoso, o que forneceu um filme lipídico. Este foi submetido ao vácuo por 1 h para a remoção completa do solvente e, em seguida, foi hidratado com solução tampão de Tris-HCl a 10 mmol.L^{-1} , pH 8.0 e 50 mmol.L^{-1} de carboxifluoresceína (CF). As vesículas multilamelares foram submetidas a processos de congelamento e descongelamento, em nitrogênio líquido e banho aquecido respectivamente, por oito vezes para a obtenção de LUVs. As LUVs de tamanho definido de 100 nm foram obtidas através de extrusão (repetida 11 vezes) da suspensão de LUVs em membranas de policarbonato de 100 nm em um sistema de extrusão LiposoFast (Avestin Inc., Ottawa, Canada) (Figura 2.3, p. 48). A remoção da CF livre presente na suspensão de LUVs foi realizada passando-se 1 mL da suspensão em uma coluna Sephadex-G25 (1,2 cm x 20 cm) com solução tampão de 10 mmol^{-1} de Tris-HCl contendo 300 mmol^{-1} de NaCl em pH 8,0.

2.10 Medidas de extravasamento das LUVs-CF

Alíquotas de LUVs (5 mL) foram adicionadas à cubeta de fluorescência contendo 3 mL do mesmo tampão empregado na coluna Sephadex-G25. O aumento da fluorescência de CF em função do tempo a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi medido continuamente em

espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-2000. Ao final de cada experimento, a fluorescência total de CF foi determinada pela adição de 10% (m/v) de Triton X-100. A porcentagem de vazamento de CF foi determinada utilizando-se a Equação 2.6, como descrita na literatura (Alvarez *et al.*, 2003).

$$\text{Vazamento (\%)} = \frac{I_{(t)} - I_0}{I_T - I_0} \cdot 100 \quad (2.6)$$

onde $I_{(t)}$ é a intensidade de fluorescência no tempo (t), I_0 é a intensidade de fluorescência antes da adição de peptídeo e I_T é a intensidade de fluorescência após a adição de Triton X-100. A velocidade de liberação de CF, k_{obs} , foi calculada empregando-se ajuste exponencial dos dados de intensidade de fluorescência em função do tempo.

2.11 Microcalorimetria

As titulações calorimétricas foram realizadas em duplicata utilizando um microcalorímetro VP-ITC da Microcal, a 298,15 K do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG. O instrumento de ITC foi previamente calibrado eletricamente (*software* do equipamento). Antes de uso, as soluções foram desgaseificadas aplicando-se simultaneamente ultrassom e vácuo (140 mbar, 8 min) para eliminar bolhas de ar (Rekharsky *et al.*, 2002).

Os experimentos foram registrados pela titulação de peptídeo em LUVs de 100 nm de POPC, POPC/POPG (3:1 mol:mol), POPC-Colesterol. Cada experimento de titulação consistiu em 51 injeções sucessivas de titulante (LUVs) na cela de reação carregada com 1,488 mL de solução do peptídeo, em intervalos de tempo de 240 s. A primeira injeção de 1 μL foi descartada para eliminar efeitos de difusão de material da seringa para a cela calorimétrica. Em seguida, foi injetado um volume constante de 5 μL e o tempo de injeção foi de 2 s. Experimentos de diluição de LUVs foram realizados por injeções de LUVs em solução tampão de Tris-HCl ou em solução tampão fosfato. Os dados de cada experimento foram analisados através do *software* do próprio calorímetro (Microcal Origin 5.0 para ITC), após a subtração do respectivo experimento de diluição.

2.12 Espalhamento de luz dinâmico

O efeito do peptídeo nos valores de diâmetro hidrodinâmico de LUVs de POPC e POPC/POPG (3:1 mol:mol) e POPC-Colesterol foi avaliado por espalhamento de luz dinâmico, com um analisador de partículas Zetasizer nano ZS da Malvern no Departamento de Química da UFMG, usando células descartáveis de polietileno. Os experimentos foram realizados pela titulação dos peptídeos 1 mmol.L^{-1} com as LUVs citadas acima também na concentração de 1 mmol.L^{-1} e à temperatura ambiente. Para cada experimento foram realizadas sucessivas injeções de $5 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de peptídeo em uma cubeta de 1 mL contendo LUVs. As soluções foram submetidas ao espalhamento de luz monocromática (10 mW Ele-Ne laser, $\lambda 632,4 \text{ nm}$) e a intensidade de luz espalhada foi medida em um ângulo de espalhamento de 90° . As soluções de peptídeo e lipossomas foram devidamente filtradas (filtros *Millipore* $0,45 \text{ }\mu\text{m}$) para eliminar qualquer material particulado.

2.13 Ensaio da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos foi investigada contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (American Type Culture Collection). Os microrganismos foram cultivados em cultura estacionária a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e, então, transferidos para o meio líquido de cultura Mueller-Hinton (*National Comitee for Clinical Laboratory Standards*). Os testes de inibição do crescimento bacteriano foram conduzidos conforme descrito na literatura (Bulet *et al.*, 1991). Os peptídeos foram dissolvidos e diluídos (diluição seriada) oito vezes em meio *Mueller-Hinton*, sendo a concentração máxima de $128 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($0,046 \text{ mmol}^{-1}$ para HMT-1, $0,023 \text{ mmol}^{-1}$ para HMT-2 e $0,040 \text{ mmol}^{-1}$ para LyeTx I). O inóculo inicial de bactérias foi de $2,5 \times 10^5 \text{ cfu.mL}^{-1}$ (seguindo-se a escala McFarland). O volume final foi de $100 \text{ }\mu\text{L}$, sendo $50 \text{ }\mu\text{L}$ do peptídeo testado e os outros $50 \text{ }\mu\text{L}$ do inóculo. O experimento foi realizado em cultura estacionária a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e as medidas espectrofotométricas foram efetuadas 12 h após a incubação. A concentração inibitória mínima (MIC) foi calculada a partir da densidade óptica ($A_{595 \text{ nm}}$) e foi o resultado de três medidas independentes. Antibióticos convencionais (ampicilina e cloranfenicol) tiveram seus MICs determinados e foram utilizados como padrões.

2.14 Experimentos de espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram registrados utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-810, acoplado a um sistema de controle de temperatura *Peltier* Jasco modelo PFD-425S, do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os espectros foram obtidos a 25 °C, na faixa λ de 190 a 250 nm, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, em quatro varreduras consecutivas por amostra. Foi empregada a velocidade de varredura de 50 nm.min⁻¹ e tempo de resposta de 4 s. A largura de banda foi de 1 nm e a leitura de elipticidade realizada a cada 0,5 nm.

As preferências conformacionais de todos os peptídeos foram investigadas em proporções variadas de água, 2,2,2 trifluoroetanol (TFE), dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilosfosfolina (DPC) para a obtenção das condições ideais de experimentos de RMN. Para isto, os peptídeos liofilizados foram dissolvidos em água, obtendo-se uma solução estoque de 1 mL, com concentrações de peptídeo entre 200 a 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Alíquotas de 10 μL desse estoque foram adicionadas a 110 μL de solvente, para o preparo de amostras utilizadas na obtenção dos espectros. As figuras finais foram editadas no programa Microcal Origin 7.0. As desconvoluções tanto dos experimentos em TFE quanto dos experimentos em micelas e vesículas, foram feitas pelo programa CDPPro (Sreerama e Woody, 2000; 2004), a fim de estimar o percentual de estruturas secundárias em cada meio.

2.15 Experimento de RMN

Os espectros de RMN de ¹H, de ¹³C e de ¹⁵N foram obtidos no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN), da UFRJ em um espectrômetro Bruker DRX600 – série *AVANCE*, que opera a 600,130 (para ¹H) , 150,903 (para ¹³C), e 60,834 MHz (para ¹⁵N) e também em outro espectrômetro Bruker *AVANCE* III operando na frequência de 800,118 MHz (para ¹H), 201,193 (¹³C), e 81.107 MHz (¹⁵N), ambos com sondas (5 mm de diâmetro) de tripla-ressonância com gradiente de campo. O composto 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato de sódio (DSS) foi empregado como padrão de referência interna para as ressonâncias de ¹H e de ¹³C. . Para os experimentos homonucleares foi utilizado o modo de aquisição *States-TPPI* e para os experimentos heteronucleares o modo de aquisição *Echo-antiecho*.

A determinação estrutural por RMN do peptídeo DD K foi realizada na presença

de DPC em equipamento de 800 MHz a 25 °C. Para isto, foi preparada uma amostra contendo 1 mmol.L⁻¹ de peptídeo, 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈ (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), 5% (v/v) D₂O (99.9%, Isotec, Inc.) em H₂O, e 10 μmol.L⁻¹ de DSS. Experimento de TOCSY foi realizado usando-se a sequência de pulso MLEV-17 (Claridge, 1999). Os parâmetros empregados foram: largura espectral de 14,25 ppm, incrementos de 512 *t*₁, e 32 transientes de 4096 pontos. Vários experimentos NOESY (Braun *et al.*, 1998) foram realizados utilizando-se tempos de misturas de 80, 100, 120, 140, 160 ms. Os parâmetros para os experimentos NOESY foram: largura espectral de 14,25 ppm, incrementos de 512 *t*₁, e 32 transientes de 4096 pontos para cada FID. O experimento ¹H-¹³C HSQC foi programado com larguras espectrais em F1 e F2 de 72,34 ppm e 14,25 ppm, respectivamente, e foram usados 400 incrementos em *t*₁, coletados com 16 transientes de 1024 pontos. O experimento foi realizado em modo editado de tal forma que as correlações de CH e CH₃ resultaram em sinais de fase positiva enquanto que as correlações de CH₂ resultaram em sinais de fase negativa (Willker *et al.*, 1993). O experimento de ¹H-¹⁵N-HSQC foi realizado com larguras espectrais em F1 e F2 de 34,01 ppm e 14,25 ppm respectivamente e 80 incrementos em *t*₁ foram coletados com 400 transientes de 1024 pontos para cada FID.

A amostra de LyeTx I para estudo estrutural por RMN foi preparada dissolvendo-se o peptídeo (2 mmol.L⁻¹) em uma solução de 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈, 5% (V/V) de D₂O em H₂O contendo tampão fosfato 30 mmol.L⁻¹ pH 6,5 e 5 μmol.L⁻¹ de DSS. Os experimentos foram realizados a 20 °C em equipamento de 600 MHz para a frequência de ¹H. Experimento de TOCSY foi realizado usando-se a sequência de pulso MLEV-17 (Claridge, 1999). A largura espectral foi de 11,96 ppm, sendo usados incrementos de 512 *t*₁, e 32 transientes de 4096 pontos em F1. Foram realizados experimentos NOESY (Braun *et al.*, 1998) com diferentes tempo de misturas: 80, 100, 120, 140 e 160 ms. Para este experimento a largura espectral foi de 11,96 ppm, e foram usados incrementos de 512 *t*₁, e 16 transientes de 4096 pontos para cada FID. O experimento ¹H-¹³C HSQC foi realizado em modo editado (Willker *et al.*, 1993) com larguras espectrais em F1 e F2 de 80,10 ppm e 11,96 ppm respectivamente, sendo realizados com 400 incrementos em *t*₁ com 16 transientes de 1024 pontos para cada FID. O experimento ¹H-¹⁵N-HSQC foi realizado com larguras espectrais em F1 e F2 de 58,70 ppm e 11,96 ppm, respectivamente, sendo os espectros obtidos com 400 incrementos em *t*₁ com 8 transientes de 1024 pontos para cada FID.

O peptídeo HMT-1 foi estudado por RMN em solução de TFE. A amostra foi

preparada adicionando-se 2,2,2-trifluoroetanol- d_2 (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato pH 7,0 na proporção 40/60 (v/v) e, ainda, 5 µmol.L⁻¹ DSS. A concentração do peptídeo HMT-1 foi de 4 mmol.L⁻¹, em um volume total de 0,5 mL, sendo transferido para um tubo de RMN de 5 mm. Foram empregadas seqüências de pulsos padrões fornecidas pelo fabricante, para os experimentos de correlação 2D homonuclear (TOCSY e NOESY) e heteronuclear (¹H-¹³C-HSQC e ¹H-¹⁵N-HSQC), empregando uma sonda de detecção inversa multinuclear de 5 mm, com pulso ¹H de 90° e largura de 11.3 µs. Para o experimento de TOCSY foi utilizado um tempo de mistura de 80 ms baseado em experimentos preliminares. A largura espectral foi de 12,01 ppm, sendo usados incrementos de 512 t_1 , e 32 transientes de 4096 pontos em F1. O tempo de mistura para o experimento NOESY foi determinado realizando-se diversos experimentos preliminares, variando-se o tempo de mistura de 60 a 200 ms, em intervalos de 20 ms, onde foi determinado um tempo ideal de 100 ms. No experimento NOESY a largura espectral foi de 12,01 ppm, sendo empregados incrementos de 512 t_1 , e 16 transientes de 4096 pontos para cada FID. Os mapas de contornos HSQC foram obtidos com seqüências de pulso empregando-se incrementos de tempo de 512, coletados para cada conjunto de dados de 1024 para cada FID. As larguras espectrais em F1 e F2 para ¹H-¹³C HSQC foram de 74,02 ppm e 11,96 ppm e para ¹H-¹⁵N-HSQC foram de 50,10 ppm e 11,96 ppm, respectivamente.

Duas amostras diferentes de HMT-2 foram preparadas para determinação estrutural por RMN. Primeiro, uma solução do peptídeo HMT-2 a 2 mmol.L⁻¹ foi preparada em 500 µL de uma mistura de D₂O/H₂O (1:10, v/v) e 5 µmol.L⁻¹ DSS, ajustando em pH 7,0 com uma solução tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹. A segunda amostra contendo 1 mmol.L⁻¹ de HMT-2 foi dissolvida em 400 mmol.L⁻¹ de DPC- d_{38} , 5% (v/v) D₂O em H₂O e 10 mmol.L⁻¹ DSS, em 35 mmol.L⁻¹ de tampão Tris-HCl, pH 7,0 contendo 50 mmol.L⁻¹ de cloreto de sódio.

O experimento em D₂O/H₂O (1:10, v/v) foi realizado em um espectrômetro operando a 800 MHz. O tempo de mistura empregado no experimento TOCSY foi de 70 ms, utilizando-se a seqüência de pulso MLEV-17. Os parâmetros empregados foram: largura espectral de 11,96 ppm, incrementos de 512 t_1 , e 12 transientes de 4096 pontos. O experimento NOESY foi obtido usando-se um tempo de mistura de 120 ms, largura espectral de 11,96 ppm, incrementos de 512 t_1 , e 16 transientes de 4096 pontos. A supressão do sinal da água foi alcançada empregando-se a técnica de *WATERGATE* (Piotto *et al.*, 1992).

Os dados de RMN de HMT-2 em micelas de DPC- d_{38} foram adquiridos no espectrômetro DRX 600. O tempo de mistura para o experimento TOCSY foi de 60 ms com largura espectral de 11,96 ppm, sendo empregados incrementos de 512 t_1 e 32 transientes de 4096 pontos em F1. Para o experimento NOESY, o tempo de mistura ideal foi de 100 ms e os parâmetros utilizados foram: largura espectral de 11,96 ppm, incrementos de 512 t_1 e 32 transientes de 4096 pontos para cada FID.

2.16 Processamento, análise e tratamento dos dados de RMN

A conversão e o processamento dos dados de RMN foram feitos pelo programa NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995). A interpretação dos mapas de contornos foi efetuada no programa NMRView 5.0 (Johnson e Blevins, 1994). Todos os programas e algoritmos utilizados nesta etapa foram criados para serem executados em plataforma Linux, e foram executados na distribuição Fedora, versões 10 e 11.

As restrições de distância foram obtidas por conversão dos volumes de sinais de nOes em distâncias semi-quantitativas por meio da metodologia de calibração proposta por Guentert (1998).

Os limites de restrições de distâncias usados foram de 2,8, 3,5 e 5,0 Å (nOes fortes, médios e fracos, respectivamente). Essa etapa foi efetuada pelo programa NMRView 5.0, sendo que os sinais relativos a grupos metila tiveram sua intensidade dividida por três.

As restrições angulares foram obtidas pelo programa Talos+ (Delaglio *et al.*, 1995), por meio de análise dos valores de deslocamento químico dos átomos da cadeia principal C_α , H_α , C_β , N, HN e C', em relação a um banco de dados de deslocamentos químicos desses átomos em estruturas de proteínas determinadas em alta resolução.

Os conjuntos de restrições de distâncias e de ângulos diedros para cada peptídeo foram analisados previamente ao cálculo de dinâmica molecular utilizando o programa QUEEN (*Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints*) (Nabuurs *et al.*, 2004a). Neste programa foram empregados dois parâmetros para analisar a contribuição e a consistência de cada restrição que constitui um conjunto de restrições geométricas. Esses parâmetros foram a unicidade de informação (I_{uni}) e a informação média (I_{med}). A I_{uni} de uma restrição é definida como a informação adicionada por essa restrição, tendo-se conhecimento das demais restrições no conjunto de dados e informa se um tipo de restrição é único nesse conjunto. A I_{med} indica a importância de uma restrição,

considerando-se a totalidade do conjunto de restrições, sendo calculada pela média do conteúdo de informação em cada permutação possível da lista de restrições.

O cálculo do conjunto de estruturas obtidas por análise de RMN foi realizado utilizando-se o programa Xplor-NIH versão 2.17 (Schwieters *et al.*, 2006) e o algoritmo de arrefecimento simulado (SA) *sa_new.inp* (Schwieters *et al.*, 2003). Utilizou-se uma estrutura de partida randômica gerada pelo algoritmo *generate_input* e com uma topologia *protein.top* e parametrizações *protein.par*, levando-se em conta a amidação da extremidade C-terminal dos peptídeos. Os cálculos estruturais foram realizados partindo-se da estrutura estendida, 200 estruturas foram geradas usando o protocolo de SA. Foram realizadas 10.000 etapas de SA a 1000 K e o subsequente decréscimo da temperatura em 20.000 etapas.

Todos os cálculos estruturais foram realizados para serem geradas 200 estruturas. Desse conjunto, foram selecionadas as 20 estruturas de menores energias totais, as quais foram analisadas por meio dos programas MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) e YASARA Biosciences (Krieger *et al.*, 2008). Para cada conjunto de estruturas foi calculada a raiz quadrada dos desvios médios quadrados (*Root of Mean Square Deviations* - RMSD) dada pela equação 2.1:

$$RMSD(N; x, y) = \left[\frac{\sum_{i=1}^N w_i \|x_i - y_i\|^2}{N \sum_{i=1}^N w_i} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.5)$$

A validação e análises estruturais foram feitas através do servidor *iCing* (<http://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html#file>), utilizando-se as metodologias dos programas Procheck (Laskowski *et al.*, 1996) e WhatIf (Vriend, 1990; Rodriguez *et al.*, 1998), bem como os critérios de classificação do programa CING (*Common Interface for NMR Structure Generation*). A análise da qualidade dos modelos foi realizada com base nas classificações de combinações dos ângulos ϕ e ψ em quatro regiões do gráfico de Ramachandran: as regiões mais favoráveis, as adicionalmente permitidas, as generosamente permitidas e a proibida.

Capítulo 3

Resultados de Discussão

3.1 Peptídeo antimicrobiano DD K

O isolamento de vários peptídeos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta*, encontrada na mata Atlântica foi descrito por Batista e colaboradores (Batista *et al.*, 1999). Dentre estes, pode-se destacar o peptídeo dermadistinctina K (DD K), pertencente à classe das dermaseptinas, que consistem em moléculas catiônicas de 28 a 34 resíduos, capazes de permeabilizar membranas bacterianas e apresentam pequena ou nenhuma atividade hemolítica (Batista *et al.*, 2001). Neste item serão apresentados os resultados do estudo do efeito do colesterol na interação do peptídeo DD K com membranas fosfolipídica, além do estudo do comportamento estrutural do peptídeo em ambientes que mimetizam membranas bacterianas. A Tabela 3.1 mostra a estrutura primária de DD K, composta por 33 resíduos de aminoácidos e que possui uma região C-terminal amidada.

Tabela 3.1 - Sequência primária do peptídeo antimicrobiano DD K

Peptídeo	Sequência
DD K	GLWSK IKAAG KEAAK AAKA AGKAA LNAVS EAV -NH ₂

NH₂ representa a amidação do grupamento C-terminal

3.1.1 Síntese, Purificação e Caracterização

A síntese do peptídeo DD K foi realizada manualmente em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc, empregando-se DIC e HOBt como agentes de acoplamento e não apresentou nenhuma dificuldade especial. O acompanhamento da síntese a cada adição de um novo resíduo de aminoácido fez-se necessário para identificar reações incompletas que são detectadas pelo teste de *Kaiser* (Chan e White, 2000). Neste teste a presença de grupo amino livre é caracterizada pela coloração azulada da resina. Dessa forma, ao final de cada etapa de acoplamento e de desproteção do grupo amino, foram realizados estes testes qualitativos. Em caso de reações incompletas reveladas por este teste, foi necessária a repetição da etapa (reacoplamento). A Tabela 3.2 (p.58) apresenta os dados do acompanhamento da síntese de DD K pela SPFS.

Tabela 3.2- Dados do acompanhamento da síntese de DD K

Ordem de acoplamento	Derivado Aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Val-OH	4	4,0	-	+
2°	Fmoc-Ala-OH	3	2,0	-	+
3°	Fmoc-Glu(<i>Or</i> -Bu)-OH	3	2,0	-	+
4°	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	3	2,0	* -	+
5°	Fmoc-Val-OH	3	2,0	* -	+
6°	Fmoc-Ala-OH	3	2,0	* -	+
7°	Fmoc-Asn(<i>Trt</i>)-OH	3	2,0	* -	+
8°	Fmoc-Leu-OH	3	2,0	-	+
9°	Fmoc-Ala-OH	3	2,0	-	+
10°	Fmoc-Ala-OH	3	2,0	-	+
11°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,0	-	+
12°	Fmoc-Gly-OH	4	2,5	-	+
13°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
14°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
15°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	-	+
16°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
17°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
18°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
19°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	-	+
20°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
21°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
22°	Fmoc-Glu(<i>Or</i> -Bu)-OH	4	2,5	-	+
23°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	-	+
24°	Fmoc-Gly-OH	4	2,5	-	+
25°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	* -	+
26°	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	-	+
27°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	-	+
28°	Fmoc-Ile-OH	4	2,5	+	~
-	# Fmoc-Ile-OH	5	2,5	-	+
29°	Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	+	~
-	# Fmoc-Lys(<i>Boc</i>)-OH	4	2,5	-	+
30°	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	4	2,5	+	~
-	# Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	4	2,5	* -	+
31°	Fmoc-Trp(<i>Or</i> -Bu)-OH	4	2,5	+	~
-	# Fmoc-Trp(<i>Or</i> -Bu)-OH	5	3,0	-	+
32°	Fmoc-Leu-OH	5	2,5	+	~
-	# Fmoc-Leu-OH	5	3,0	-	+
33°	Fmoc-Gly-OH	5	2,5	+	~
-	# Fmoc-Gly-OH	5	3,0	-	+

Etapas de reacoplamento * Repetição do testes de *Kaiser* para confirmação.
+ Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre. - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre. ~ Teste não realizado.

É possível observar pelos dados da Tabela 3.2 (p. 58) que a síntese foi realizada eficientemente até o 27° acoplamento, a partir do qual foram necessários reacoplamentos para os resíduos de Ile (28° acoplamento), Lys (29° acoplamento), Trp (31° acoplamento), Leu (32° acoplamento) e Gly (33° acoplamento). Além disso, em algumas etapas como 4°, 5°, 6°, 7°, 25° e 30° acoplamentos, foi necessária a repetição do teste de *Kaiser* para confirmação do resultado, devido a dificuldades de visualização da coloração dos grãos (fase sólida). Após a adição do último resíduo de aminoácido da síntese, o peptídeo foi separado do suporte sólido (etapa de clivagem) e, então, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrometria de massas (EM). Na Figura 3.1 é apresentado o cromatograma do peptídeo bruto, obtido após reação de clivagem, onde é possível observar um pico proeminente com tempo de retenção (t_r) de 26,3 min.

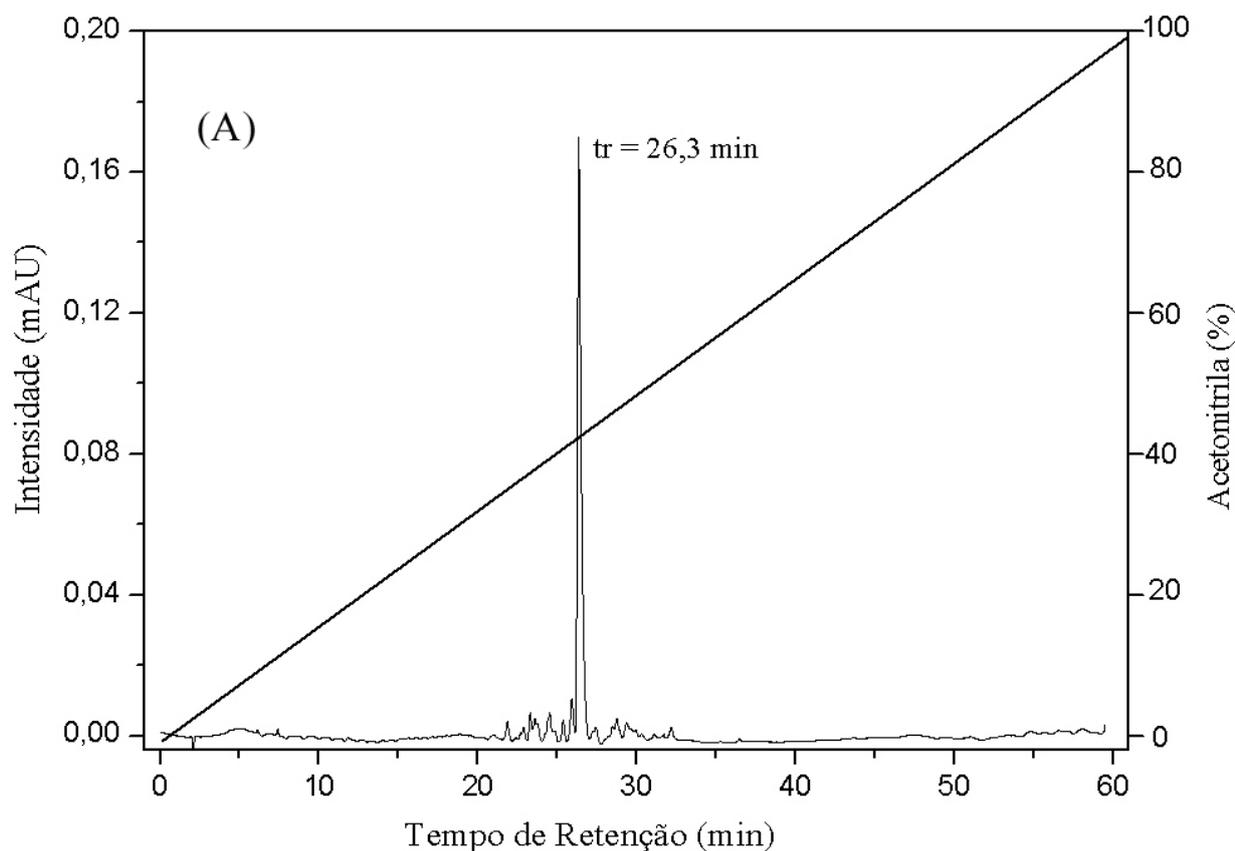


Figura 3.1- Perfil de CLAE de amostra da síntese do peptídeo DD K bruto. Amostra injetada (25 μ L) em coluna *C*₁₈ *Vydac* 218TP510 (250 x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 214 nm.

O espectro obtido por EM-MALDI-ToF da mesma amostra bruta da síntese está apresentado na Figura 3.2, onde é possível observar a presença de picos devidos a íons $[M+H]^+$ de m/z 3150,8 e 3079,7, correspondendo ao peptídeo DD K e a um análogo de DD K com um resíduo de Ala (C_3H_5NO) a menos. Após a confirmação do sucesso da síntese, o peptídeo DD K foi purificado e, novamente, analisado por cromatografia líquida e por espectrometria de massas. A análise por EM-MALDI-ToF da amostra de DD K purificada (Figura 3.3A, p. 61) mostra a presença de um único pico correspondente ao íon $[M+H]^+$ de m/z 3150,9, o qual é devido ao peptídeo DD K protonado. O perfil de cromatografia de fase reversa da amostra de DD K purificada (Figura 3.3B, p. 61) comprovou a pureza da amostra. A integração do pico com t_r 12 min mostrou um grau de pureza de aproximadamente 98%. A síntese foi planejada para a obtenção de 0,047 mmol de DD K, porém após a purificação foram obtidos 0,021 mmol do peptídeo, representando um rendimento de 45% após a purificação final.

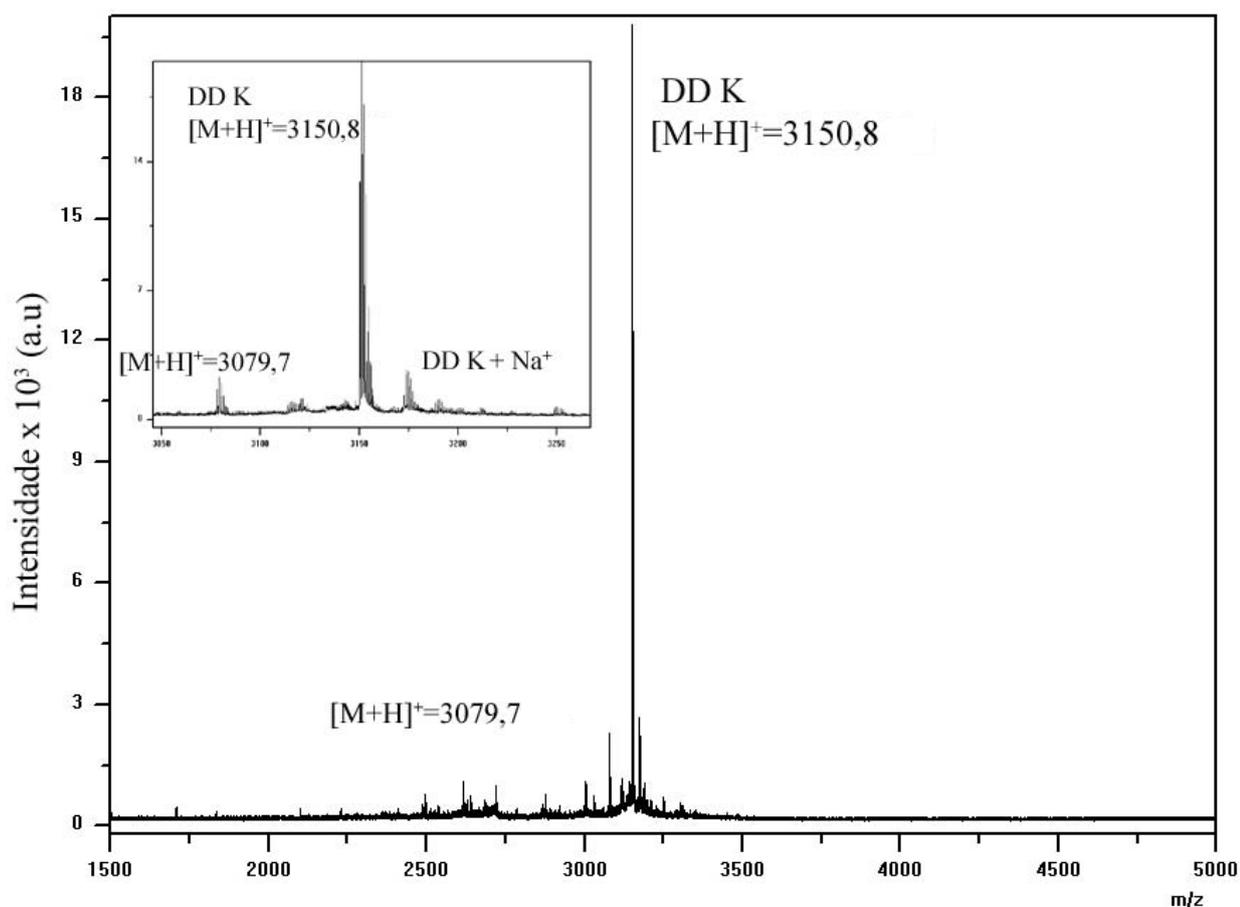


Figura 3.2 - Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) do peptídeo DD K.

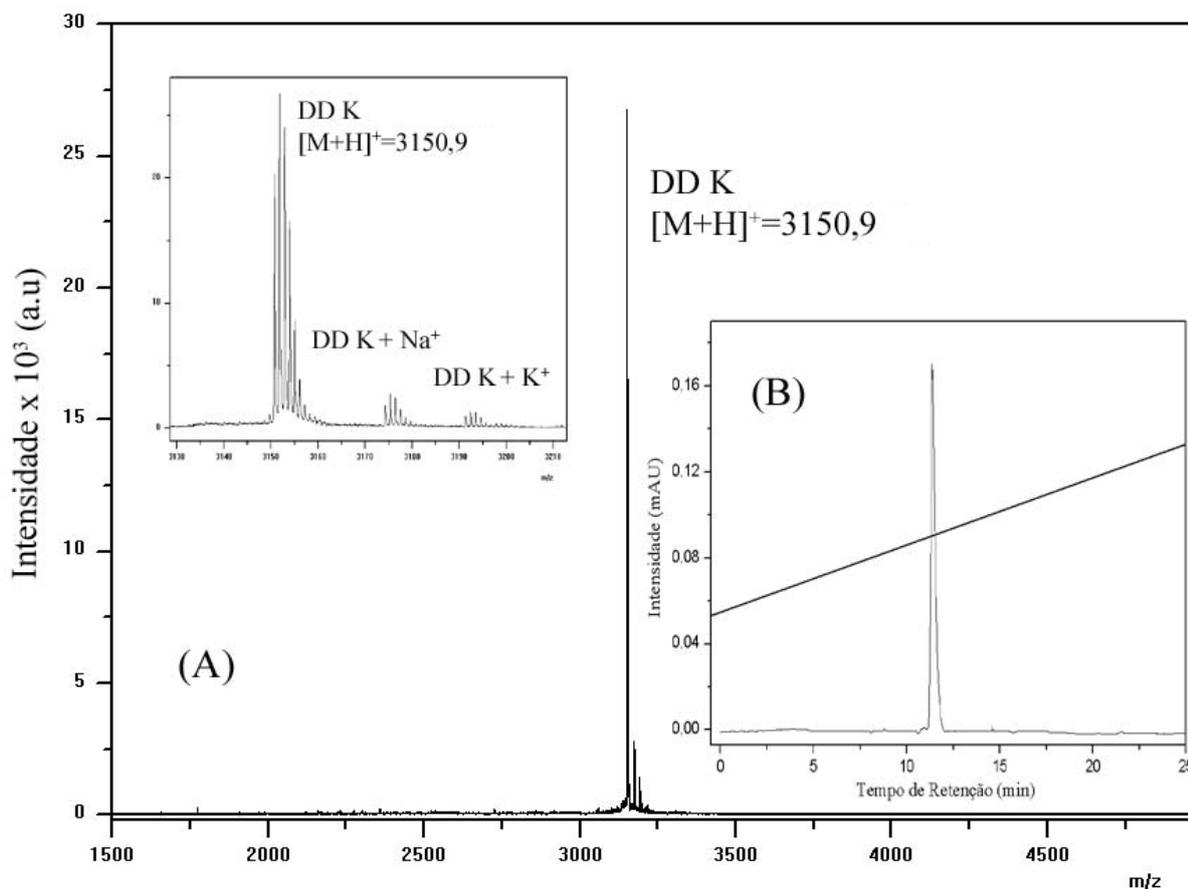


Figura 3.3- (A) Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) da amostra purificada da síntese de DD K. (B) Perfil de CLAE da amostra purificada de DD K. Amostra injetada (150 μL de uma solução a 1 mg mL^{-1}) em coluna C_{18} *Vydac* 218TP510 (250mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ 214 nm.

3.1.2 Estudos termodinâmicos

Após a purificação da amostra de DD K, foram realizados estudos termodinâmicos da interação do peptídeo com membranas fosfolipídicas. Estudos recentes por vários métodos físico-químicos mostraram o efeito que a variação da composição fosfolipídica causa na interação de DD K com membranas biomiméticas (Silva *et al.*, 2008). Entretanto, o efeito do colesterol na interação de DD K com membranas não fora estudado ainda. Deste modo, este trabalho apresenta o efeito do teor de colesterol na ligação de DD K com vesículas unilametares grandes (LUVs de 100 nm), o qual foi investigado por medidas da cinética de extravasamento de carboxifluoresceína (CF), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Para isto foram preparadas LUVs sem colesterol (PC-LUVs)

e com teores diferentes de colesterol (LUVs-Col), sendo 43% em mol de colesterol a maior concentração empregada na composição das LUVs, de forma a aproximar-se da razão molar colesterol/fosfolipídeos típica de células de eritrócitos (0,84) (Herrero *et al.*, 1985). A seguir serão apresentados separadamente os resultados obtidos de cada técnica.

3.1.2.1 Extravasamento de Carboxifluoresceína (CF)

A taxa de extravasamento de CF das vesículas foi calculada pelo aumento da emissão de fluorescência em função do tempo, como mostrado na Figura 3.4. A liberação de CF das LUVs sem adição de peptídeo pode ser considerada desprezível durante o tempo de experimento.

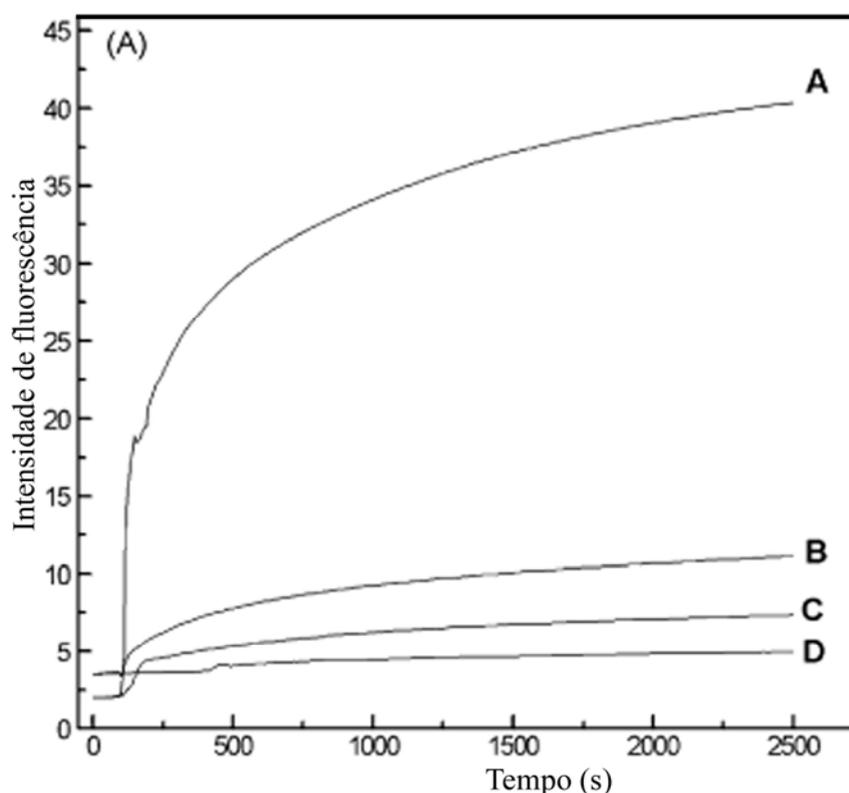


Figura 3.4 – Curva da cinética da liberação de CF de LUVs com adição de DD K. A - PC-LUVs, B - LUVs-Col 12% em mol, C - LUVs-Col 29% em mol e D - LUVs-Col 43% mol.

Os resultados mostram que a adição de DD K a PC-LUVs e LUVs-Col leva à liberação de CF do interior das LUVs. A maior liberação de CF ocorre quando DD K é adicionado a PC-LUVs (curva A, Figura 3.4), sem colesterol, enquanto uma diminuição da liberação de CF ocorre com o aumento da proporção de colesterol às LUVs (curva B

e C, Figura 3.4, p. 62). Para a curva D, que descreve a liberação de CF com a adição de DD K a LUVs-Col 43%mol, não foi observada uma variação significativa da intensidade de emissão de fluorescência, indicando praticamente que não há vazamento de CF das LUVs-Col 43%mol. Os dados foram analisados como processos de primeira ordem e a uma taxa de liberação constante, k_{obs} , para cada curva do estudo do efeito do peptídeo DD K em PC-LUVs e LUVs-Col. Os resultados da cinética de liberação de CF para cada experimento permitiram a obtenção das constantes de velocidade que estão apresentadas na Tabela 3.3, com exceção das LUVs-colesterol 43%mol, onde não pode ser calculado, pois a cinética de liberação da CF apresentou-se muito lenta.

Tabela 3.3 - Efeito de DD K em K_{obs} para a liberação de CF em PC-LUVs e LUVs-Col

[DD K] $\mu\text{mol.L}^{-1}$	PC-LUVs		LUVs-Col 12%mol		LUVs-Col 29%mol		LUVs-Col 43%mol	
	[DD K] /[PC]	K_{obs} ($10^{-3} \cdot \text{s}^{-2}$)	[DD K] /[PC]	K_{obs} ($10^{-3} \cdot \text{s}^{-2}$)	[DD K] /[PC]	K_{obs} ($10^{-3} \cdot \text{s}^{-2}$)	[DD K] /[PC]	K_{obs} ($10^{-3} \cdot \text{s}^{-2}$)
0,30	0,031	1,22	0,042	0,85	0,046	0,65	0,050	0
0,45	0,046	1,62	0,064	1,31	0,069	0,35	0,075	0
0,60	0,062	1,60	0,085	1,48	0,091	1,28	0,100	0
0,90	0,093	2,61	0,127	1,37	0,137	1,52	0,150	0
1,19	0,123	3,00	0,169	2,04	0,182	1,27	0,198	0
2,38	0,248	5,78	0,340	3,07	0,367	1,36	0,396	0

Os dados da Tabela 3.3 mostram que o aumento da razão DD K/PC resulta também em um aumento na taxa de liberação de CF (k_{obs}) das LUVs sem colesterol e com 12% em mol de colesterol. É importante notar que, na razão DD K/PC de 0,031 para PC-LUVs, o k_{obs} é $1,22 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, enquanto que para LUVs-Col 12%mol de colesterol a mesma ordem de grandeza de k_{obs} foi alcançada somente na razão DD K/PC de 0,064 e para LUVs-Col 29%mol, tal valor de k_{obs} foi alcançado somente na razão DD K/PC de 0,091.

Pela Figura 3.5 (p. 64) o valor de k_{obs} varia em função da concentração molar de DD K/PC. Verifica-se que o aumento da razão DD K/PC leva também a aumentos lineares nas taxas de liberação de CF (k_{obs}) em PC-LUVs (ajuste linear com maior inclinação). Nas LUVs-Col 12%mol é observada também uma variação linear de k_{obs} com o aumento da razão molar DD K/PC, porém a inclinação do gráfico k_{obs} em função da razão molar DD K/PC torna-se menor, praticamente três vezes menor, do que valor obtido em LUVs sem colesterol. A 29%mol de colesterol nenhuma dependência foi

observada entre k_{obs} e a razão molar DD K/PC. O k_{obs} para LUVs-Col 43%mol não pode ser calculado também, devido à cinética de liberação de CF ser muito lenta nestas condições.

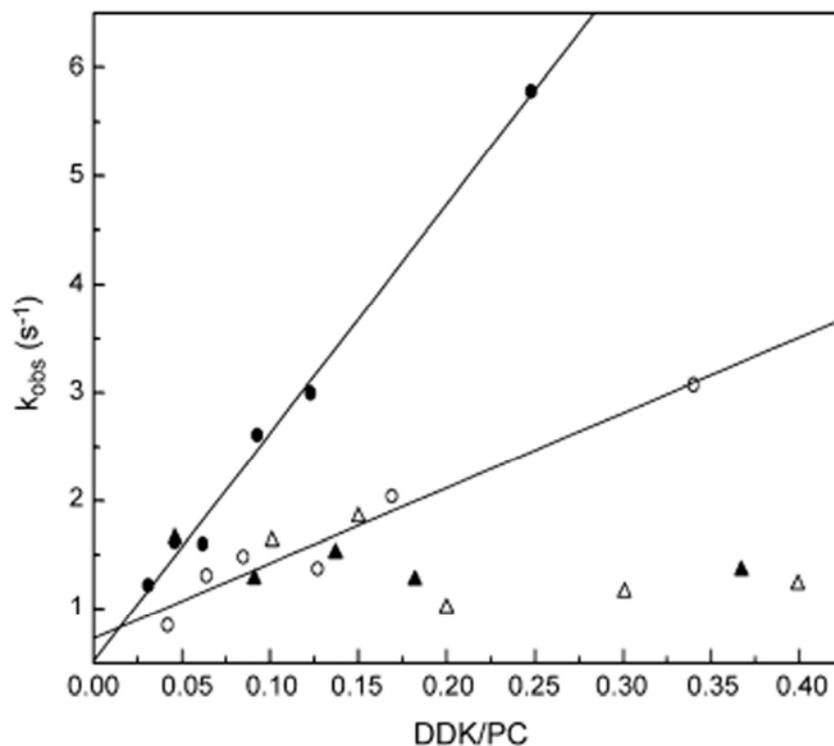


Figura 3.5 - Razão de liberação de CF, K_{obs} , em função da razão molar da DD K/PC. (●) PC-LUVs; (○) LUVs-Col 12% em mol; (▲) LUVs-Col 29% em mol e (△) LUVs-Col 43% em mol. Os ajustes lineares foram realizados para os dados de (●) PC-LUVs; (○) LUVs-Col 12% em mol.

A partir destes resultados, foi construído um gráfico da porcentagem de liberação de CF após 2000 s, determinada usando-se a Equação 2.6 (Capítulo 2, p. 50) em função da razão molar DD K/PC como que está apresentado na Figura 3.6 (p. 65). Novamente, para PC-LUVs e LUVs-Col 12%mol o aumento da razão molar DD K/PC leva a um aumento da %CF liberada, alcançando um patamar em razões molares DD K/PC elevadas. Para LUVs-Col 29%mol o aumento da razão molar DD K/PC leva a um aumento da %CF liberada, porém mesmo em elevadas razões molares DD K/PC o máximo da %CF liberada é pequena (menor que 40%). Para LUVs contendo 43%mol de colesterol a porcentagem de liberação de CF em todas as razões molares DD K/PC foi muito pequena, impossibilitando a quantificação. Como pode ser observado na Figura 3.6, comparando-se em uma mesma concentração, a porcentagem de CF liberada em LUVs-colesterol é sempre menor do que em PC-LUVs sem colesterol.

Os resultados de extravasamento da CF indicam então uma fraca interação entre

o peptídeo antimicrobiano com LUVs-Col. Dessa forma, DD K é capaz de interagir fortemente com PC-LUVs, porém a inserção de colesterol reduz a perturbação causada pelo DD K na membrana. Deve-se salientar que, com 43%mol de colesterol, há pouco vazamento de CF promovida pelo DD K, deste modo, a atividade hemolítica baixa da DD K pode ser devida parcialmente à presença de colesterol em membranas de células eucariotas.

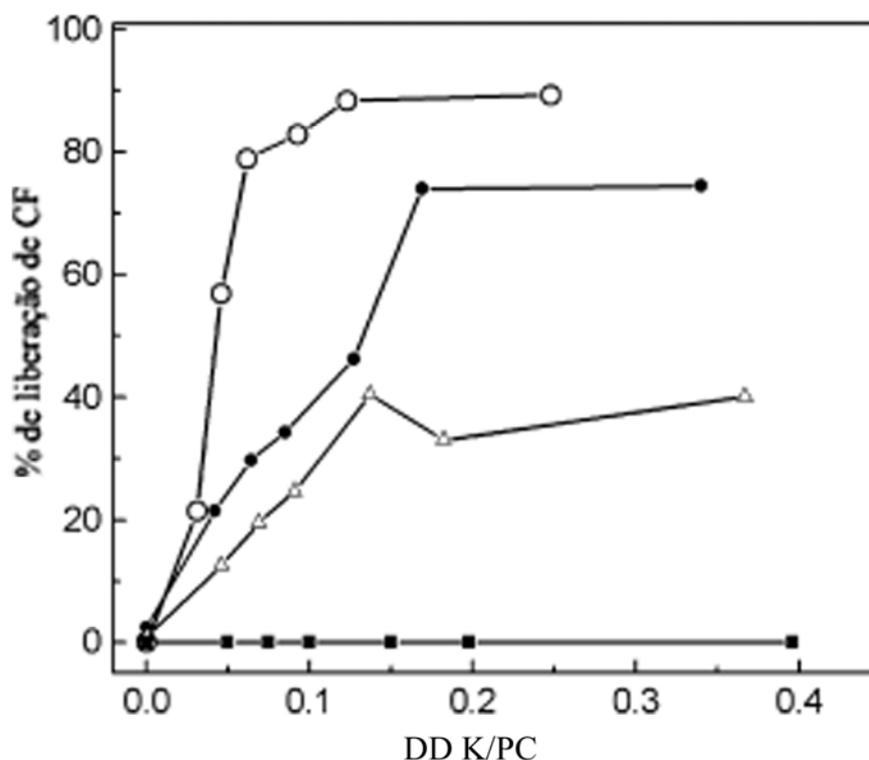


Figura 3.6 - Porcentagem de liberação de CF em função da razão molar DD K/PC. (○) PC-LUVs; (●) LUVs-Col 12% em mol; (Δ) LUVs-Col 29% em mol e (■) LUVs-Col 43% em mol.

3.1.2.2 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

O efeito do colesterol nas interações entre DD K e PC-LUVs foi analisado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Esta técnica tem sido muito empregada na caracterização do modo de interação entre peptídeos e vesículas biomiméticas (Wieprecht e Seelig, 2002; Brockhaus *et al.*, 2007), fornecendo em um único experimento a descrição termodinâmica da interação (ΔG , ΔH , ΔS constante de interação K e o coeficiente estequiométrico, n). Com o intuito de evitar a preparação de soluções de peptídeos em concentrações nominais elevadas, a titulação foi realizada sempre com a solução do peptídeo na célula calorimétrica e solução de LUVs na seringa de injeção.

A Figura 3.7 apresenta os dados da titulação da solução de DD K ($93 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por PC-LUVs (20 mmol.L^{-1}). Cada pico na Figura 3.7A corresponde a uma adição de $5 \mu\text{L}$ de PC-LUVs à célula de reação contendo DD K. As variações negativas do fluxo de calor envolvido em cada injeção de PC-LUVs indicam um tipo de reação exotérmica. A entalpia calculada para cada injeção de LUVs em função da razão PC/DD K, bem como o calor de diluição de PC-LUVs quando adicionadas à solução tampão sem DD K, são mostradas na Figura 3.7B.

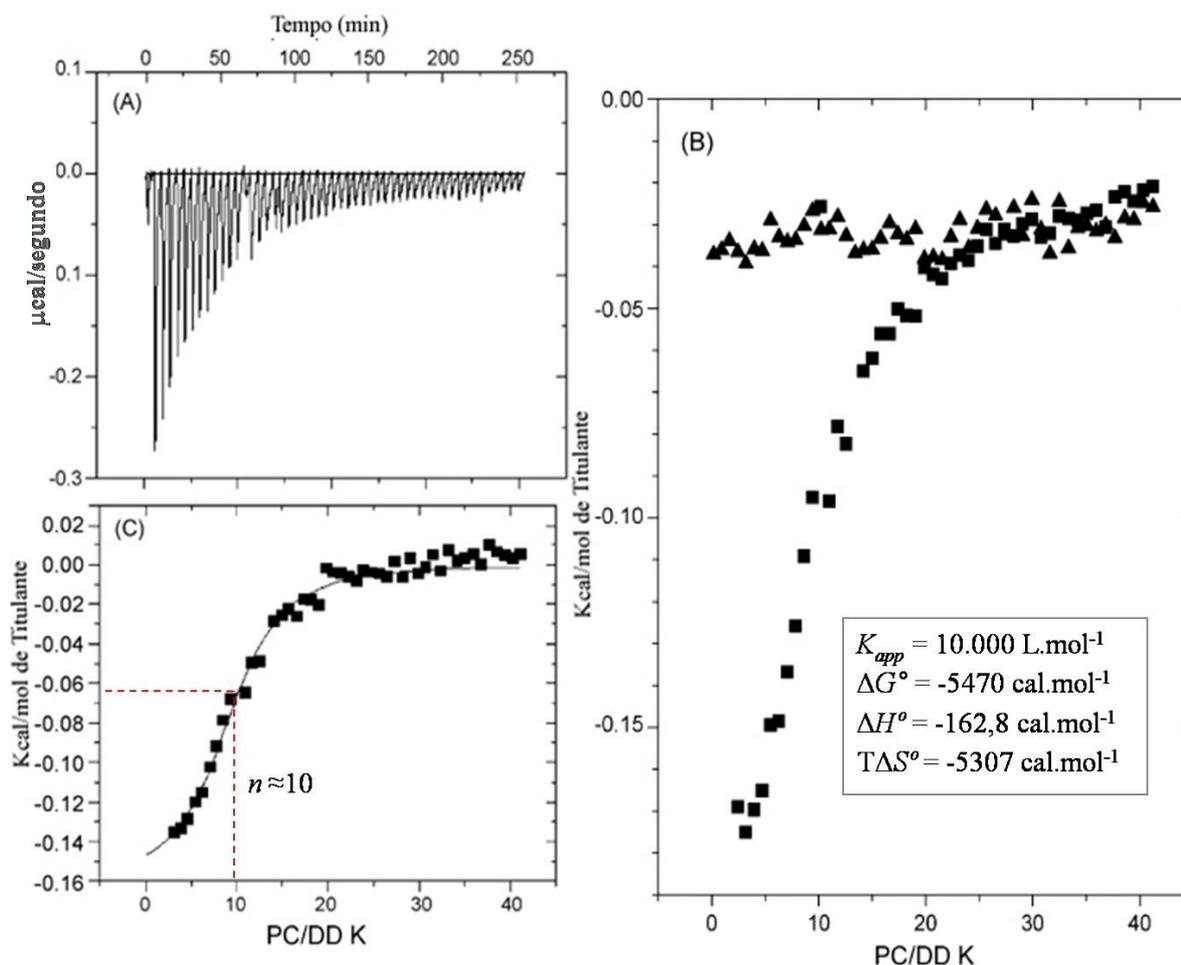


Figura 3.7 - Valores de titulação isotérmica de DD K com PC-LUVs. (A) Fluxo de calor para cada injeção de PC-LUVs em função do tempo. (B) Gráfico de entalpia em função da razão molar de PC/DD K. Calor de diluição (▲) e calor de interação (■). (C) Gráfico de entalpia em função da razão molar de PC/DD K com subtração dos calores de diluição.

É possível verificar uma diminuição da liberação de calor após cada injeção da titulação, até que estes valores se tornam pequenos e próximos aos valores de entalpia de diluição de PC-LUVs. Os calores de ligação da DD K com LUVs foram subtraídos dos dados de diluição e estão apresentados também em função da razão molar PC/DD K na Figura 3.7C. A isoterma de interação apresentada na Figura 3.7C foi calculada por

um ajuste não linear da curva, usando o modelo de apenas um sítio de interação, em que a razão molar DD K/PC no ponto de inflexão da curva corresponde à estequiometria do sistema peptídeo-PC. Para a titulação de PC-LUVs em solução de DD K, os dados mostram que n é aproximadamente 10. Assim sendo, a estrutura supramolecular formada pelo peptídeo ligado a LUVs tem 10 lipídeos para cada molécula de peptídeo. Esta interação provavelmente ocorre pela incorporação parcial do peptídeo na bicamada das LUVs, como pôde ser comprovado pelo aumento do tamanho das vesículas observado pelos experimentos de DLS que serão apresentados no próximo item (Figura 3.9, p. 70).

Os parâmetros termodinâmicos calculados ΔG° , ΔH° , constante de interação aparente K_{app} e o coeficiente estequiométrico, n , para a interação DD K com PC LUVs sem e com colesterol estão mostrados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Parâmetros termodinâmicos obtidos pelo experimento de ITC para a interação do peptídeo DD K com PC-LUVs e LUVs-Col a 25 °C

LUVs/ [DD K]	n	K_{app} (L.mol ⁻¹)	ΔG° (cal.mol ⁻¹)	ΔH° (cal.mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (cal.mol ⁻¹)
PC-LUVs/ [93 mmol ⁻¹]	9,7 ± 0,3	10.000	-5470	-162,8 ± 7,7	5307
LUVs-Col 43%mol / [2 mmol ⁻¹]	1,36 ± 0,01	2160	-4546	-1478,0 ± 28	3068

Os dados de ITC mostram que ambos componentes entálpico (-162,8 cal.mol⁻¹) e entrópico (5307 cal.mol⁻¹) favorecem a ligação peptídeo-PC-LUVs, apesar de o termo entrópico ser da ordem de 30 vezes maior que a contribuição entálpica (Tabela 3.4). A dessolvatação do peptídeo e sua inserção na bicamada podem constituir uma importante contribuição para o componente entrópico, através do ganho de entropia rotacional e translacional de moléculas de água liberadas. A constante de interação (K_{app}) peptídeo-LUVs é da ordem de 10.000 L.mol⁻¹ indicando uma interação significativa entre as espécies no sistema. Finalmente, a valor negativo da variação de energia-livre de Gibbs mostra um processo espontâneo na ligação de DD K com PC-LUVs.

Em seguida foi realizada a titulação de DD K (93 µmol.L⁻¹) com 20 mmol.L⁻¹ de LUVs-Col 43%mol. O resultado da titulação não mostrou interação significativa do sistema e nenhum parâmetro termodinâmico pôde ser obtido, pois há uma similaridade entre o calor de interação de DD K com LUVs-Col e o calor de diluição de LUVs-Col

(Figura 3.8B, p. 68). Isto sugere que a ligação do peptídeo é mais fraca com LUVs-Col do que com PC-LUVs. A fim de se obter os parâmetros termodinâmicos para a interação entre o DD K e a bicamada fosfolipídica contendo colesterol, foi necessário aumentar consideravelmente a razão molar peptídeo/PC, titulando-se então 2 mmol.L⁻¹ de DD K com 20 mmol.L⁻¹ de LUVs-Col. A titulação nestas condições está mostrada na Figura 3.8A. Comparando-se a Figura 3.7A (p. 66) e 3.8A, após cada injeção de LUVs na solução de DD K pode-se observar uma maior quantidade de calor liberado (-4 µcal/s), devido à maior concentração de peptídeo na célula de reação. A Figura 3.8B mostra uma comparação do calor de interação de 2 mmol.L⁻¹ de DD K com LUVs-Col (■), 0,93 mmol.L⁻¹ de DD K com LUVs-Col (○) e o calor de diluição de LUVs-Col (▲). Verifica-se uma inclinação significativa da curva de titulação de 2 mmol.L⁻¹ de DD K com LUVs-Col, permitindo o ajuste da isoterma de interação para este sistema.

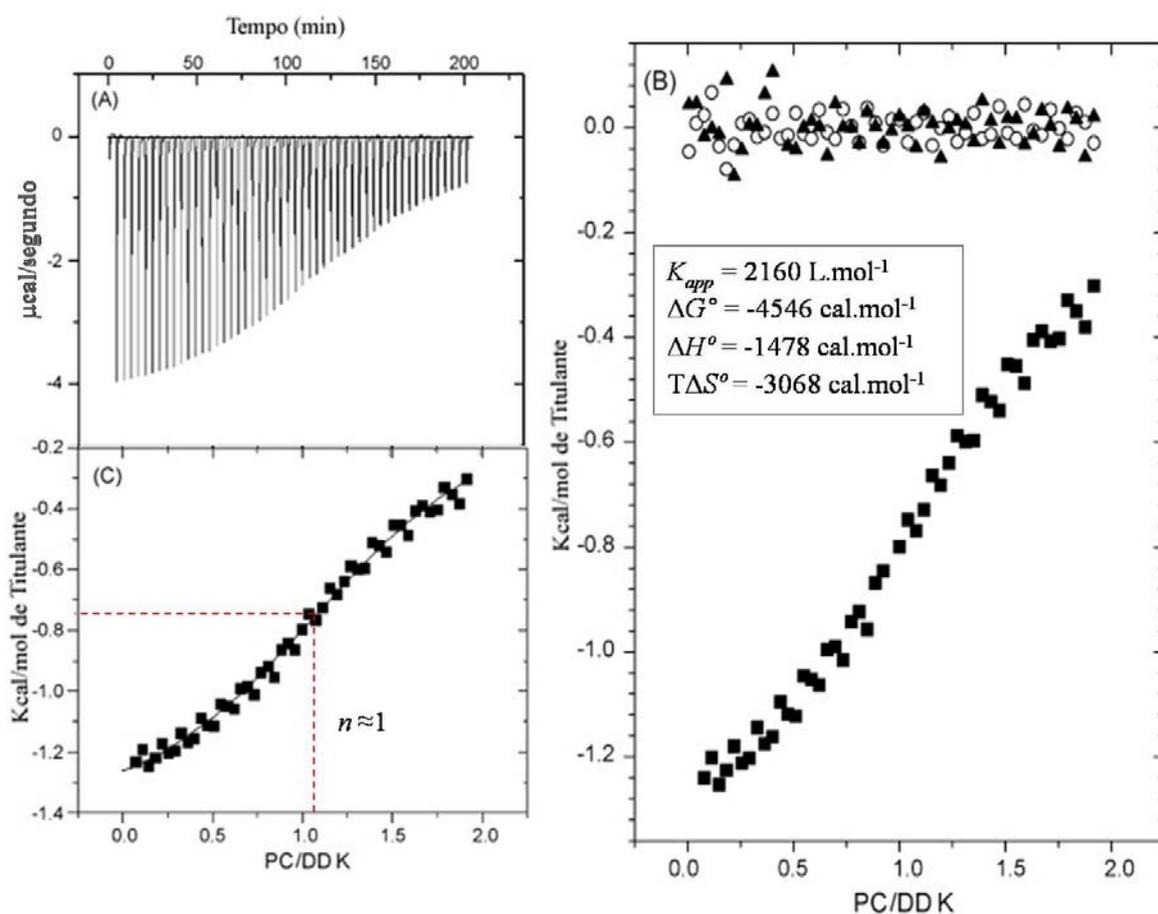


Figura 3.8 - Valores de titulação isotérmica de DD K com LUVs-Col. (A) Fluxo de calor para cada injeção de PC-LUVs/Col sobre uma solução de 2 mmol.L⁻¹ de DD K em função do tempo. (B) Gráfico de entalpia em função da razão molar de PC/DD K. (○) Calor de interação da titulação de DD K (0,093 mmol.L⁻¹); calor de diluição (▲) e calor de interação (■). (C) Gráfico de entalpia em função da razão molar de PC/DD K com subtração dos calores de diluição.

Na Figura 3.8C (p. 68) é possível observar o calor envolvido na ligação DD K/LUVs depois de subtraído do calor de diluição, na qual a isoterma de ligação foi determinada pelo ajuste não linear da curva empregando-se um modelo de apenas um sítio de interação. O ponto de inflexão desta curva mostra um coeficiente estequiométrico (n) da interação de DD K com LUVs-Col de $n = 1$, sendo este significativamente menor quando comparado com o valor obtido para PC-LUVs ($n = 10$). A alta concentração de LUVs-Col necessária para atingir a saturação da interação peptídeo-LUVs/Col sugere que a ação do peptídeo sobre membranas biológicas contendo colesterol pode ser dificultada em condições fisiológicas.

Os parâmetros termodinâmicos calculados a partir destes dados são mostrados na Tabela 3.4 (p. 67). A constante de interação aparente (K_{app}) obtida para a associação de DD K com LUVs-colesterol 43% em mol foi cerca de cinco vezes menor ($K_{app} = 2160 \text{ L.mol}^{-1}$) do que aquela obtida para PC-LUVs ($K_{app} = 10.000 \text{ L.mol}^{-1}$), confirmando uma menor interação de DD K com LUVs contendo colesterol. Contudo, deve-se ressaltar que a interação de DD K com LUVs-Col é mais favorável segundo o componente entálpico ($\Delta H = -1478 \text{ cal.mol}^{-1}$) do que a ligação com PC-LUVs ($\Delta H = -162,8 \text{ cal.mol}^{-1}$). O componente entálpico para a ligação DD K com lipossomas contendo colesterol apresenta uma ordem de magnitude maior que a entalpia da ligação DD K com PC-LUVs devido à alta contribuição das interações eletrostáticas entre a carga positiva da DD K e a carga negativa do grupo fosfato do PC. A interface mais hidratada e polar dos lipossomas contendo colesterol facilita a interação eletrostática superficial de DD K LUVs (Yau *et al.*, 1998). Assim mesmo, o componente entrópico é predominante na interação, podendo ser explicado pela dessolvatação decorrente da interação superficial peptídeo-LUVs. Este componente entrópico ($T\Delta S$) da interação peptídeo-LUVs/Col ($3068 \text{ cal.mol}^{-1}$) apresenta a mesma ordem de magnitude para a interação peptídeo-PC-LUV ($5307 \text{ cal.mol}^{-1}$), sendo porém um pouco menor. Este menor valor da variação da entropia pode estar relacionado com a menor inserção do peptídeo na superfície hidrofóbica da bicamada, a qual é mais difícil na presença do colesterol do que em LUVs sem colesterol. Apesar de ser menos favorável, o processo de ligação DD K com LUVs-Col mostra-se também espontâneo com um valor de ΔG negativo e da ordem de $4546 \text{ cal.mol}^{-1}$.

3.1.2.3 Espalhamento de Luz dinâmico (DLS)

O efeito de DD K sobre o diâmetro hidrodinâmico (D_h) de LUVs na ausência ou na presença de colesterol foi verificado por DLS. Na Figura 3.9 pode ser observada a variação do D_h das LUVs com a adição de DD K. É possível notar que a adição de alíquotas de DD K à solução de LUVs resulta em um aumento significativo de D_h até que um patamar seja alcançado. Entretanto, vale ressaltar que, para um mesmo valor da razão DD K/PC, é observado um maior aumento do D_h de LUVs sem colesterol, enquanto que o aumento da concentração de colesterol nas LUVs diminui o efeito no D_h das vesículas.

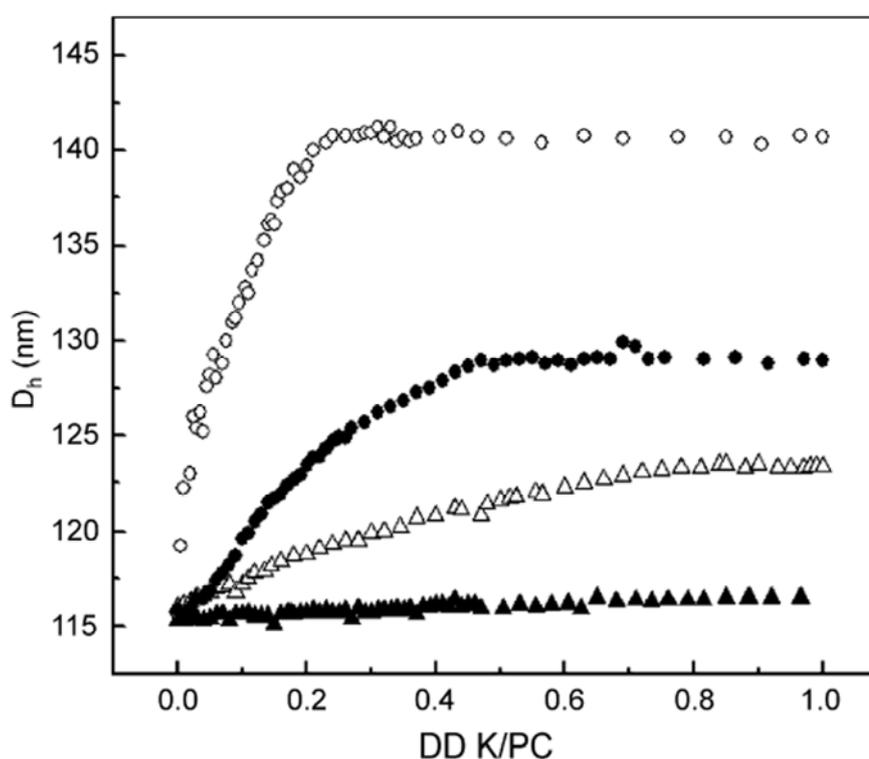


Figura 3.9 - Diâmetros hidrodinâmicos (D_h) de LUVs em função da razão molar DD K/PC. (○) PC-LUVs; (●) LUVs-Col 12% em mol; (△) LUVs-Col 29% em mol e (▲) LUVs-Col 43% em mol.

A maior interação de DD K com PC-LUVs e a incorporação de peptídeo na bicamada são demonstradas pelo aumento do D_h das LUVs de 115 para 141 nm (Figura 3.9). O valor máximo de D_h é obtido em uma razão molar DD K/LUVs de 0,2. Assim, o máximo de peptídeos ligados à membrana corresponde a uma molécula de DD K para cinco moléculas de fosfolípidos. Para as LUVs-Col contendo 12 ou 29 % em mol de colesterol, o D_h das vesículas aumentaram de 115 nm a 128 nm e de 115 nm a 122 nm, respectivamente e, nestes casos, é necessário uma quantidade maior de DD K

para se alcançar o patamar. Em LUVs-Col contendo 43 % em mol de colesterol, a variação do diâmetro hidrodinâmico de LUVs é pouco expressiva (Figura 3.9, p. 70), indicando que, nestas condições, DD K não se incorpora de forma significativa na bicamada lipídica. Estes dados estão de acordo com resultados de fluorescência, que mostraram que o anel indólico do resíduo de Trp-3 em LUVs-Col com concentração elevada de colesterol apresenta-se em ambiente polar, possivelmente no meio aquoso. Enquanto que em LUVs sem colesterol o anel indólico encontra-se inserido na bicamada lipídica (Verly *et al.*, 2007).

3.1.3 Estudos estruturais de DD K em meios biomiméticos

Para auxiliar na compreensão da atividade biológica e modo de interação com membranas, foi estudado o comportamento estrutural do peptídeo DD K na presença de membranas biomiméticas, micelas e meios orgânicos que mimetizam membrana biológica, empregando-se as espectroscopias de dicroísmo circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.1.3.1 Estudo das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular

Os espectros obtidos por dicroísmo circular (CD) que mostram as preferências conformacionais de DD K em diferentes meios biomiméticos estão apresentados na Figura 3.10 (p. 72), onde os respectivos conteúdos de hélice foram calculados por desconvolução conforme descrito no item 1.5 (p. 16). Na Figura 3.10A é possível verificar que, enquanto o espectro de CD de DD K em solução aquosa indica a predominância de conformação randômica (espectro em vermelho), a adição de micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) a $42 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DD K resulta no surgimento de mínimos intensos em $\lambda_{\text{máx}}$ 208 e 222 nm, indicando que o peptídeo adota estrutura α -hélice (espectros em azul e verde, Figura 3.10A). Em altas concentrações de detergente SDS, o conteúdo de hélice calculado é de aproximadamente 70%. O mesmo comportamento de DD K é observado quando a concentração de dodecilsulfocolina (DPC) é aumentada. A Figura 3.10B mostra um máximo de hélice em solução micelar 1 mmol.L^{-1} de DPC (espectro em preto), sendo o conteúdo de hélice de aproximadamente 80%. Quando investigado em meio isotrópico constituído por trifluoroetanol em água (TFE/H₂O), que mimetiza o meio hidrofóbico da membrana, o conteúdo de hélice aumenta com a concentração de TFE (Figura 3.10C), caracterizado

pelo aumento das intensidades dos mínimos em $\lambda_{\text{máx}}$ 208 e 222 nm. A desconvolução das curvas de DD K em solução de TFE revela um conteúdo de estruturação α -helicoidal próximo a 80% em concentrações superiores a 30% de TFE/H₂O v/v. Estes valores são maiores do que aqueles calculados para DD K em outras soluções alcoólicas como por exemplo 1-propanol, em que o peptídeo apresentou um conteúdo máximo de hélice de apenas 50% (Silva *et al.*, 2008).

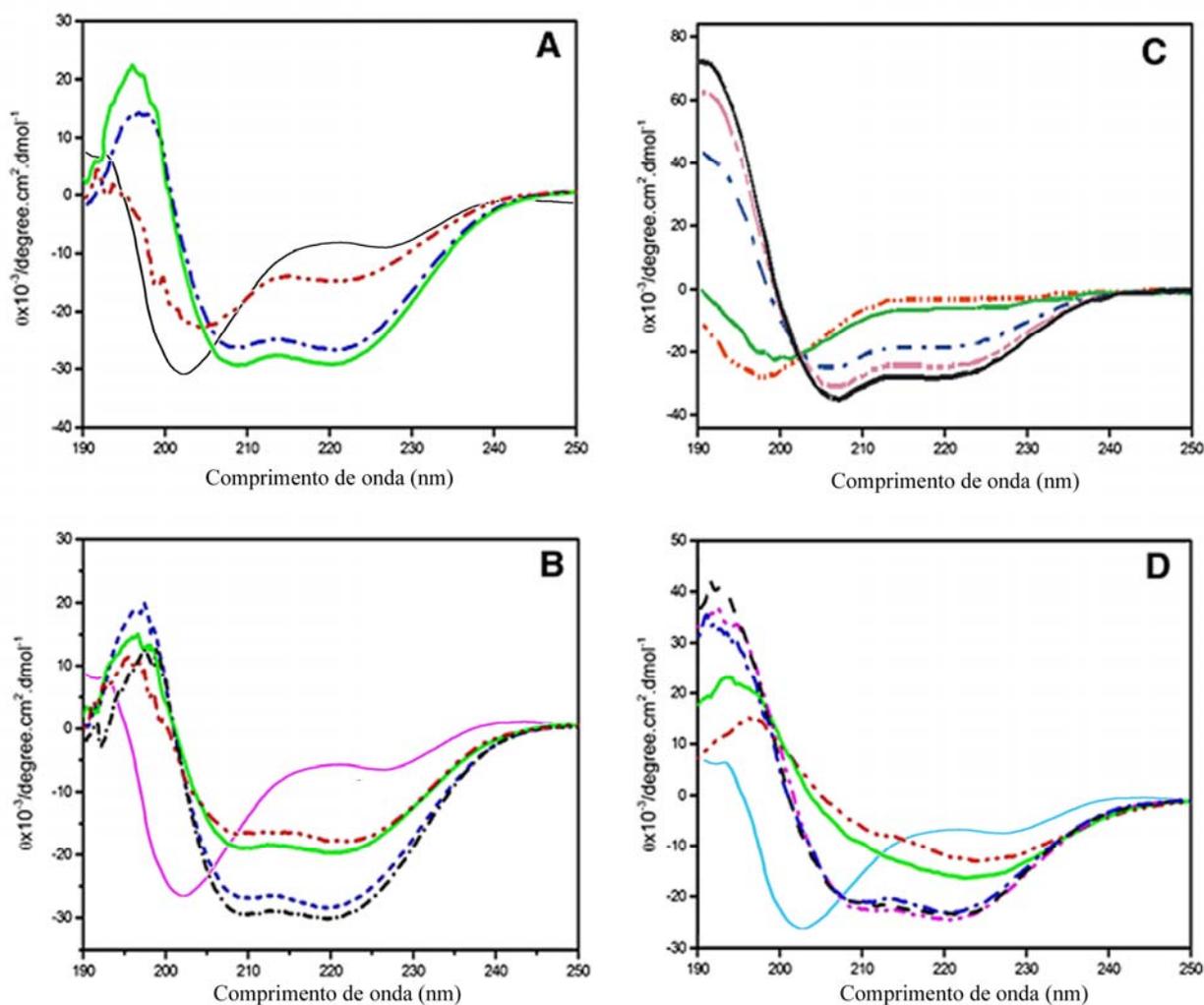


Figura 3.10 – Estudo das preferências conformacionais de DD K por CD. (A) Espectros de CD de 42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ DD K em 100 mmol.L^{-1} de NaCl, 20 mmol.L^{-1} tampão fosfato pH 7,0 (preto), após a adição de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SDS (vermelho), 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SDS (azul) e 1 mmol.L^{-1} de SDS (verde). (B) 42 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ DD K em 100 mmol.L^{-1} de NaCl, 20 mmol.L^{-1} tampão fosfato pH 7,0 (rosa), após adição de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DPC (vermelho), 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DPC (verde), 1 mmol.L^{-1} de DPC (azul) e 3 mmol.L^{-1} de DPC (preto). (C) Espectros de CD de 55 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DD K em 10% TFE/H₂O (vermelho), 20% TFE/H₂O (verde), 30% TFE/H₂O (azul) e 40% TFE/H₂O (rosa) e 60% TFE/H₂O (preto). (D) 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ DD K em 100 mmol.L^{-1} de NaCl, 20 mmol.L^{-1} tampão fosfato pH 7,0 (azul claro), após adição de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de LUVs-POPG (vermelho), 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de LUVs-POPG (verde), 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de LUVs-POPG (azul), 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de LUVs-POPG (preto) e 1 mmol.L^{-1} de LUVs-POPC (rosa).

Na presença de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) em forma de vesículas unilamelares pequenas SUVs ($\sim 50 \text{ nm}$) a DD K apresenta também um grau elevado de estruturação α -helicoidal (espectro azul, Figura 3.10D) com um conteúdo de hélice próximo a 75%. Em razões molares de peptídeo-catiônico e LUVs de POPG ou micelas de SDS, próximas a neutralização da carga do sistema, os espectros de CD exibem formatos das curvas distorcidas (espectro em verde na Figura 3.10A (p. 72) e espectro em preto na Figura 3.10D). A partir do experimento de titulação de DD K com SUVs de POPG (Figura 3.10D) foi possível estimar uma constante de partição de 10^5 L.mol^{-1} , indicando que a maior parte das moléculas de DD K encontra-se ligada às SUVs de POPG. Finalmente, na presença de 1 mmol.L^{-1} de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) em forma de LUVs (espectro em rosa Figura 3.10D) foi calculado um conteúdo de hélice de 52%. Entretanto, deve ser notado que as constantes de partição de peptídeos catiônicos lineares em vesículas zwitteriônicas são normalmente duas a três vezes menores (Vogt e Bechinger, 1999; Wieprecht *et al.*, 1999) e, assim, este valor baixo de conteúdo de hélice ocorre devido ao equilíbrio entre peptídeo associado à membrana e peptídeo livre em solução.

3.1.3.2 Determinação de estrutura 3D em micelas de DPC- d_{38} por RMN

Claramente, os resultados de CD mostram que o peptídeo DD K associado à LUVs adota um grau elevado de estruturação α -helicoidal na presença de ambas as vesículas preparadas. Como o meio micelar apresenta similaridade alta com o ambiente apolar de membranas (i.e. bicamadas de fosfolipídeos) e suas propriedades de interface e que estas micelas são disponíveis para determinação estrutural de peptídeos pequenos por RMN de alta resolução, foram realizados vários experimentos uni-dimensionais de ^1H para o peptídeo DD K em diferentes meios de micelas. A Figura 3.11 (p. 74) apresenta a região de deslocamento químico de hidrogênio de grupos amídicos e dos hidrogênios aromáticos nos espectros de RMN de ^1H em solução do peptídeo DD K na presença de 20 mmol.L^{-1} de solução tampão fosfato (A), 50% (em volume) de TFE- d_2 em H_2O (B), 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38} (C) e 400 mmol.L^{-1} de SDS- d_{25} (D).

Quando comparadas ao espectro em solução aquosa ou na presença de 50 % de TFE/ H_2O v/v, os sinais de ressonância de DD K em micelas de DPC- d_{38} e SDS- d_{25} apresentam-se consideravelmente alargados (Figura 3.11C e D), devido ao aumento em seu tempo de correlação rotacional, indicando que o peptídeo está associado a micelas.

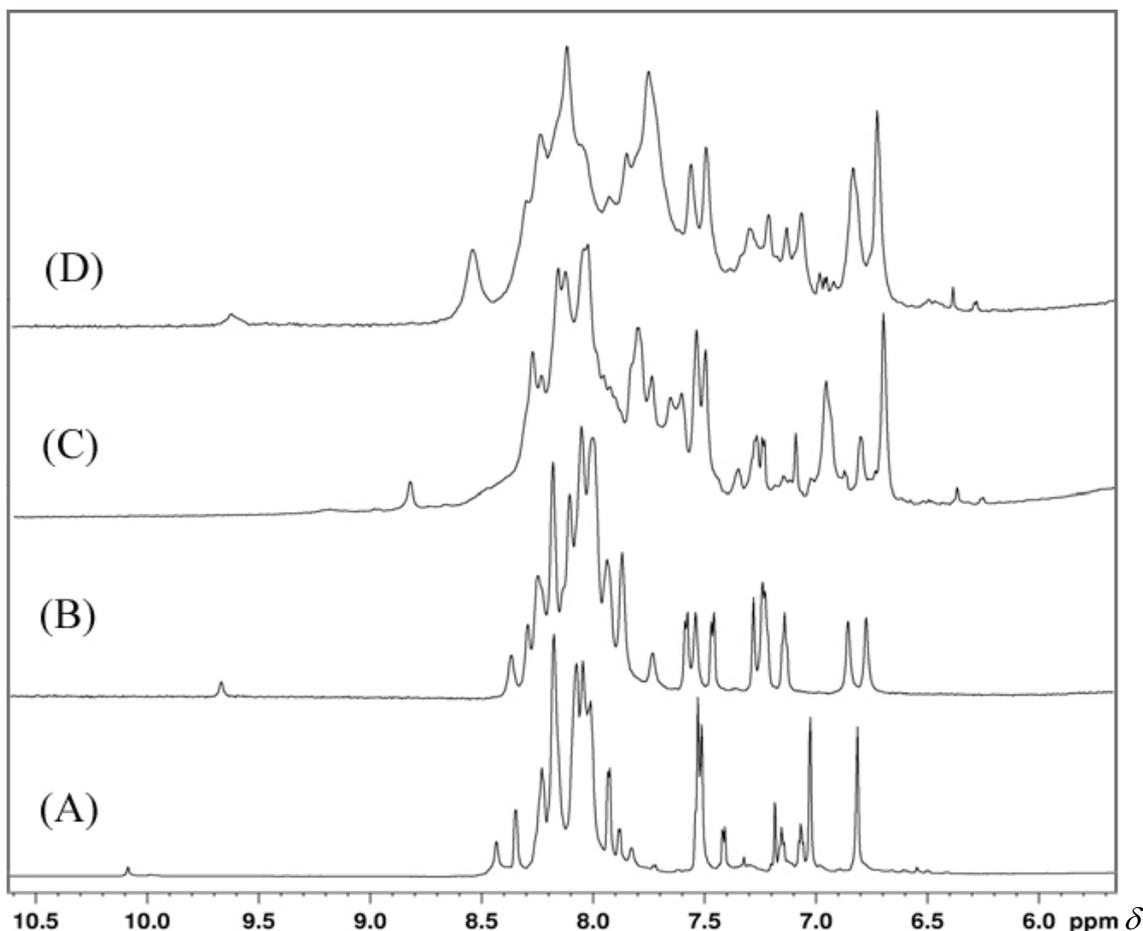


Figura 3.11 - Região de deslocamento químico de núcleos de ^1H amídicos e aromáticos de espectro unidimensional de RMN (800 MHz) de $800 \mu\text{mol.L}^{-1}$ DD K a 25°C . (A) 20 mmol.L^{-1} tampão fosfato pH 7,0; (B) 50% (em volume) de $\text{TFE-}d_2$ em H_2O ; (C) 400 mmol.L^{-1} $\text{DPC-}d_{38}$; (D) 400 mmol.L^{-1} $\text{SDS-}d_{25}$.

O comportamento de DD K em micelas de $\text{SDS-}d_{25}$ verificado por RMN de ^1H pode ser observado na Figura 3.12 (p. 75). Com o aumento da concentração de SDS de 30 mmol.L^{-1} (Figura 3.12C) para 400 mmol.L^{-1} (Figura 3.12F), os sinais de ressonância tornam-se mais finos, porém não o suficiente para a realização de experimentos bidimensionais (2D) com resolução adequada para determinação estrutural. Além disso, em concentrações baixas de $\text{SDS-}d_{25}$ (menores que 20 mmol.L^{-1}) são observados precipitados, provavelmente devidos à associação entre as espécies de cargas opostas, ou seja, a interação das cargas negativas do detergente com as cargas positivas do peptídeo catiônico DD K. Por outro lado, em 400 mmol.L^{-1} $\text{DPC-}d_{38}$ (Figura 3.11C), os sinais de ressonância de ^1H de DD K, apesar de apresentarem-se mais alargados em relação aos de DD K em 20 mmol.L^{-1} de tampão fosfato pH 7,0 (A) e 50% (em volume) de $\text{TFE-}d_2$ em H_2O (B), permitiram a obtenção de espectros 2D com resolução suficiente para estudos estruturais do peptídeo.

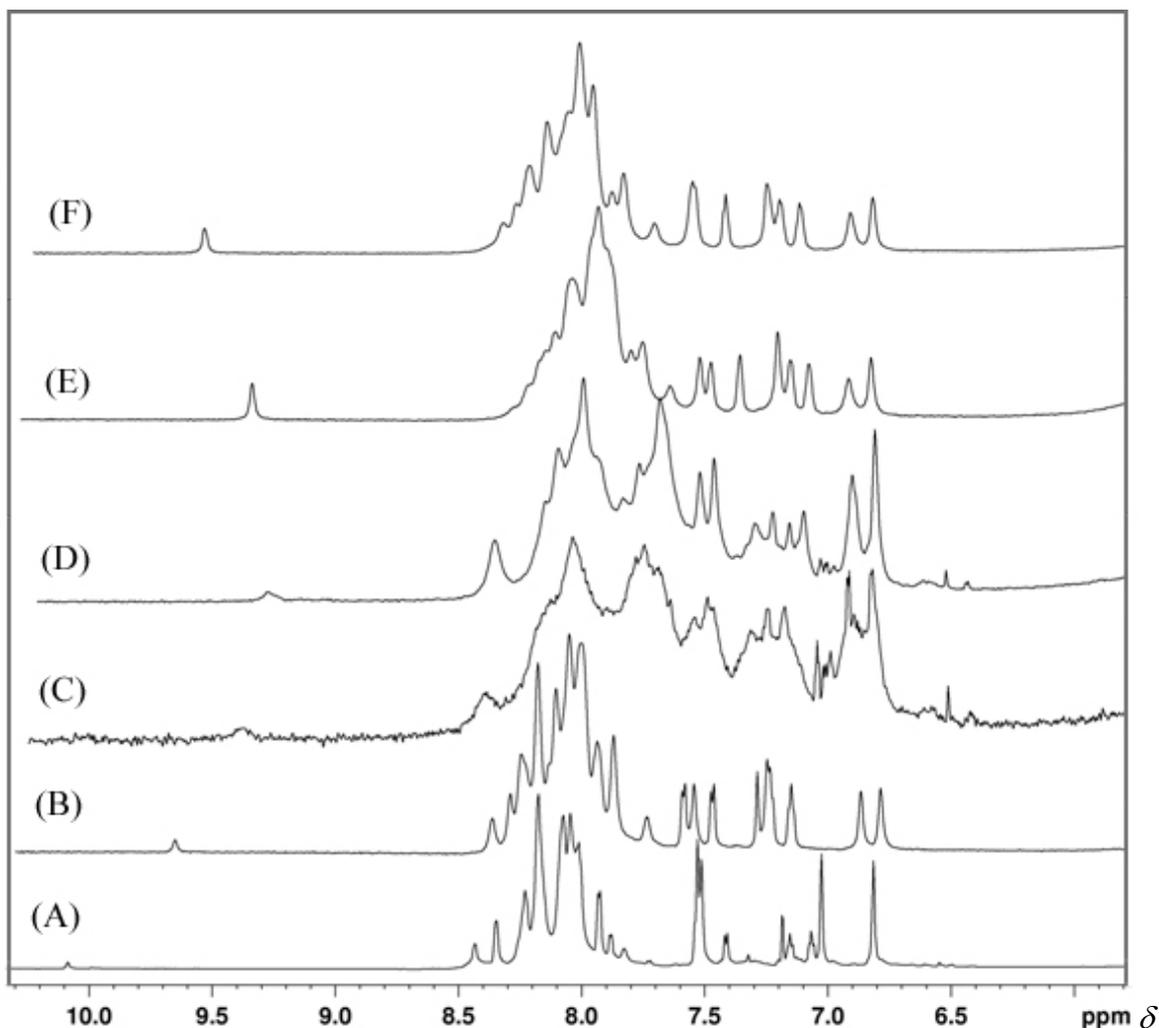


Figura 3.12 - Região de deslocamentos químicos de núcleos de ^1H amídicos e aromáticos de espectro de RMN ^1H (800 MHz) de 2 mmol.L^{-1} de DD K a 25°C . (A) 20 mmol.L^{-1} tampão fosfato pH 7,0; (B) 50% (em volume) de TFE- d_2 em H_2O ; (C) 30 mmol.L^{-1} SDS- d_{25} , (D) 60 mmol.L^{-1} SDS- d_{25} , (E) 100 mmol.L^{-1} SDS- d_{25} e (F) 400 mmol.L^{-1} SDS- d_{25} .

A estrutura de DD K foi estudada na presença de 400 mM de DPC, um detergente que forma micelas com interface muito similar àquela encontrada em bicamadas de fosfatidilcolina. A determinação de estrutura tri-dimensional por espectroscopia bidimensional de RMN em solução foi realizada empregando-se a metodologia de Wüthrich (Wüthrich, 1986), que tem sido comum para peptídeos pequenos, mostrando-se eficaz para uma atribuição completa das ressonâncias de ^1H , ^{13}C e ^{15}N . A Figura 3.13 (p. 76) mostra o mapa de contornos TOCSY parcial do peptídeo DD K em solução micelar de DPC- d_{38} .

GLWSKIKAAAGKEAAKAAAKAAGKAAALNAVSEAV-NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 33.NT

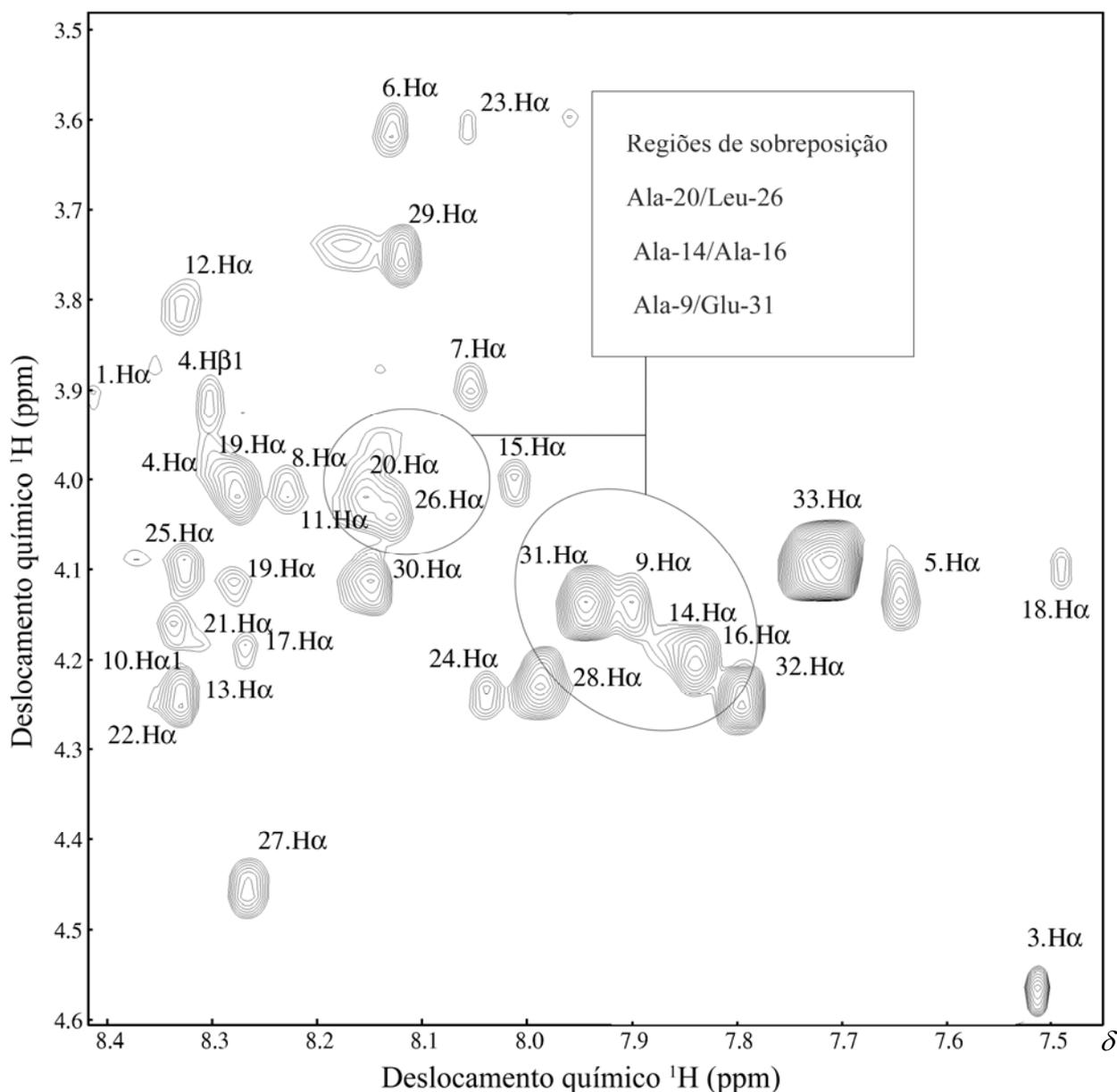


Figura 3.13 - Mapa de contornos TOCSY parcial de DD K em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈. Região de interação $d_{\alpha N}(i,i+n)$

A alta abundância de alguns resíduos na sequência peptídica de DD K, como a presença de treze resíduos de alanina e seis de lisina, tornou a atribuição mais difícil do que é normalmente esperado para peptídeos deste tamanho (Figura 3.13). Algumas sobreposições de correlações intra-residuais de H_α e hidrogênios amídicos (H_N), como Ala-20/Leu-26 e Ala-14/Ala-16 dificultaram também a atribuição completa do peptídeo.

As atribuições das ressonâncias de ¹H de acordo com a sequência peptídica de DD K na presença de micelas de DPC foram realizadas utilizando-se atribuições sequenciais entre H_N de resíduos de aminoácidos vizinhos na sequência peptídica

H_N destes resíduos ou, mesmo, devido à ausência de orientação preferencial da cadeia peptídica nestas regiões. Deve-se notar também na Figura 3.14 (p. 77) a presença de interações do tipo $d_{NN}(i,i+2)$ entre resíduos de Lys-7/Ala-9 e Lys-15/Ala-17, indicando torções nestas regiões da cadeia principal do peptídeo.

Na presença de micelas de DPC- d_{38} , muitas correlações de média distância de nOe foram observadas, sugerindo um arranjo estrutural efetivo de DD K. A Figura 3.15 apresenta um gráfico com o resumo dos nOes inter-residuais sequenciais e de médias distâncias observadas para a DD K na presença de micelas de DPC- d_{38} . Correlações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ são observadas a partir do sétimo resíduo (Lys-7) até a porção C-terminal, indicando que o peptídeo apresenta um arranjo helicoidal bem definido nesta região (Figura 3.15).

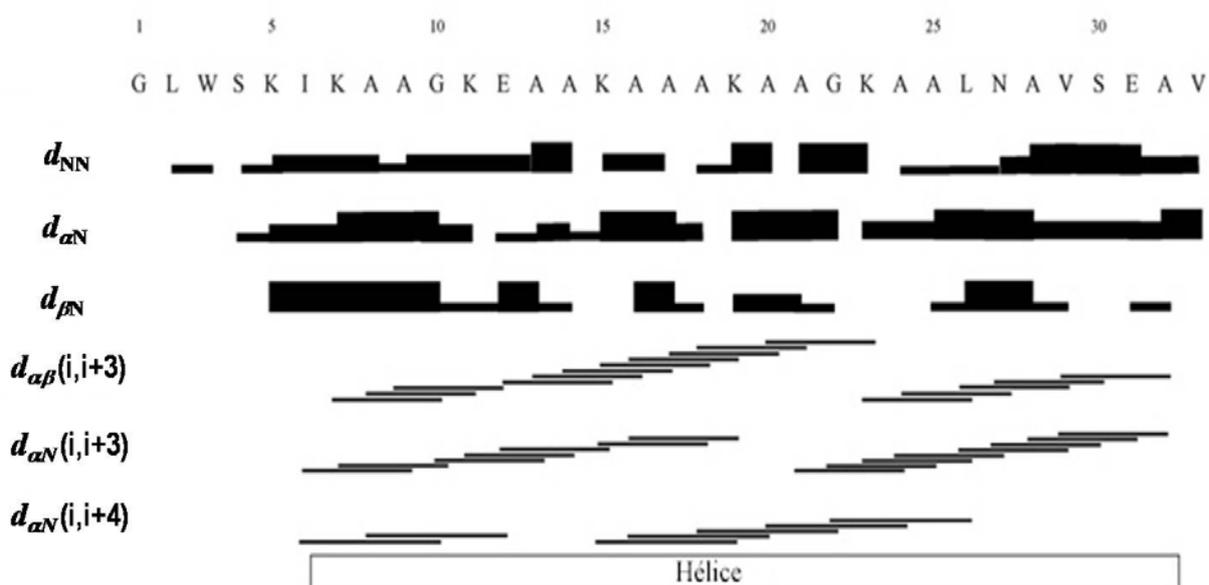


Figura 3.15 - Diagrama de conectividade de nOes para o peptídeo DD K (1 mmol^{-1}) em solução micelar de DPC (400 mmol^{-1}). As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ no diagrama estão diferenciadas como fortes, médias e fracas de acordo com a espessura das linhas. Várias interações de média distância $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ foram observadas e estão representadas por linha finas que unem os resíduos que interagem entre si. A extensão da hélice no peptídeo está indicada pelo retângulo situado na parte inferior dos quadros.

O mapa de contornos NOESY exibiu um número elevado de correlações de 1H envolvendo resíduos próximos à região C-terminal amidada. Esta é uma observação importante, uma vez que peptídeos catiônicos amidados exibem frequentemente um alto grau de estruturação (Resende *et al.*, 2008) e são mais ativos em ensaios biológicos quando comparados aos análogos não amidados (Ali *et al.*, 2001; Katayama *et al.*,

2002). Esta maior estruturação na região C-terminal de peptídeos amidados pode estar relacionada com a ausência da carga negativa do carboxilato devida à amidação e que, conseqüentemente, estabiliza o dipolo da hélice nesta região. Algumas correlações inter-residuais envolvendo os resíduos Trp-3 e Ser-4 indicam que esta porção do peptídeo apresenta alguma estruturação ordenada, embora em menor extensão do que a região C-terminal.

A Tabela 3.5 (p. 80) mostra os deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H e ^{13}C obtidos para DD K em micelas de DPC. Com exceção do resíduo de Gly-1, foi possível identificar o deslocamento químico de grande parte dos núcleos de ^1H e ^{13}C de DD K em micelas de DPC. Estes valores apresentaram-se compatíveis com aqueles esperados para núcleos de aminoácidos em estruturas helicoidais.

Após a atribuição completa dos sinais de RMN de DD K, as correlações de nOes foram convertidas em distâncias semi-quantitativas e, a partir dos dados de deslocamentos químicos de C_α , C_β e H_α e H_β , foram calculados valores de ângulos diedros da cadeia principal do peptídeo. Estes dados, chamados de restrições estruturais, somaram um total de 345 incluindo restrições de distâncias e de ângulos diedros. Devido ao fato da determinação estrutural de peptídeos e proteínas por RMN depender desta rede de restrições geométricas, existe uma tendência em considerar que quanto maior for o número de restrições utilizadas, melhor seria a qualidade do modelo construído. Entretanto, em um estudo feito com cinco estruturas de proteínas depositadas no PDB (Nabuurs *et al.*, 2003), observou-se que cerca de 30% das restrições de distância desses peptídeos são do tipo intra-residual, um valor próximo à das restrições de longa distância (restrição entre átomos de hidrogênio separados entre si por mais de quatro resíduos na sequência polipeptídica). Por outro lado, enquanto o conjunto de restrições de longa distância é responsável por cerca de 30% das informações estruturais, o conjunto das distâncias intra-residuais contém no máximo 0,4% dessa informação. O conjunto de restrições de ligação de hidrogênio, que constituía, no máximo, 7,5% de todas as restrições, foi responsável por cerca de 30% da informação estrutural do modelo.

Tabela 3.5- Deslocamentos químicos (em ppm) de RMN de ^1H e de ^{13}C para o peptídeo DD K em solução micelar 400 mM DPC- d_{38} , 25 °C (800 MHz)

Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)				
	δ_{NH}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$	δ_{Outros}	$\delta_{\text{C}\alpha}$
Gly 1	-	3,97-	-	-	45,3
Leu 2	8,21	3,75	1,75	$\gamma\text{-CH}_3=1,42$ $\delta\text{-CH}_2=0,94$	56,0
Trp 3	7,98	4,54	3,37	$\epsilon\text{-CH}_2=9,91$; $\zeta\text{-CH}_2=7,26;7,49$	60,2
Ser 4	8,12	4,12	3,94	-	57,5
Lys 5	7,82	4,14	1,49	$\gamma\text{-CH}_2=1,44;1,49$ $\delta\text{-CH}_2=1,70$ $\epsilon\text{-CH}_2=2,97$	54,2
Ile 6	8,07	3,77	1,98	$\gamma\text{-CH}_2=1,17$; $\delta_1\text{-CH}_3=0,82$; $\delta_2\text{-CH}_3=0,94$	65,9
Lys 7	8,07	3,77	1,96	$\gamma\text{-CH}_2=1,44; 1,49$; $\delta\text{-CH}_2=1,71$; $\epsilon\text{-CH}_2=2,97$	59,9
Ala 8	7,89	4,15	1,56	-	59,9
Ala 9	8,17	4,17	1,55	-	59,7
Gly 10	8,45	3,92	-	-	47,2
Lys 11	8,06	4,42	1,97	$\gamma\text{-CH}_2=1,58;1,69$; $\delta\text{-CH}_2=1,83$ $\epsilon\text{-CH}_2=2,96$	57,4
Glu 12	7,96	3,72	2,38	$\gamma\text{-CH}_3=0,96; 1,10$	65,8
Ala 13	8,31	4,19	1,52	-	56,4
Ala 14	8,11	4,15	1,49	-	56,3
Lys 15	8,10	4,02	1,95	$\gamma\text{-CH}_2=1,45$; $\delta\text{-CH}_2=2,01;1,95$ $\epsilon\text{-CH}_2=2,94$	60,9
Ala 16	8,17	4,12	1,52	-	56,2
Ala 17				-	-
Ala 18				-	-
Lys 19	8,25	4,07	1,92	$\gamma\text{-CH}_2=1,49$; $\delta\text{-CH}_2=1,92$; $\epsilon\text{-CH}_2=2,96$	
Ala 20	8,11	4,47	1,57	-	59,5
Ala 21	8,12	4,12	1,61	-	61,4
Gly 22	8,24	3,90	-	-	47,0
Lys 23	7,98	4,10	1,96	$\gamma\text{-CH}_2=1,48$; $\delta\text{-CH}_2=2,02$; $\epsilon\text{-CH}_2=2,96$	58,6
Ala 24	8,12	4,18	1,54	-	62,0
Ala 25	8,10	4,10	1,61	-	60,5
Leu 26	8,05	4,16	1,69	$\gamma\text{-CH}_3=1,81$; $\delta\text{-CH}_2=0,92$	56,8
Asn 27	8,36	4,44	2,89	$\delta\text{-CONH}_2=6,77; 7,51$	57,3
Ala 28	8,02	4,21	1,59	-	56,7
Val 29	8,26	3,79	2,22	$\gamma\text{-CH}_3=1,09; 0,97$	66,4
Ser 30	8,17	4,18	3,98	-	56,5
Glu 31	7,99	4,15	2,12	$\gamma\text{-CH}_2=0,96; 1,10$	56,9
Ala 32	7,89	4,26	1,56	-	54,9
Val 33	8,00	4,08	2,23	$\gamma\text{-CH}_3=1,09; 1,09$	56,9

Essa variação entre a contribuição de diferentes tipos de restrição no conjunto final de estruturas deve-se principalmente ao fato de as estruturas que servem de entrada para o cálculo já serem previamente parametrizadas, com valores fixos de comprimento de ligação, hibridização e relações angulares ótimas já definidas. Ou seja, grande parte das informações estruturais de curta distância já está definida antes mesmo de o cálculo ter início. Essas restrições, que contêm pouca informação estrutural, são denominadas restrições redundantes.

Assim como existem restrições que contêm pouca ou nenhuma informação a respeito da estrutura, existem aquelas que são responsáveis pela maior parte da estrutura terciária da macromolécula. Essas restrições são denominadas de restrições inconsistentes e devem ser examinadas cuidadosamente, uma vez que elas podem ser resultado de atribuição incorreta ou podem simplesmente ser a única restrição encontrada para certo elemento estrutural, o que pode ser comum para peptídeos pequenos.

Dessa forma, ao final das atribuições das estruturas analisadas por RMN, foram construídas listas contendo as restrições dos tipos intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD), as quais foram analisadas previamente pelo programa QUEEN, para a determinação do conteúdo de unicidade de informação (I_{uni}) e a informação média (I_{med}) do conjunto de restrições de RMN de DD K em DPC- d_{38} (item 2.16, p. 55). A Tabela 3.6 mostra o número de restrições para este conjunto de dados de DD K em micelas de DPC- d_{38} , classificadas em restrições dos tipos acima relacionados.

Tabela 3.6 - Número de restrições totais R(T), restrições intrarresiduais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN

Peptídeo/Meio	Nº de R(T)	Nº de R(IR)	Nº de R(SQ)	Nº de R(MR)	Nº de R(LR)	Nº de R(AD)
DD K/DPC	392	177	96	82	0	37

Os resultados desta análise podem ser observados na Figura 3.16 (p. 82) e mostram que, dentre todas as restrições, somente algumas apresentaram valores atípicos, com limites superiores de distância de 5,0 Å. Estas restrições estão apresentadas na Tabela 3.7 (p. 83) e são classificadas como R₁, R₂, R₃, R₄ e R₅. Essas

são restrições que apresentaram valores elevados de I_{uni} (maiores que 1) ou I_{med} , como pode ser observado na Figura 3.16.

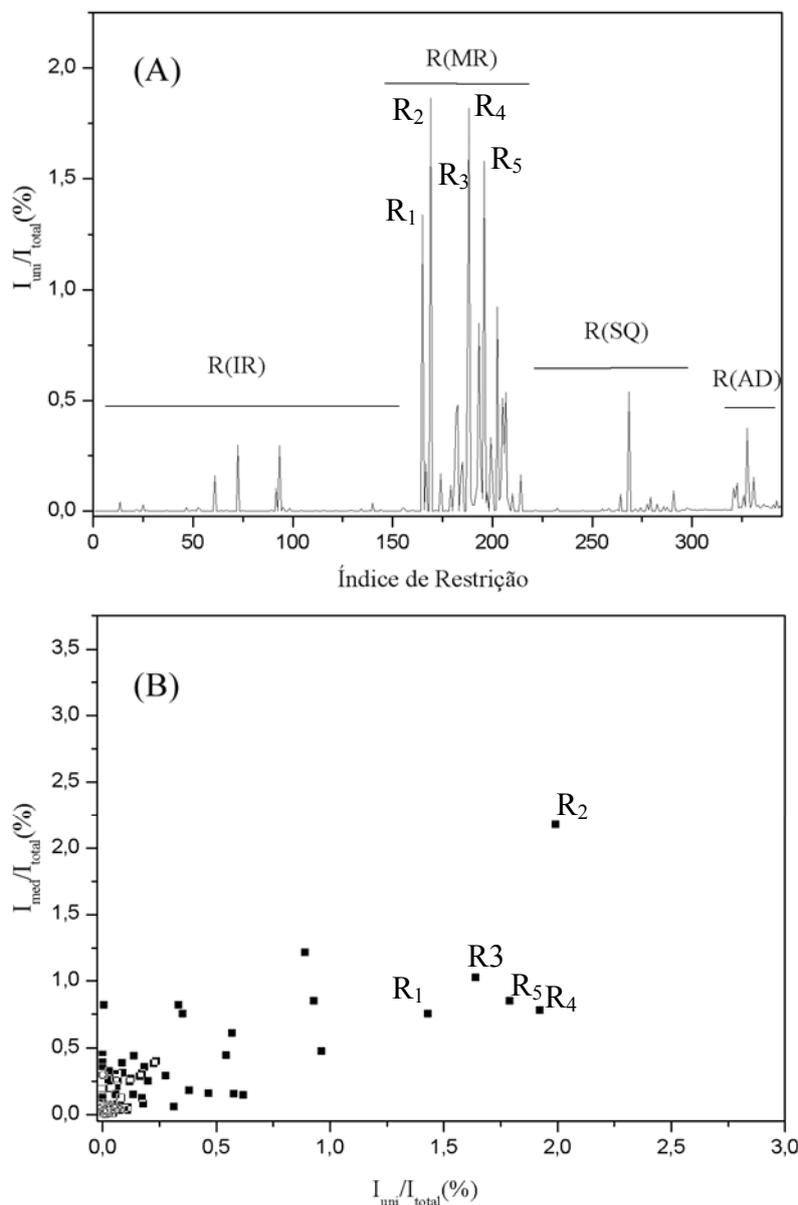


Figura 3.16 - Análise das restrições de distâncias e ângulos diedros obtidas por RMN (800 MHz) de DD K em solução micelar 400 mmolL⁻¹ DPC. (A) Gráfico de unicidade (I_{uni}) pelo índice de cada restrição e (B) gráfico de informação média (I_{med}) por informação única (I_{uni}). R(IR) - restrições intra-residuais; R(SQ) - restrições sequenciais; R(MR) – restrições de média distância; R(AD) - restrições de ângulos diedros.

Essas duas grandezas são utilizadas para identificar possíveis restrições incorretas ou pouco suportadas pelo conjunto total de restrições (Nabuurs *et al.*, 2005) e devem, sempre que possível, ser analisadas conjuntamente, uma vez que a unicidade permite identificar restrições inconsistentes ou que simplesmente constituem a única

fonte de informação para uma característica estrutural. No entanto, se duas restrições contêm na mesma proporção um alto grau de informação, mas são mutuamente coerentes (e.g. duas restrições do tipo $H\alpha$ -HN ($i, i+4$) e HN- $H\alpha$ ($i, i-4$)), o cálculo de unicidade não será capaz de identificá-las como restrições de alta informação, mesmo que sejam as únicas restrições em uma determinada estrutura. Dessa forma, estas restrições contêm alto grau de informação e não serão identificadas como tal pelo cálculo de unicidade, por serem mutuamente coerentes. Para se identificar este tipo de restrição pode-se recorrer ao parâmetro de informação média (I_{med}). Este parâmetro, apesar de isoladamente não promover uma distinção fácil de restrições inconsistentes, é capaz de identificar o impacto das restrições sobre a estrutura, mesmo se estas constituírem um conjunto consistente entre si.

O valor elevado de I_{uni} das restrições R_1 , R_3 , R_4 e R_5 está relacionado com interferências de DPC- d_{38} na análise do mapa de contornos NOESY que não permitiram uma atribuição em ambos os lados da diagonal para as correlações de $6.H\alpha$ -10.HN, $20.H\alpha$ -24.HN, $19.H\alpha$ -22. $H_{\beta 1}$ e $15.H\alpha$ -19.HN. Por outro lado, estas mesmas restrições apresentaram um baixo valor de I_{med} , indicando que não apresentam forte impacto sobre as estruturas calculadas, pois são reforçadas por outras restrições próximas a estas regiões.

Tabela 3.7- Relação das restrições que apresentaram valores elevados de informação única (I_{uni}) ou média (I_{med})

R (tipo de restrição)	Correlação
R_1	$6.H\alpha - 10.HN$
R_2	$3.H\alpha - 6.H_{\beta 1}$
R_3	$20.H\alpha - 24.HN$
R_4	$19.H\alpha - 22.H_{\beta 1}$
R_5	$15.H\alpha - 19.HN$

A restrição R_2 foi a única a apresentar além de um valor elevado de I_{uni} , também um alto valor de I_{med} . Este grau elevado de informação pode estar relacionado com sinais devidos a artefatos do experimento de NOESY, já que a correlação entre $3.H\alpha$ - $6.H_{\beta 1}$ foi encontrada somente em um dos lados da diagonal, além de não terem sido observadas outras interações características de hélice no intervalo de Trp-3 a Ile-6 (Figura 3.15, p. 78) que pudessem contribuir com a informação de R_2 . Dessa forma, R_2 foi descartada do conjunto de restrições e, após sua exclusão, 391 restrições de distância e de ângulos diedros derivados de correlações de nOes e deslocamentos químicos,

respectivamente, foram empregados em cálculos de dinâmica molecular para determinação de estruturas tridimensionais de DD K em micelas de DPC- d_{38} . As estruturas de menores energias foram sobrepostas e estão mostradas na Figura 3.17 B. Um segmento de hélice bem definida é observado do resíduo de Lys-7 até a região C-terminal, incluindo as amidas terminais que contribuíram para a estruturação desta região. Outra região de estrutura definida pode ser observada nos resíduos de Lys-5 e Ile-6 e que orientam a região N-terminal para baixo na Figura 3.17B e D. É importante notar também que o peptídeo apresenta um alto grau de anfipaticidade, com os resíduos de cadeias laterais hidrofóbicas (representados em azul) em face oposta aos resíduos de cadeias laterais hidrofílicas (representados em verde) podendo constituir uma característica fundamental para a interação do peptídeo com a bicamada lipídica.

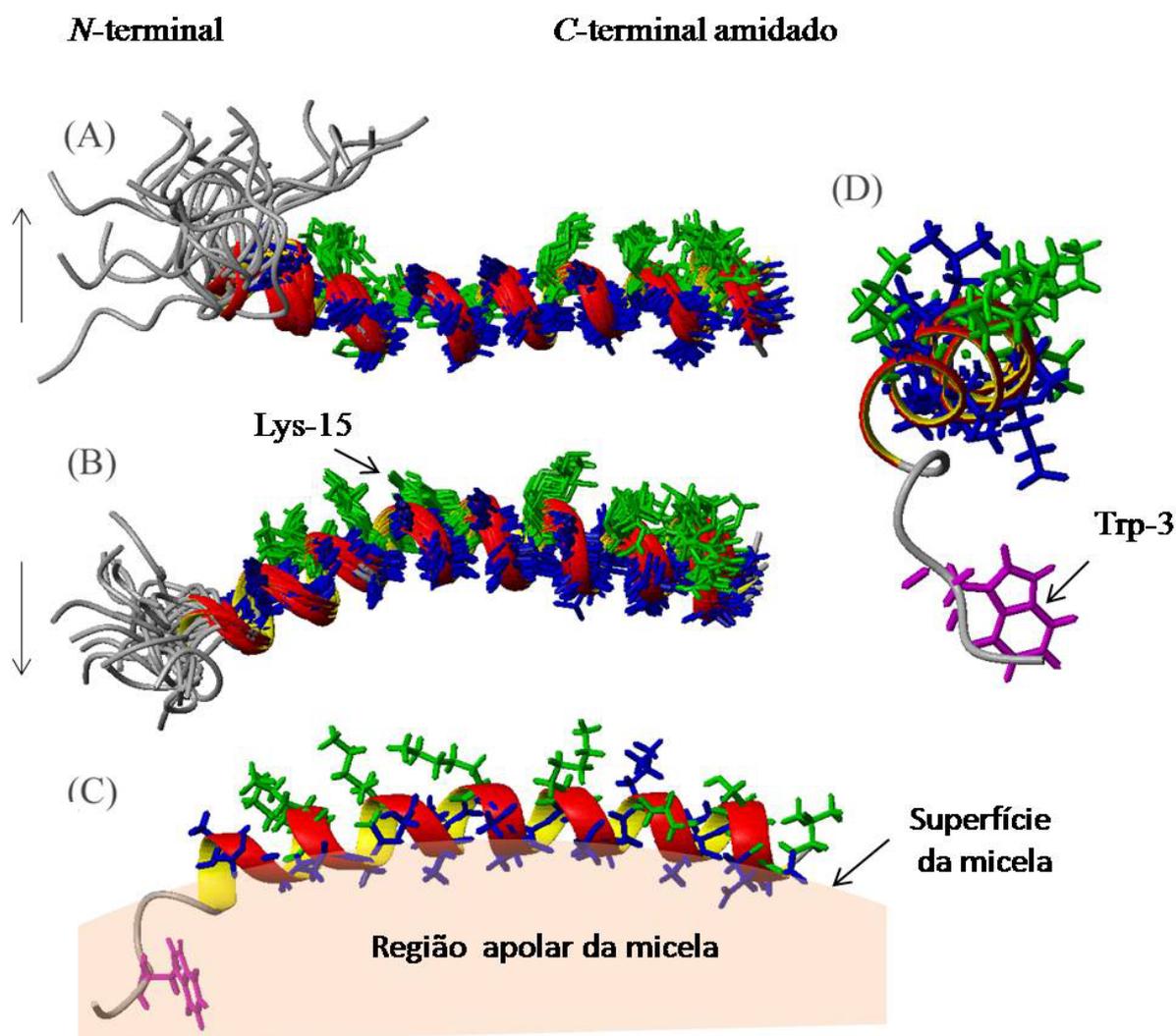


Figura 3.17 - Estruturas de RMN em solução de 1 mmol.L^{-1} de DD K diferentes meios. (A) TFE/água 50:50 v/v (Verly, 2006) e (B-D) em solução micelar de 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} em água. (A e B) Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis em cada meio. (C e D) Estrutura mais estável vista lateralmente e ao longo do eixo da hélice, respectivamente. As cadeias laterais hidrofóbicas estão representadas em azul, as hidrofílicas em verde e a cadeia lateral de Trp-3 em rosa.

Análises estruturais realizadas por RMN anteriormente para o peptídeo DD K em mistura isotrópica de solventes que mimetizam a polaridade de membranas (TFE/H₂O 1:1 v/v) mostraram também uma grande extensão de hélice (Figura 3.17A, p. 84), iniciando-se no resíduo de Ser-5 até a extremidade C-terminal do peptídeo (Verly, 2006). Embora as porcentagens de helicidade calculadas pelos dados de CD (p.71 e 72) sejam similares em ambos os meios (micela de DPC-*d*₃₈ e solução de TFE), uma comparação mais detalhada das duas estruturas obtidas por RMN mostra diferenças importantes. Nas representações mostradas na Figura 3.17A e B, enquanto a face hidrofóbica está direcionada à frente das hélices de ambas as estruturas, as extremidades N-terminais das estruturas de DD K em solução de TFE/H₂O e em micelas de DPC-*d*₃₈ (ver setas laterais na Figura 3.17, p. 84) estão direcionadas em sentidos opostos. Além disso, uma dobra sutil na hélice pode ser observada no resíduo de Lys-15 para DD K em solução micelar de DPC-*d*₃₈ (Figura 3.17B, p. 84). Dessa forma, é possível que tais diferenças nas estruturas ocorram devido à curvatura imposta pelo sistema micelar e, portanto, a DD K deve encontrar-se posicionada paralelamente à superfície da micela. Assim, pode-se inferir que no meio biológico verifica-se interação similar com a bicamada lipídica. Por outro lado, esta interação paralela foi confirmada por estudos de RMN em fase sólida em POPC (Verly *et al.*, 2009). Assim sendo, segundo a estrutura apresentada na Figura 3.17C a dobra na cadeia peptídica que ocorre no resíduo de Lys-15 direciona o anel indólico do Trp-3 para a região de interface das micelas de DPC-*d*₃₈. Essa conformação está de acordo com resultados de fluorescência de Trp (Verly *et al.*, 2007), os quais mostram que o anel indólico de Trp-3 encontra-se inserido parcialmente na bicamada de PC-LUVs, como apresentado na Figura 3.17C. Finalmente, estas especificidades da conformação verificadas na análise estrutural de DD K por RMN mostram que os meios biomiméticos utilizados neste trabalho são adequados para revelar a interação do peptídeo em bicamadas lipídicas.

As estruturas mais estáveis de DD K em micelas de DPC-*d*₃₈ foram submetidas à análise estatística, cujos resultados estão resumidos na Tabela 3.8 (p. 86). Os valores de RMSD obtidos para o conjunto de todos os resíduos sugerem uma considerável flexibilidade conformacional (1,55 Å). Entretanto, este valor diminui significativamente quando apenas o segmento helicoidal é considerado (0,69 Å).

O gráfico de Ramachandran apresentado na Figura 3.18 (p. 86) mostra que a maioria dos resíduos encontra-se em regiões favorecidas ou permitidas, indicando uma boa qualidade das estruturas calculadas. Os poucos resíduos observados em regiões não permitidas são aqueles localizados próximos a extremidade N-terminal (Trp-3, Ser-4 e

Lys-5), sendo a parte não estruturada do peptídeo em α -hélice, porém com pouca flexibilidade devido a inserção parcial do resíduo de Trp-3 nas micelas de DPC- d_{38} .

Tabela 3.8- Dados de cálculos estruturais de DD K em micelas de DPC- d_{38}

RMSD – Todos os resíduos ^a		
Cadeia principal		1,55 Å
Cadeia principal e átomos pesados		1,98 Å
RMSD – Seguimento helicoidal ^{a, b}		
Cadeia principal		0,69 Å
Cadeia principal e átomos pesados		0,94 Å
Análise gráfica por Ramachandran		
Resíduos em região favorecidas		74,8%
Resíduos em regiões permitidas		22,8%
Resíduos em regiões menos permitidas		2,4%
Resíduos em regiões não permitidas		0%

a-Dados do programa MOLMOL; b- Dados de Ile-6 a Val-33

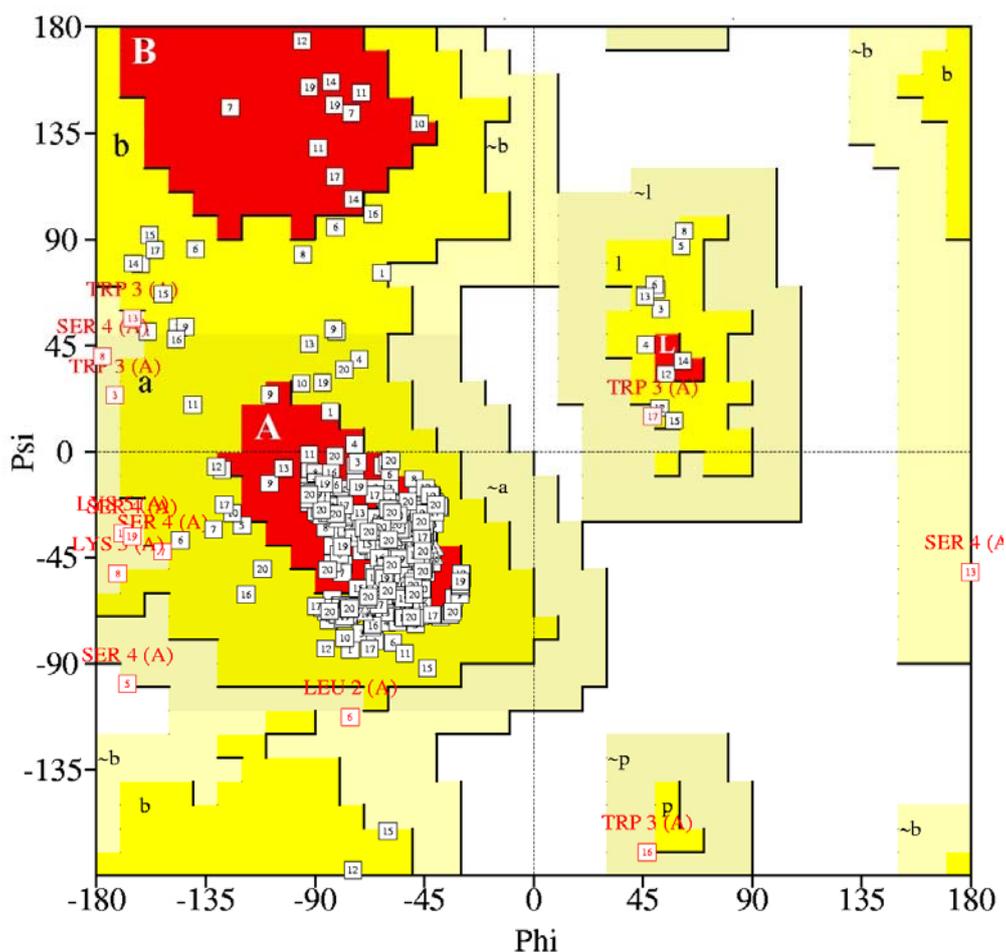


Figura 3.18 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de DD K em micelas de DPC- d_{38} . As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões em amarelo escuro indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em amarelo claro indica estruturas pouco flexíveis.

3.2 Peptídeo antimicrobiano homotarsinina

Neste item serão apresentados os estudos estruturais, termodinâmicos e biológicos comparativos entre o peptídeo antimicrobiano homotarsinina (HMT-2) e sua cadeia monomérica (HMT-1). Esta última é composta por 24 resíduos de aminoácidos e possui o grupo *C*-terminal amidado. O peptídeo dimérico homotarsinina (HMT-2) possui 48 resíduos de aminoácidos, pois é formado pela ligação dissulfeto entre os resíduos de Cys de duas cadeias monoméricas de HMT-1. As estruturas primárias desses peptídeos estão apresentadas na Tabela 3.9:

Tabela 3.9 - Sequência primária dos peptídeos HMT-1 e HMT-2

Peptídeo	Sequência
HMT-1	NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂
HMT-2	NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂ NLVSD IIGSK KHMEK LISII KKCR-NH ₂

NH₂ representa a amidação do grupamento *C*-terminal

3.2.1 Síntese, Caracterização e Purificação

A síntese do peptídeo antimicrobiano homotarsinina foi realizada em duas etapas distintas. Primeiramente, foi sintetizada a cadeia monomérica manualmente pela SPFS, segundo a estratégia Fmoc. Em seguida, foi realizada uma dimerização de HMT-1 através de formação de ligação de dissulfeto entre resíduos de Cys de duas cadeias monoméricas. A seguir serão apresentados os resultados da obtenção de HMT-1 e HMT-2.

3.2.1.1 Cadeia monomérica HMT-1

O acompanhamento da síntese de HMT-1 após cada adição de um novo resíduo de aminoácido foi realizado de modo análogo ao descrito para a síntese de DD K discutido anteriormente (p. 57). A Tabela 3.10 (p. 88) apresenta o acompanhamento da síntese em todos os seus acoplamentos.

Tabela 3.10 - Dados do acompanhamento da síntese de HMT-1

Ordem de acoplamento	Derivado Aminoácido	Excesso a.a.	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	4	4,0	-	+
2°	Fmoc-Cys(Trt)-OH	3	1,5	-	+
3°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	1,5	-	+
4°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	1,5	-	+
5°	Fmoc-Ile-OH	3	1,5	-	+
6°	Fmoc-Ile-OH	3	1,5	-	+
7°	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	3	1,5	-	+
8°	Fmoc-Ile-OH	3	1,5	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	-	* +
10°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	1,5	-	+
11°	Fmoc-Glu(<i>Ot</i> -Bu)-OH	3	1,5	+	~
	#Fmoc-Glu(<i>Ot</i> -Bu)-OH	4	2,0	+	~
	#Fmoc-Glu(<i>Ot</i> -Bu)-OH	5	2,0	-	+
12°	Fmoc-Met-OH	4	2,0	-	+
13°	Fmoc-His(Trt)-OH	4	2,0	-	+
14°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2,0	-	+
15°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2,0	-	* +
16°	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	5	2,0	+	~
	#Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	5	2,5	-	+
17°	Fmoc-Gly-OH	5	2,5	-	+
18°	Fmoc-Ile-OH	5	2,5	-	+
19°	Fmoc-Ile-OH	5	2,5	+	~
	#Fmoc-Ile-OH	5	2,5	-	+
20°	Fmoc-Asp(<i>Ot</i> -Bu)-OH	5	2,5	-	+
21°	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)-OH	5	3,0	-	+
22°	Fmoc-Val-OH	5	3,0	-	* +
23°	Fmoc-Leu-OH	5	3,0	+	~
	#Fmoc-Leu-OH	5	3,0	-	+
24°	Fmoc-Asn(Trt)-OH	5	3,0	-	+

Etapas de reacoplamento * Repetição do testes de *Kaiser* para confirmação.
+ Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre. - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre. ~ Teste não realizado.

As etapas de acoplamento de derivados de aminoácidos como Fmoc-Glu(*Ot*-Bu)-OH (11° acoplamento), Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (16° acoplamento), foram submetidas a reacoplamentos, com aumento de excesso de derivado de aminoácido e do tempo de reação, alcançando-se um rendimento de acoplamento próximo a 100%. Os derivados de aminoácidos Fmoc-Ile-OH (19° acoplamento) e Fmoc-Leu-OH (23° acoplamento)

também foram submetidos a reacoplamentos porém mantendo-se as condições de acoplamento.

Ao final da síntese, após a etapa de clivagem, a amostra foi submetida à análise cromatográfica e por espectrometria de massas para confirmação da presença do produto desejável e avaliação do seu grau de pureza. A Figura 3.19 apresenta o perfil cromatográfico analítico de fase reversa do produto bruto da síntese de HMT-1. Foram coletadas as frações mais abundantes da amostra com tempos de retenção (t_r) de 25,1, 28,0, 28,8, 31,7 e 37,1 min, que foram analisadas por EM-MALDI-ToF. Das frações coletadas por cromatografia de fase reversa, aquela com tempo de retenção de 31,7 min correspondeu ao peptídeo HMT-1, segundo as análises por espectrometria de massas. Calculando-se as áreas sob os picos no cromatograma da Figura 3.19, foi possível determinar o rendimento de aproximadamente 80% para a síntese da cadeia monomérica.

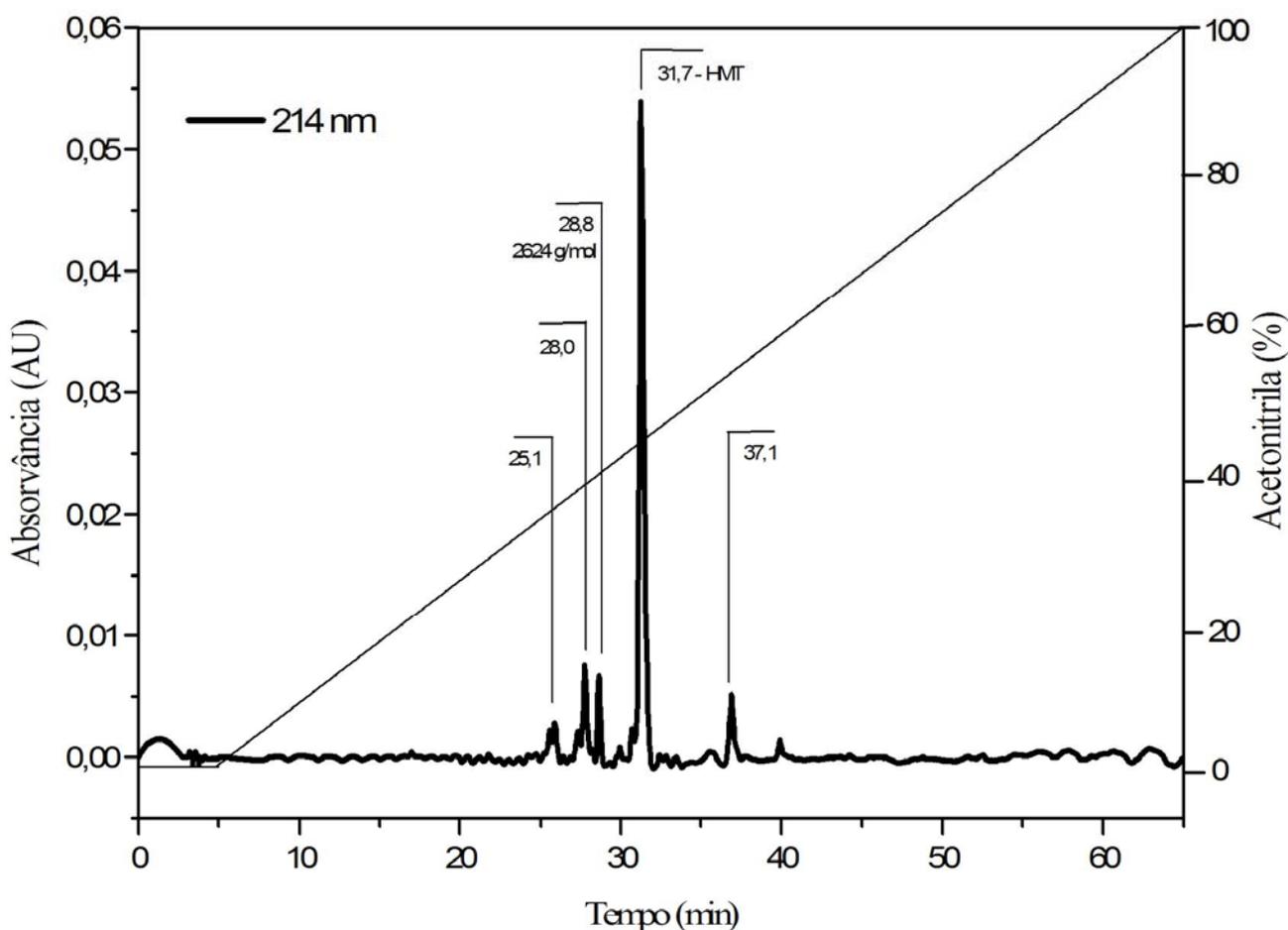


Figura 3.19 - Perfil de cromatografia de fase reversa do peptídeo HMT-1. Amostra injetada (25 μ L) em coluna C₁₈ *Ydac* 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

A Figura 3.20 apresenta o espectro de massas (EM-MALDI-ToF) da amostra não purificada da síntese. Neste espectro é possível verificar o pico devido ao íon $[M+H]^+$ de m/z 2752,4 correspondendo ao peptídeo HMT-1 protonado, além de análogos com massas inferiores, os quais estão listados na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 - Peptídeos identificados por MALDI-ToF

Peptídeo	$[M + H]^+$	Resíduo ausente (fórmula molecular)
HMT-1	2752,4	-
Análogo 1	2624,2	Lys ($C_6H_{12}N_2O$)
Análogo 2	2495,8	2 x Lys ($C_6H_{12}N_2O$)
Análogo 3	2487,2	His ($C_6H_7N_2O$) + Lys ($C_6H_{12}N_2O$)
Análogo 4	2409,5	Ser ($C_3H_5NO_2$) + 2Lys ($C_6H_7N_2O$)

Estes análogos não contêm alguns dos resíduos de aminoácidos da sequência peptídica de HMT-1, o que indica falhas em determinadas etapas de acoplamento. O sequenciamento dos análogos não se fez necessário, uma vez que os subprodutos da síntese não foram de interesse do presente estudo.

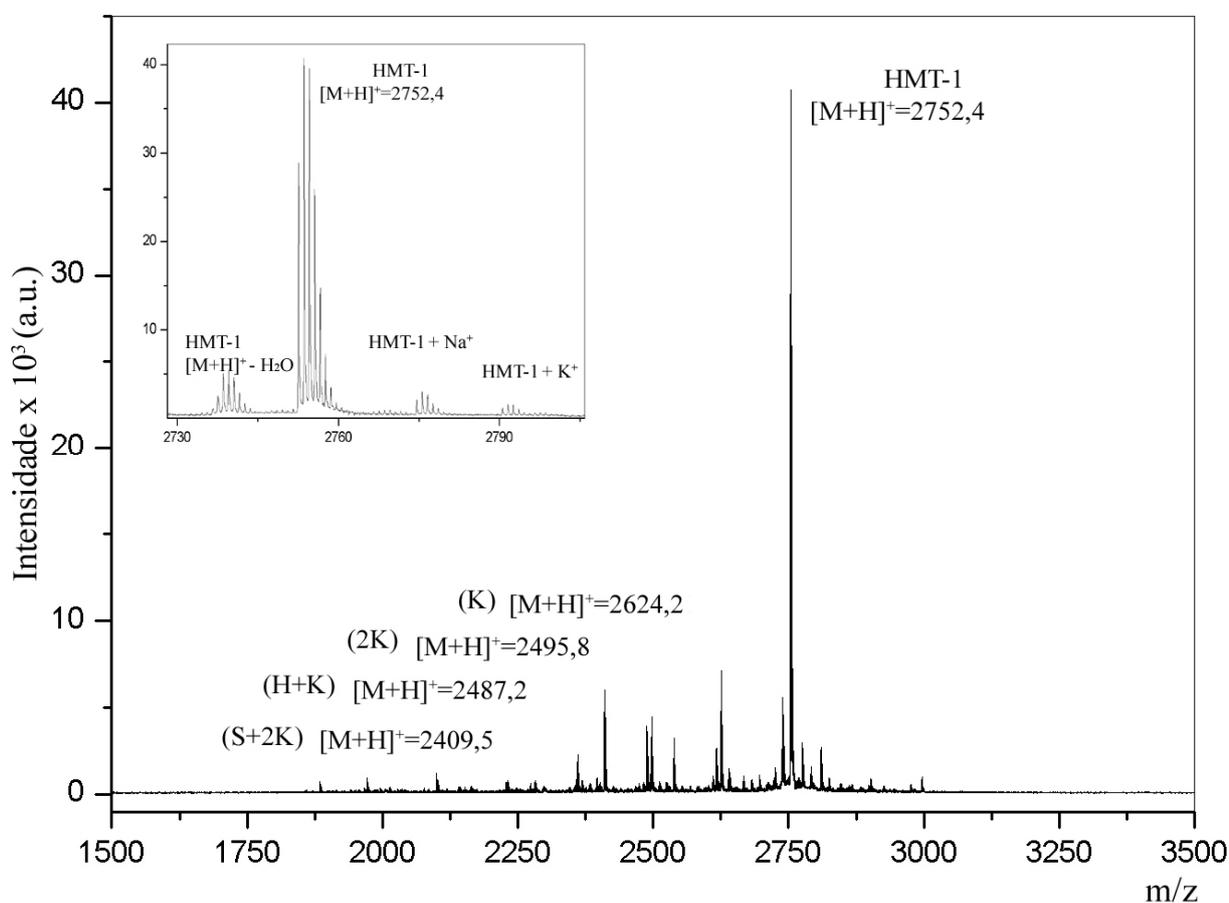


Figura 3.20 - Espectro de Massas (MALDI) de amostra da síntese de HMT-1.

Após confirmação da obtenção do peptídeo HMT-1, o produto da síntese foi purificado primeiramente em condições semi-preparativas para estudos estruturais e termodinâmicos. A Figura 3.21 apresenta o perfil cromatográfico analítico da amostra resultante dessa purificação, permitindo observar picos devidos a uma pequena quantidade de subproduto (t_r 25 min) e a de HMT-1 ($t_r = 28,1$ min), caracterizando uma amostra com grau de pureza baixo de apenas 92%.

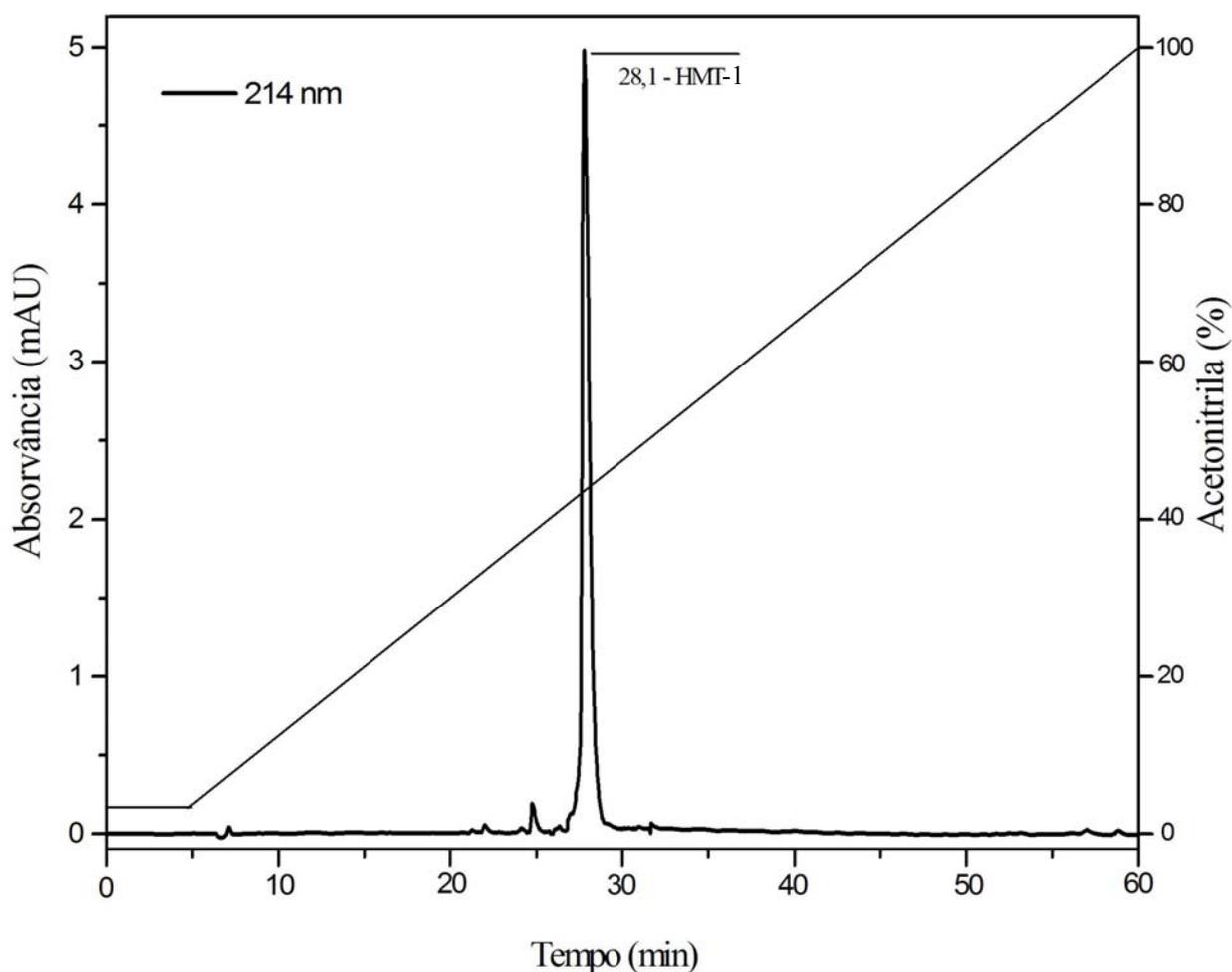


Figura 3.21- Perfil de cromatografia de fase reversa do peptídeo HMT-1 purificado. Amostra injetada (150 μ L) em coluna C₁₈ Vydac 218TP510 (250 mm x 10 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

A amostra foi submetida à análise por MALDI-MS e o espectro resultante é mostrado na Figura 3.22 (p. 92). Verifica-se neste espectro a presença do análogo com a massa igual de HMT-1 menos 128 Da, correspondendo a um resíduo de Lys a menos na sequência deste peptídeo (Tabela 3.11, p. 90).

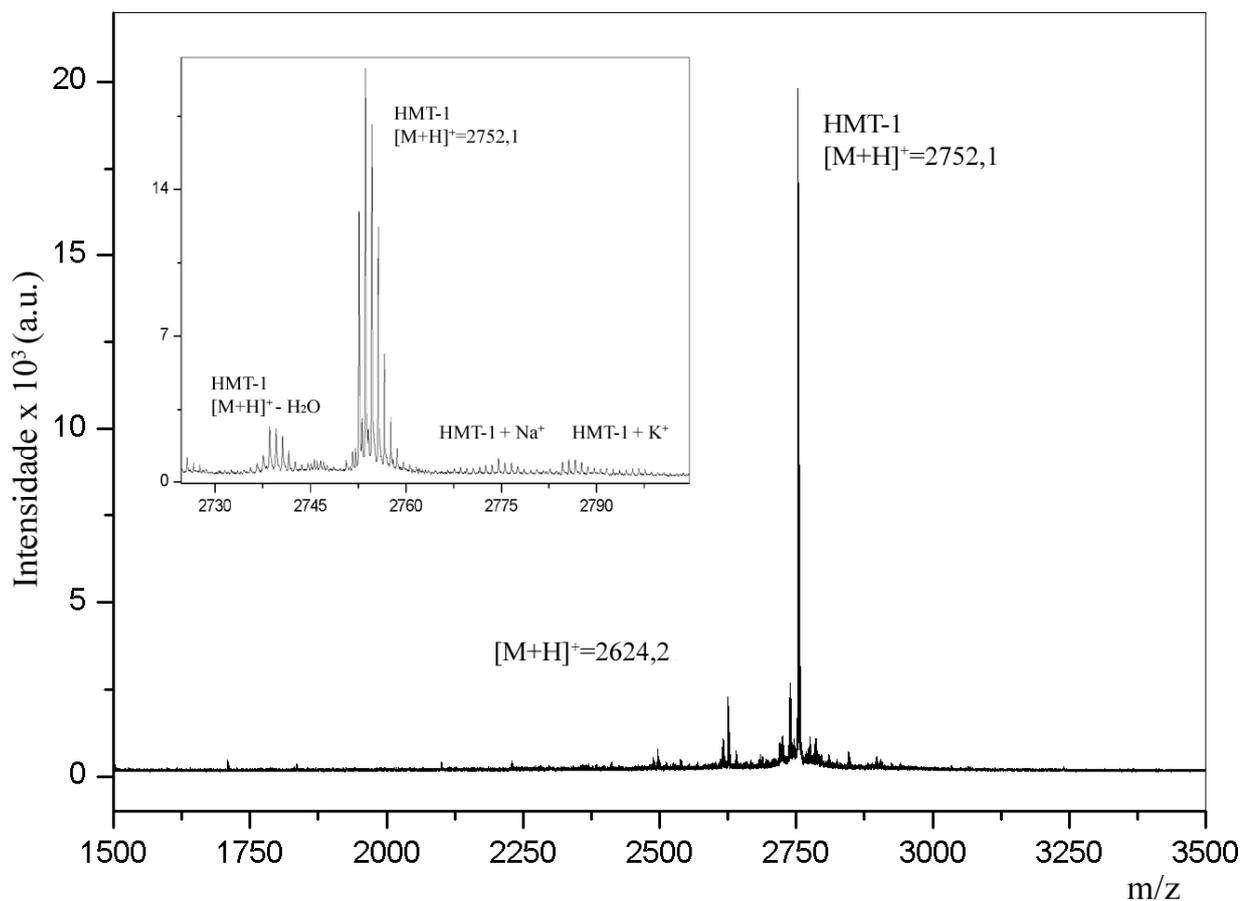


Figura 3.22 - Espectro de Massas (EM-MALDI-ToF) da amostra purificada da síntese de HMT-1 em condições semi-preparativas.

A amostra foi então purificada em condições analíticas para obtenção de produto com um grau de pureza próximo a 98%. A análise por EM-MALDI-ToF desta amostra (Figura 3.23A, p. 93) mostra a presença de apenas de HMT-1, não sendo identificado nenhum outro íon além daquele de $[M+H]^+$ de m/z 2752,7. O cromatograma da amostra purificada apresentado na Figura 3.23C, confirma também a pureza da amostra devido à presença de apenas um pico com t_r de 13,8 min.

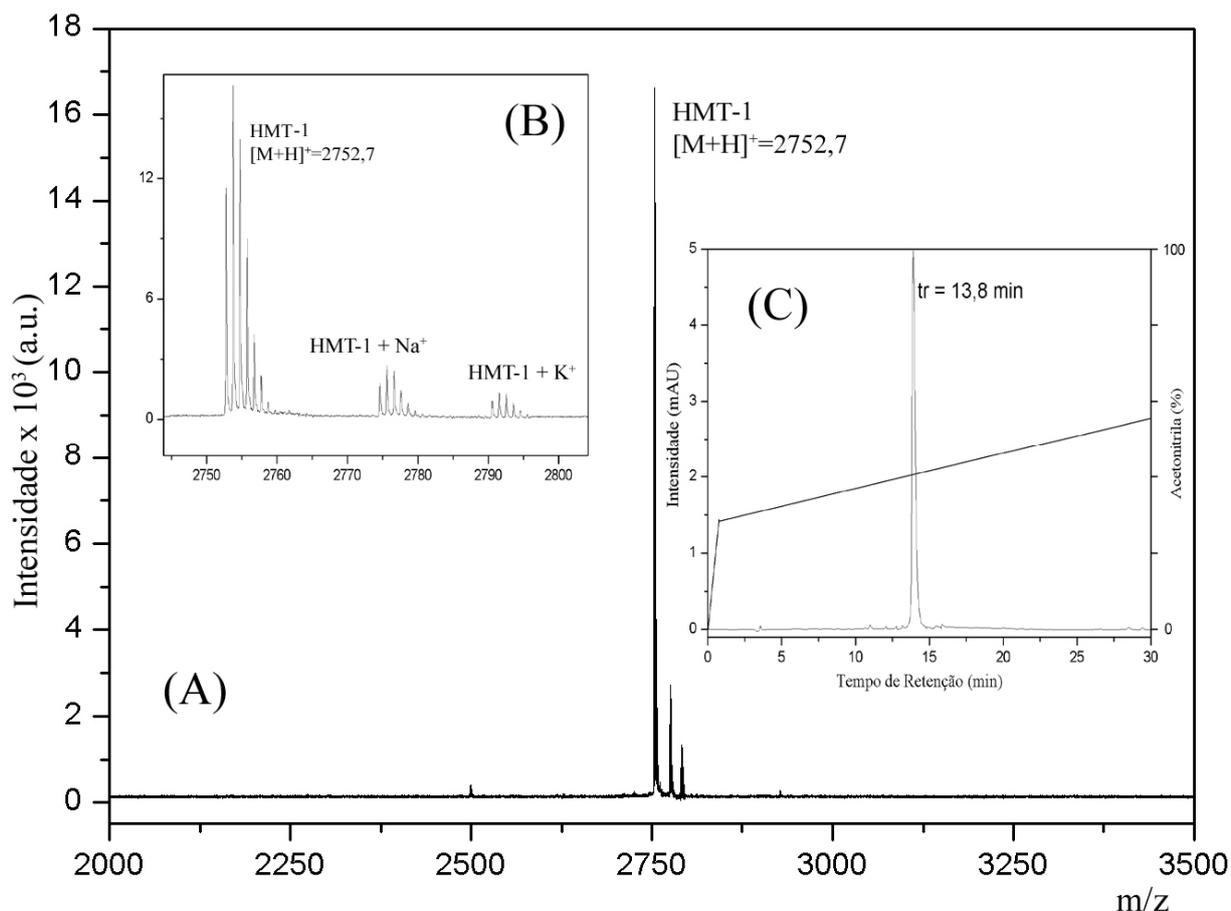


Figura 3.23 – (A) Espectro de Massas MALDI-ToF da amostra do peptídeo HMT-1 purificada. (B) Espectro ampliado mostrando os adutos de Na⁺ e K⁺ de HMT-1. (C) Perfil de cromatografia de fase reversa da amostra de HMT-1 purificada em condições analíticas. Amostra injetada (25µL) em coluna C₁₈ *Vydac* 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

3.2.1.2 Peptídeo dimérico HMT-2

A segunda etapa para a obtenção do peptídeo dimérico homotarsinina consistiu na formação da ligação de dissulfeto intermolecular entre os resíduos de cisteínas de dois monômeros (HMT-1) idênticos. A dimerização foi realizada em duas condições distintas: (A) solução tampão Tris-HCl a 100 mmol.L⁻¹, pH 8,5 com uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ de HMT-1 e (B) solução de 300 mmol.L⁻¹ de SDS, 100 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,5. Em ambos os meios, a reação foi acompanhada por cromatografia de fase reversa para verificar em quanto tempo a conversão de HMT-1 em HMT-2 se completava.

A- Dimerização em solução tampão Tris-HCl

O acompanhamento do desenvolvimento da reação por cromatografia de fase reversa foi realizado com injeções em diferentes intervalos de tempo, mantendo-se sempre o mesmo gradiente. A Figura 3.24 mostra o resultado deste acompanhamento em que cada cromatograma representa diferente tempo de reação.

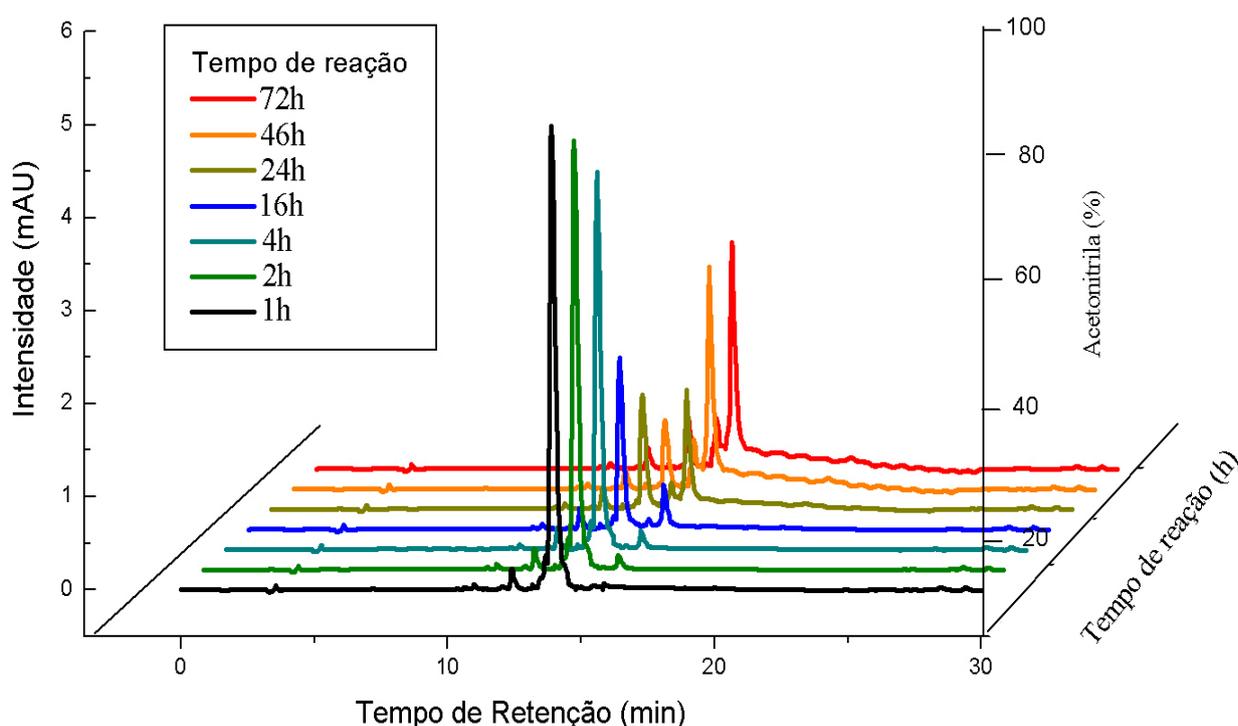


Figura 3.24 – Resultados do acompanhamento por cromatografia de fase reversa da obtenção do peptídeo HMT-2. Aliquotas injetadas (25 μL) em coluna C_{18} Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. O gradiente foi o mesmo empregado na purificação de HMT-1. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ de 214 nm. (preto) 1 h de reação, (verde) 2 h de reação, (verde escuro) 4 h de reação, (azul) 16 h de reação, (marrom) 24 h de reação, (laranja) 46 h de reação, (vermelho) 72 h de reação.

Na Figura 3.24 é possível notar uma diminuição na intensidade de absorção no pico correspondente ao peptídeo HMT-1 ($t_r = 14,1 \text{ min}$) e a intensificação da absorção do pico relativo ao peptídeo HMT-2 ($t_r = 15,9 \text{ min}$), indicando a formação do peptídeo dimérico. A reação não ocorre de forma imediata, sendo necessárias pelo menos 24 h para serem obtidas quantidades equivalentes de HMT-1 e HMT-2. Após 46 h de reação, o cromatograma não apresentou mudanças significativas e uma pequena quantidade de HMT-1 ainda permanece sem dimerizar, indicando, que após este tempo, a reação se

completa. Ao final da síntese, a amostra bruta foi analisada por EM-MALDI-ToF e o resultado observado na Figura 3.25, confirma a presença de HMT-1 e HMT-2 devido aos íons $[M+H]^+$ de m/z 2752,4 e 5502,4, respectivamente.

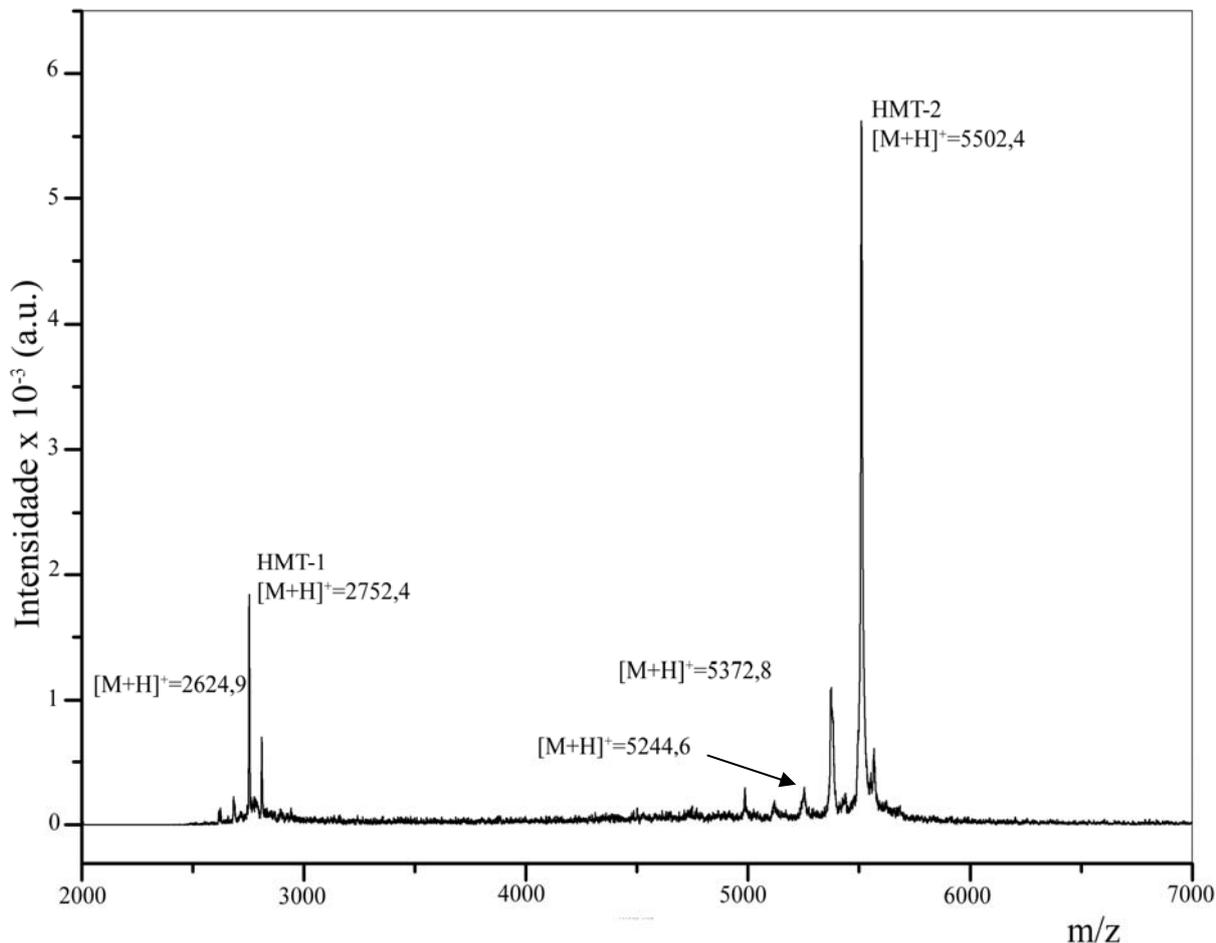


Figura 3.25 - Espectro de Massas MALDI-ToF do produto bruto da obtenção de HMT-2.

Contudo, uma análise mais detalhada do espectro de massas do produto bruto da dimerização (Figura 3.25) revela a presença significativa de, pelo menos, dois outros peptídeos com $[M+H]^+$ de m/z 5372,8 e 5244,4. Estes subprodutos da síntese consistem em análogos de HMT-2, porém com ausência de um resíduo e dois resíduos de lisina, respectivamente, em relação à sequência peptídica de HMT-2. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de se ter utilizado a fração resultante da primeira purificação de HMT-1 (Figuras 3.22, p. 92) para a dimerização, que estava contaminada com análogo de HMT-1 de massa molecular com menos de 128 Da (referente a massa molar de Lys). Como consequência disto ocorreu a formação dos outros dímeros acima citados. A Figura 3.26 (p. 96) apresenta um esquema com as possíveis combinações para a

formação destes análogos diméricos com as respectivas massas moleculares monoisotópicas calculadas.

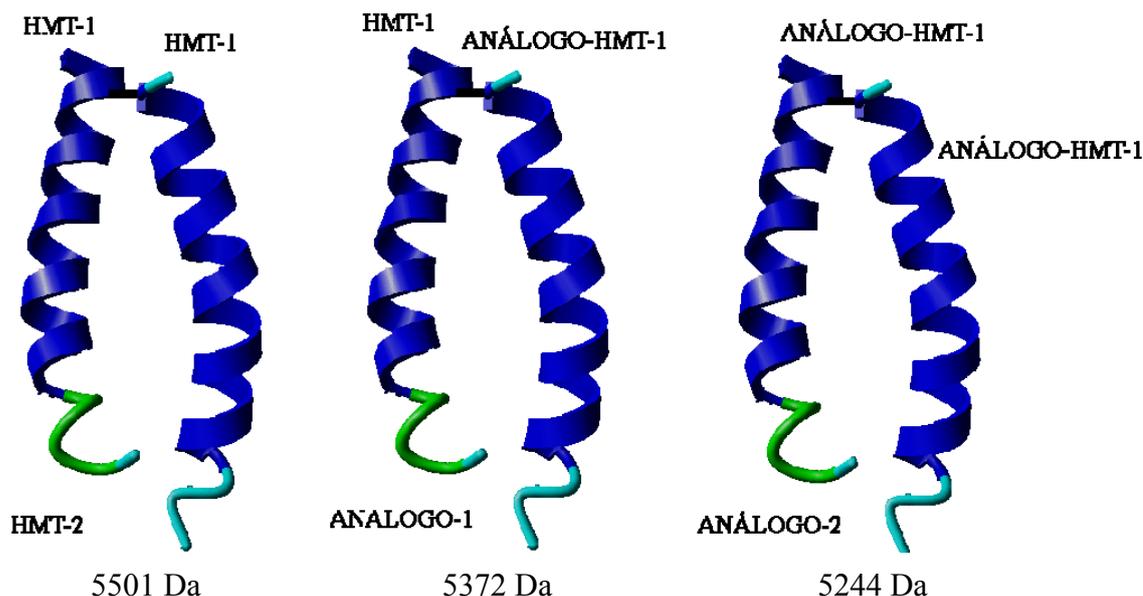


Figura 3.26 - Ilustração das possíveis espécies formadas durante a dimerização de HMT-1. O análogo corresponde à sequência de HMT-1 de massa molar com menos 128 Da.

O produto com um grau de pureza adequado para obtenção de dados experimentais termodinâmicos e estruturais foi obtido após reinjeções em coluna de fase reversa (Figura 3.27, p. 97). Na primeira purificação, foram detectadas ainda quantidades expressivas dos análogos diméricos (Figuras 3.27A e B, p. 97), os quais só foram separados após purificação em condições analíticas (Figuras 3.27C e D, p. 97). A pureza do produto final HMT-2 foi superior a 98% e o rendimento desta reação foi de aproximadamente 30% após a purificação final. O acompanhamento da cinética de dimerização permitiu determinar um tempo ideal de 48 h para a reação em solução tampão. No intervalo entre 48 e 72 h, não há aumento significativo na formação de HMT-2 e a formação de subprodutos também não é considerável a ponto de interferir significativamente na purificação do produto final.

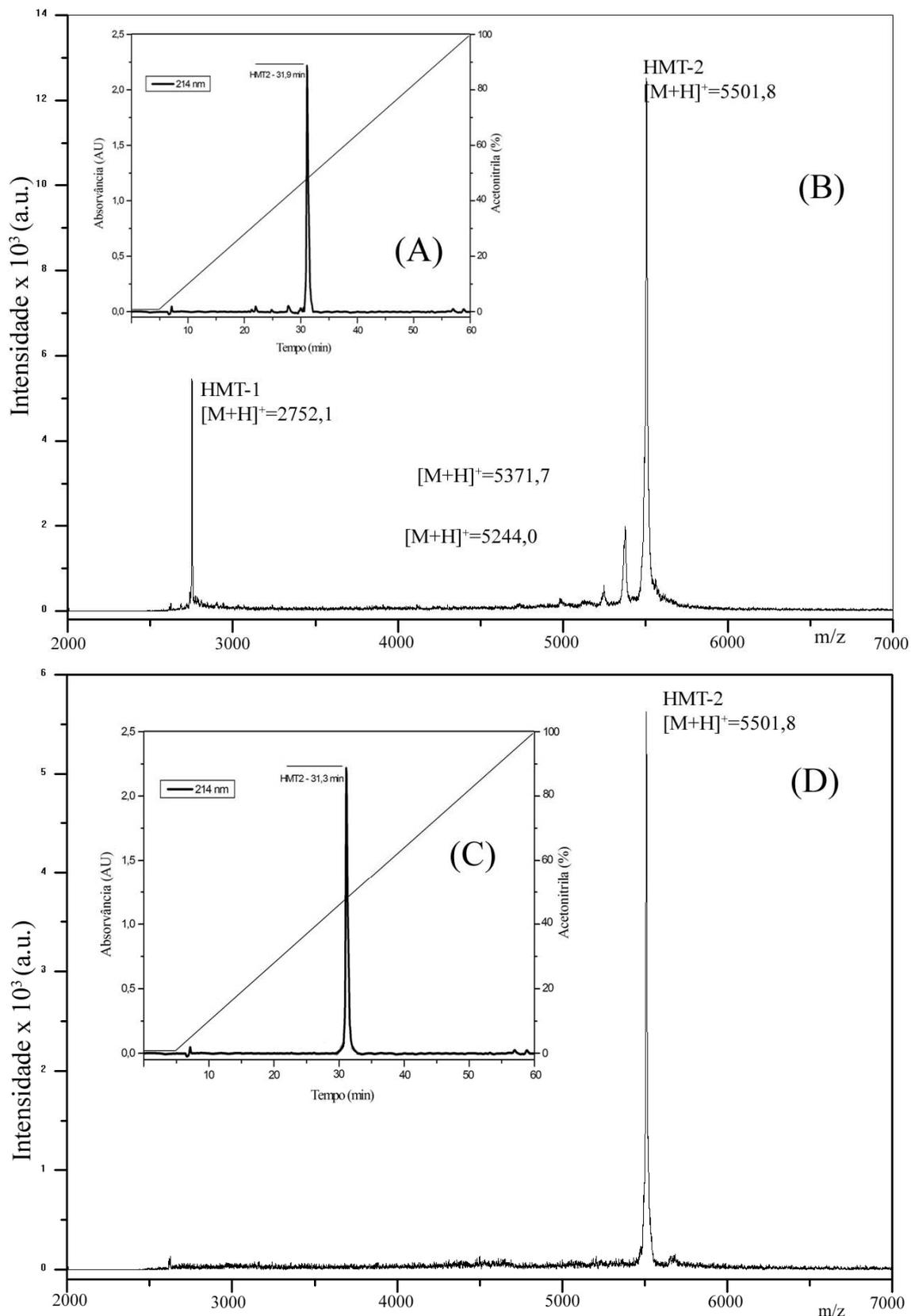


Figura 3.27 – Resultados da análise da amostra purificada em condições semi-preparativas da síntese de peptídeo HMT-2. (A) Perfil de cromatografia de fase reversa e (B) Espectro de Massas MALDI-ToF. (C) Cromatograma da amostra purificada em condições analíticas da síntese de peptídeo HMT-2 e (D) Espectro de Massas MALDI-ToF.

B - Dimerização em solução de SDS

A dimerização foi conduzida também em solução micelar de SDS. O SDS é um detergente aniônico e efetivo tanto em soluções ácidas quanto alcalinas. Em soluções alcalinas, o SDS tem uma larga variedade de aplicações, porém é usado frequentemente acima de sua concentração micelar crítica (CMC, 9 mmol.L^{-1} na faixa de pH de 5 a 10) (Rahman e Brown, 1983) para solubilização de proteínas e também como um poderoso agente desnaturante. Tais efeitos do SDS na solubilização e conformação de proteínas e peptídeos foram publicados anteriormente (Creighton, 1997). Para a dimerização de HMT-1, a solução micelar de SDS permitiu a preparação de uma solução mais concentrada do peptídeo, contendo 5 mg.mL^{-1} em 400 mmol.L^{-1} de SDS, ajustando-se para pH 8,5 com tampão Tris-HCl. O resultado do acompanhamento da cinética da dimerização conduzido por cromatografia de fase reversa é mostrado na Figura 3.28, onde foi mantido sempre o mesmo gradiente e concentração de amostra para cada injeção.

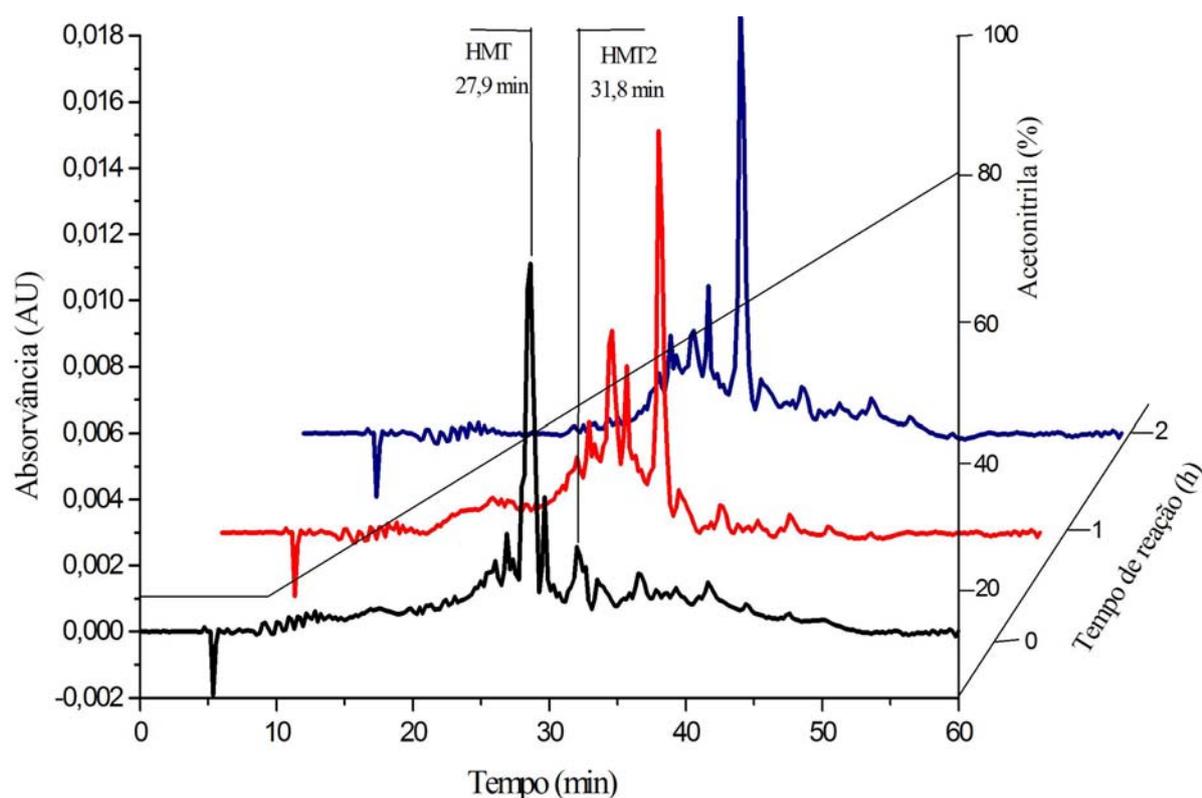


Figura 3.28 – Resultados do acompanhamento por cromatografia de fase reversa da obtenção do peptídeo HMT-2 em micelas de SDS. Aliquotas injetadas ($25 \mu\text{L}$) em coluna C18 Vydac 218TP510 ($250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL.min^{-1} . A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ 214 nm. (preto) imediatamente no início da reação, (vermelho) 1 h de reação, (azul) 2 h de reação.

Assim como para a reação em solução tampão (Figura 3.24, p. 94), é possível observar também na Figura 3.28 (p. 98) a diminuição na intensidade de absorção no pico correspondente ao HMT-1 ($t_r = 27,9$ min) e a intensificação na absorção do pico relativo ao HMT-2 ($t_r = 31,8$ min). O produto bruto da reação, após 2 h, foi liofilizado e caracterizado por EM-ESI-ToF (Figura 3.29), confirmando a presença de íons $[M+H]^+$ de m/z 2752,8 e 5505,5 correspondendo aos peptídeos HMT-1 e HMT-2 protonados, respectivamente.

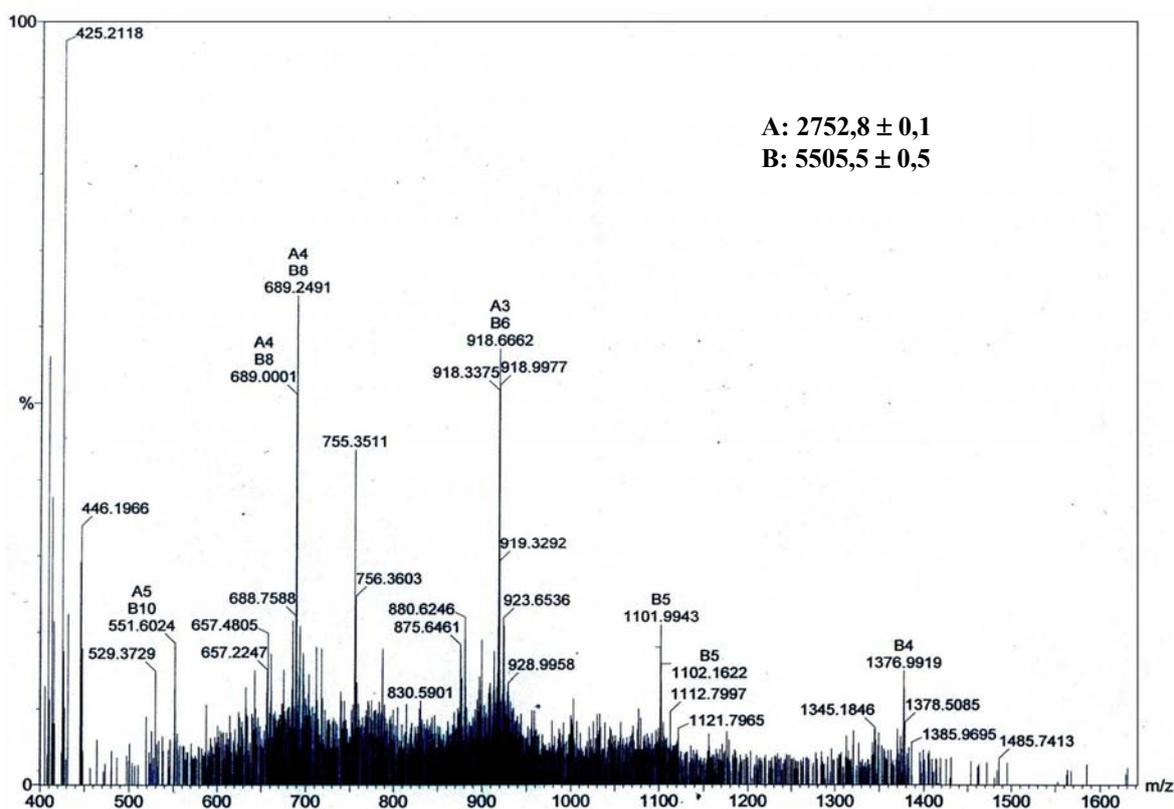


Figura 3.29 - Espectro de Massa (EM-ESI-ToF) da amostra da reação de dimerização em SDS.

Diferentemente do que foi verificado em solução tampão, na reação em micelas de SDS, a velocidade da reação aumenta, juntamente com o rendimento da reação, sendo de aproximadamente 55%. Além disso, não foram detectados os análogos (Figura 3.26, p. 96) de HMT-2 apesar do emprego da mesma amostra de HMT-1 (Figura 3.22, p. 92) utilizada na reação de dimerização em solução tampão Tris-HCl. Logo, a formação dos subprodutos apresentados na Figura 3.26 (p. 96) é desfavorecida na presença de SDS.

O peptídeo HMT-2 foi purificado em condições analíticas e o resultado pode ser visto na Figura 3.30 (p. 100). O espectro de massas ESI-ToF (Figura 3.30A) mostra a presença de íons de diferentes razões massa/carga, porém correspondendo somente ao

peptídeo HMT-2 de massa molecular de 5505,5 Da. A Figura 3.30B apresenta o cromatograma de fase reversa do peptídeo HMT-2, sendo possível notar a presença de apenas um pico com t_r de 32 min, confirmando a qualidade e a eficiência da dimerização em solução de SDS com obtenção de produto final com grau elevado de pureza.

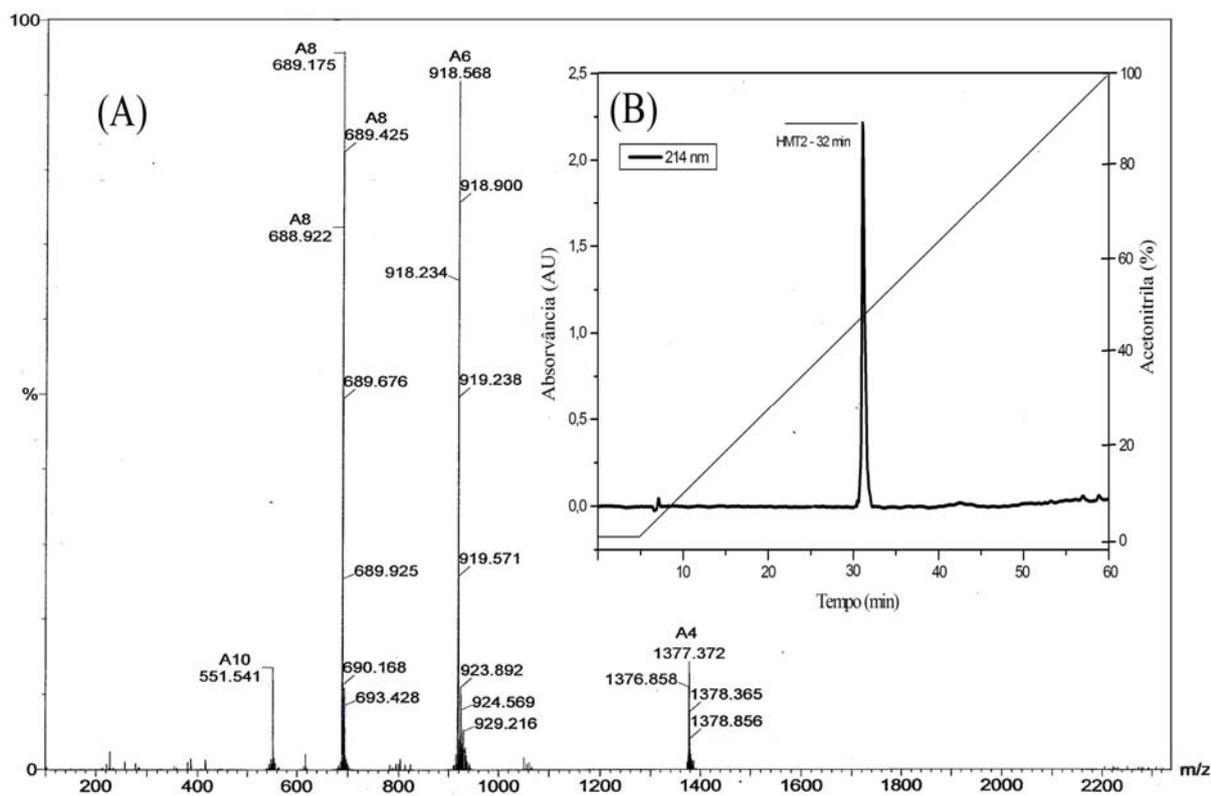


Figura 3.30 – Resultado da análise da amostra purificada de HMT-2 da dimerização em SDS. (A) Espectro de Massas (EM-ESI-ToF). (B) Perfil de cromatografia de fase reversa da amostra purificada após reação em SDS. Amostra injetada (25 μ L) em coluna C₁₈ Vydac 218TP510 (250 mm x 4,6 mm) equilibrada com solução aquosa de TFA a 0,1% (em volume). Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% (em volume) em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

O SDS em sua concentração micelar crítica (CMC) pode estabilizar conformações helicoidais de peptídeos (Rizo *et al.*, 1993) e, abaixo de seu CMC, o SDS também estabiliza algumas outras estruturas peptídicas (Waterhous e Johnson Jr, 1994). Como observado neste trabalho, a dimerização do peptídeo realizada apenas em solução tampão apresentou-se consideravelmente lenta e com rendimento baixo em comparação com o meio micelar de SDS. Tal dificuldade de formação da ligação de dissulfeto pode estar relacionada com a desestruturação do peptídeo HMT-1 em solução tampão Tris-HCl, o que, além de favorecer a agregação entre as moléculas em concentrações

superiores a 1 mmol.L^{-1} , dificulta também a aproximação em conformação adequada das moléculas do peptídeo. Os resultados estruturais de CD e RMN confirmam que o peptídeo HMT-1 apresenta estrutura α -helicoidal em solução de SDS e randômica em solução tampão Tris-HCl, o que contribui para explicar como o fator estrutural pode influenciar a velocidade de dimerização. Em micelas de SDS, HMT-1 apresenta estrutura α -hélice anfipática e favorece a interação intermolecular entre as regiões hidrofóbicas do peptídeo, aproximando as cadeias em posições favoráveis para a formação da ligação de dissulfeto. Da mesma forma, quando se comparam os resultados de EM dos produtos das duas reações de dimerização, é possível verificar a ausência de formação dos análogos diméricos na reação em SDS. Isto pode ocorrer, pois a ausência de resíduos de Lys altera consideravelmente a anfipaticidade de HMT-1 e, conseqüentemente torna-se mais difícil a formação de dímeros dos análogos (Análogo-1 e Análogo-2, Figura 3.26, p. 96) com um resíduo apolar e dois resíduos apolares a menos, respectivamente. Estas evidências propiciam uma nova forma de compreensão da formação de ligação dissulfeto em moléculas que apresentem características anfipáticas.

3.2.2 Estudo das preferências conformacionais por Dicroísmo Circular

O estudo das preferências conformacionais dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 foi realizado empregando-se a técnica de dicroísmo circular (CD). Os espectros de CD foram obtidos em diferentes meios: H_2O ; soluções tampão Tris-HCl e fosfato; TFE; micelas de SDS e DPC e vesículas de POPC e POPG.

3.2.2.1 Peptídeo HMT-1

Os espectros de CD do peptídeo HMT-1 em todos os meios estudados foram agrupados e estão apresentados na Figura 3.31 (p. 102). Esses espectros foram obtidos em diferentes concentrações para cada meio em que foram verificadas as preferências conformacionais de HMT-1.

O espectro de CD do peptídeo HMT-1 apresentou estrutura randômica em água (espectro em preto, Figura 3.31A) e, também, em soluções aquosas de tampão Tris-HCl (pH 8) e fosfato (pH 7) (Figura 3.31B), caracterizada pela presença de valores negativos

de elipçidades molares (θ) em comprimentos de onda inferiores a λ 192 nm e a um mínimo de θ em λ próximo a 200 nm. Os cálculos da porcentagem de hélice ou teor de helicidade (H) (Figura 3.33, p. 105), obtidos por desconvolução a partir das concentrações de peptídeo e das elipçidades molares (θ) em cada meio, confirmam conteúdo baixo de estrutura α -helicoidal de HMT-1 em solução aquosa de tampão fosfato e de tampão Tris-HCl ($\geq 15\%$ de H).

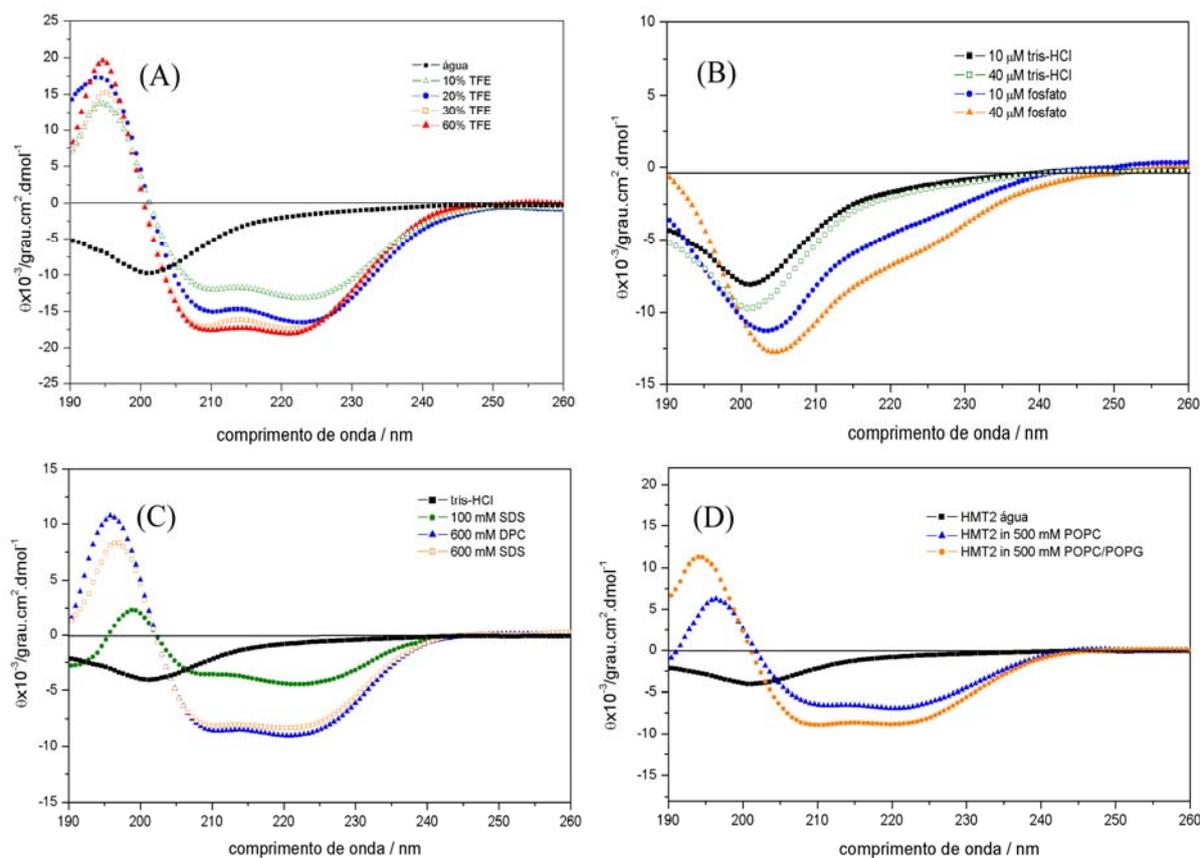


Figura 3.31- Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HMT-1. (A) Soluções em TFE/H₂O (v/v); (B) soluções tampão Tris (pH 8,0) e soluções tampão fosfato (pH 7,0); (C) micelas de DPC e SDS e (D) LUVs-POPC e LUVs-POPC/POPG (3:1).

Por outro lado, o aumento da concentração de TFE em água leva a modificações no espectro de CD de HMT-1 (Figura 3.31A), com o surgimento de valores positivos das intensidades de θ em $\lambda_{\text{máx}}$ próximos a 190 nm e mínimos próximos a $\lambda_{\text{máx}}$ 208 nm (transição π - π^*) e 222 nm (transição n - π^*), caracterizando a predominância de conformação α -helicoidal (Crabbé, 1965; 1972). Mesmo na concentração de 10% TFE/H₂O (v/v) o peptídeo apresenta um conteúdo de hélice de 35%, alcançando um máximo de 50% de conteúdo de estrutura helicoidal em solução de 60% TFE/H₂O (v/v).

O peptídeo HMT-1 apresentou comportamento similar frente à adição de micelas de DPC ou de SDS, como pode ser observado na Figura 3.31C (p. 102). Entretanto, na presença de ambas as micelas, o peptídeo apresentou uma menor estruturação em α -hélice em comparação com soluções de TFE/H₂O. Como pode ser verificado na Figura 3.33B, o máximo de conteúdo de hélice de HMT-1 em micelas de DPC e SDS foi de 35% e 29%, respectivamente. O mesmo efeito pode ser observado devido ao aumento da concentração de vesículas unilamelares pequenas (SUVs, ~50 nm) de POPC e POPC/POPG (3/1, m/m) (Figura 3.31D). É importante notar que HMT-1 apresenta maior helicidade (*H*) na presença de SUVs de POPC/POPG (*H* de 39%) do que em SUVs de POPC (*H* de 30%) (Figura 3.33D), possivelmente devido à interação maior do peptídeo com as LUVs carregadas negativamente. A presença de cargas negativas na superfície de LUVs de POPC/POPG favorece as interações eletrostáticas com resíduos positivamente carregados do peptídeo HMT-1, como mostram os resultados de ITC e DLS apresentados, respectivamente nos itens 3.2.5 (p. 140) e 3.2.6 (p. 146). Mas, no caso das micelas, a carga não afeta a estruturação.

3.2.2.2 Peptídeo HMT-2

Os resultados do estudo das preferências conformacionais de HMT-2 em diferentes meios podem ser vistos na Figura 3.32 (p. 104). Diferentemente do que foi observado para HMT-1, o peptídeo dimérico HMT-2 apresentou um pequeno grau de estruturação mesmo em água e soluções aquosas de Tris-HCl e fosfato (Figura 3.32A). O teor de helicidade calculado em água para HMT-2 (*H* de 15%) apresentou-se três vezes maior em relação a cadeia monomérica (*H* de 5%) (Figura 3.33A, p. 105). Em soluções tamponantes Tris e fosfato (Figura 3.32B) pode-se observar estruturações ainda mais significativas. Contudo, em baixas concentrações de tampão (Tris e fosfato), esses valores de helicidade ainda são relativamente baixos para caracterizar uma estruturação preferencial de α -hélice. Entretanto, o resultado da adição de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do tampão fosfato em pH 7,0 mostra que o peptídeo HMT-2 possui um alto teor de helicidade (*H* de 70%), principalmente se comparado com a cadeia monomérica nas mesmas condições (*H* de 17%) (Figura 3.33B, p. 105). Com o aumento da concentração do tampão fosfato, os espectros de CD de HMT-2 não apresentaram um ponto isodicroico, sugerindo a presença de outras estruturas no meio além da α -hélice e randômica.

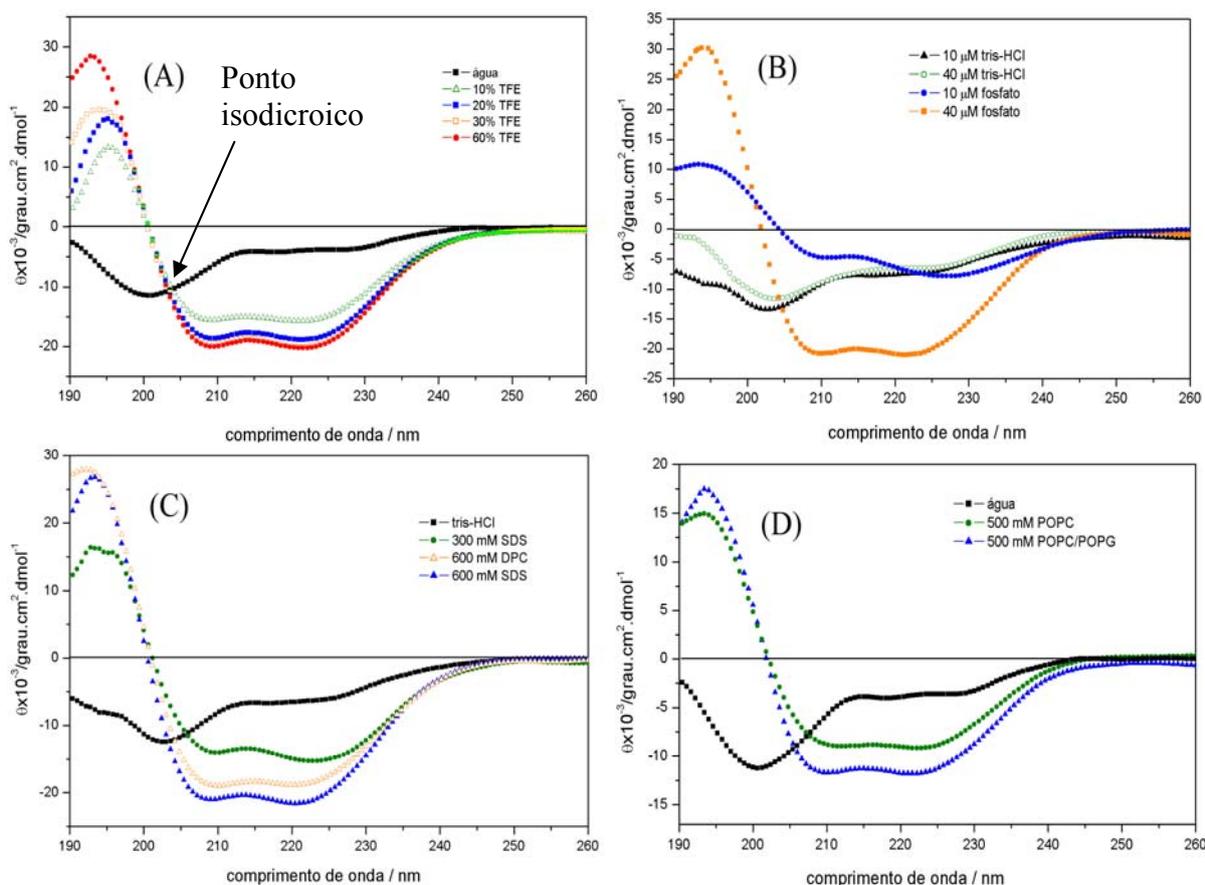


Figura 3.32 - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo HMT-2. (A) Soluções em TFE/H₂O (v/v); (B) soluções de tampão Tris (pH 8,0) e soluções de tampão fosfato (pH 7,0); (C) micelas de DPC e SDS e (D) LUVs-POPC e LUVs-POPC/POPG (3:1).

A variação da concentração de TFE nas soluções contendo HMT-2 (Figura 3.32A), como é realizada tipicamente para determinação das preferências conformacionais de peptídeos neste meio, mostra claramente uma transição sigmoide da estrutura randômica para estrutura α -helicoidal. Esta transição inicia-se em 10% de TFE, atingindo um limite em 20% de TFE e, após este último, verifica-se um pequeno efeito no espectro de CD devido aos incrementos de TFE, alcançando-se um máximo de 90% do conteúdo de hélice (Figura 3.33A, p. 105). Neste caso é possível identificar a presença de um ponto isodicroico, caracterizando a presença de apenas duas estruturas, α -hélice e randômica.

Os resultados de CD em solução micelar de SDS e DPC (Figura 3.32C) mostram também que HMT-2 tem uma maior tendência à formação de estrutura α -helicoidal em comparação com HMT-1. Os conteúdos máximos de hélice para micelas de DPC e SDS

foram de 55% e 60%, respectivamente, conforme podem ser observados na Figura 3.33C. Finalmente, os dados de CD do peptídeo HMT-2 em SUVs de POPC e de POPC/POPG (3/1, m/m) mostram que HMT-2 possui um maior grau de estruturação em α -hélice em comparação com o monômero (Figura 3.32D, p. 104). Novamente, um conteúdo mais elevado de α -hélice pode ser observado para HMT-2 (H de 38% SUVs-POPC e H de 48% em LUVs-POPC/POPG) em comparação com HMT-1 (H de 36% em LUVs-POPC e H de 30% em LUVs-POPC/POPG), como pode ser visto na Figura 3.33D.

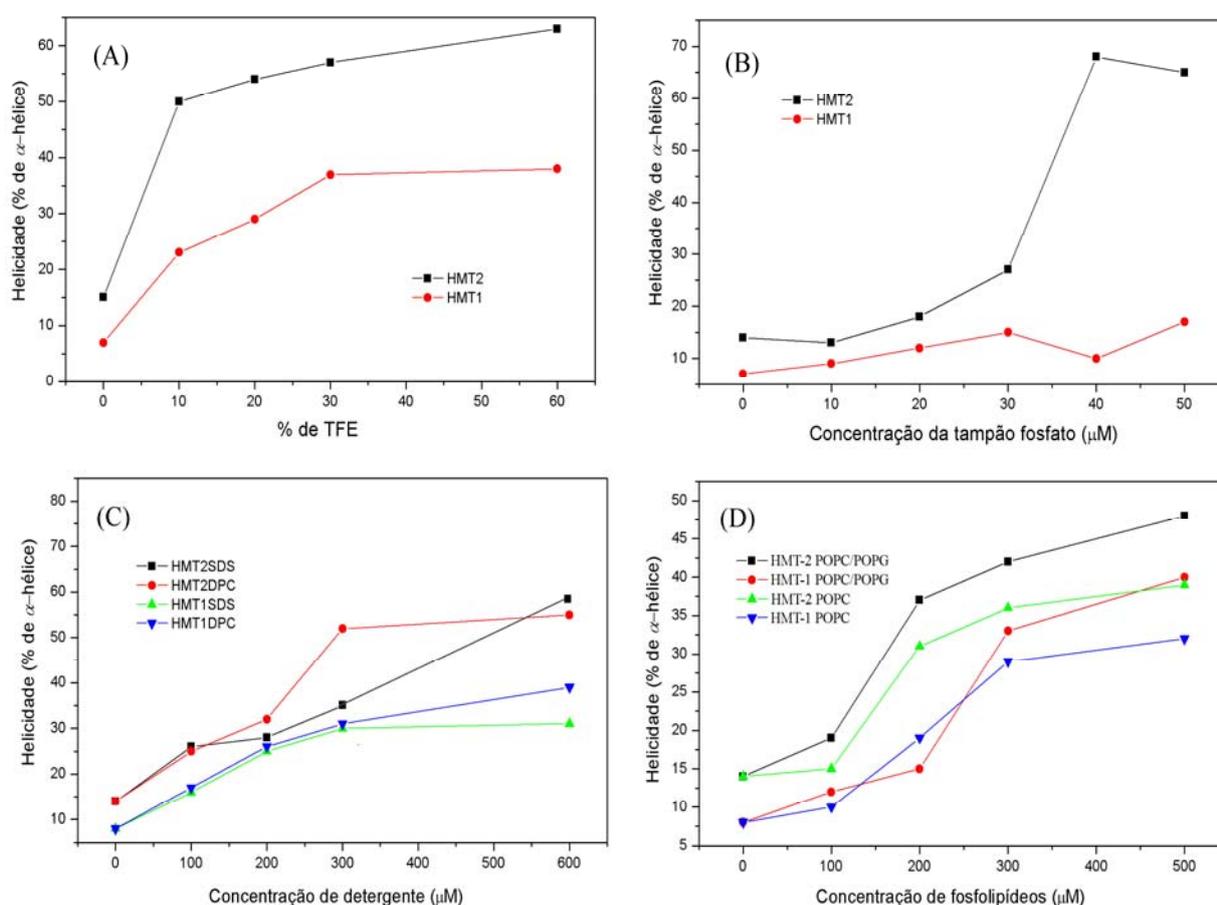


Figura 3.33- Detalhes do conteúdo de hélice de HMT-1 e HMT-2 calculadas em função da adição de: (A) TFE/H₂O; (B) tampão fosfato; (C) SDS e DPC e (D) LUVs-POPC e LUVs-POPC/POPG.

3.2.3 Determinação estrutural por RMN

De posse dos dados das preferências conformacionais obtidas por CD, os experimentos de RMN foram conduzidos nos meios em que os peptídeos apresentaram maior estabilização das estruturas helicoidais. A seguir são apresentados os resultados de RMN que permitiram a determinação de estruturas tri-dimensionais de HMT-1 e HMT-2. Todas as análises seguiram a metodologia de assinalamentos proposta por Wüthrich (1986).

3.2.3.1 Análise do peptídeo HMT-1

Os estudos de CD mostraram que os meios de TFE e micelas de DPC e SDS estabilizaram a estrutura secundária helicoidal de HMT-1. Assim, foram preparadas soluções de TFE- d_2 em água, SDS- d_{25} e DPC- d_{38} em diferentes concentrações para estudo estrutural por RMN de HMT-1. A Figura 3.34 mostra a região de deslocamento químico de núcleos de hidrogênios amídicos dos espectros uni-dimensionais (1D) de RMN de ^1H para amostras preparadas nos meios diferentes.

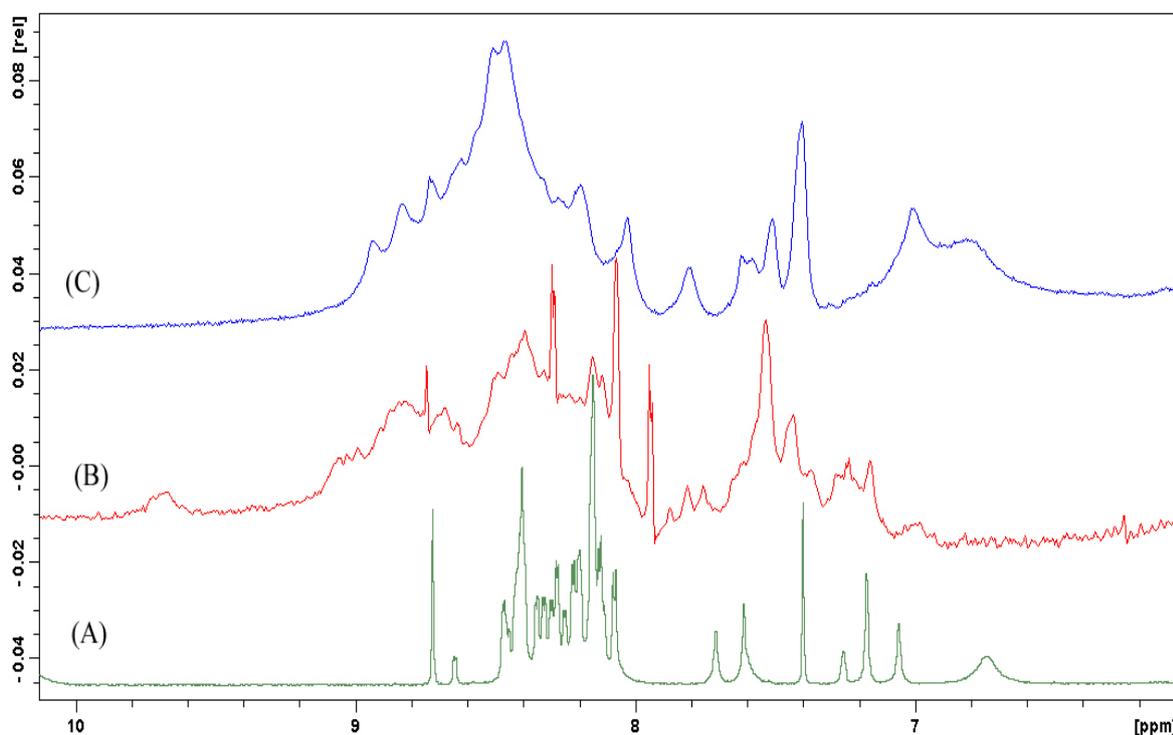


Figura 3.34 - Região de deslocamentos químicos de núcleos de ^1H amídicos do espectro 1D de RMN de 1 mmol.L^{-1} HMT-1 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (600 MHz). (A) 30% TFE- d_2 em H_2O ; (B) 400 mmol.L^{-1} SDS- d_{25} , (C) 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} .

Apenas em solução 30% de TFE (Figura 3.34A, p. 106) foi possível obter dados de RMN para determinação de estruturas tridimensionais (3D) devido à presença de sinais de ressonância relativamente finos e dispersos na região de deslocamento químicos de núcleos de hidrogênio amídico (H_N), indicando uma estrutura secundária bem estável. Em micelas de SDS- d_{25} (Figura 3.34B, p. 106) e DPC- d_{38} (Figura 3.34C, p. 106), a dispersão mantém-se ou, mesmo, aumenta, porém os sinais de ressonância tiveram um alargamento significativo, não permitindo a aquisição de espectros bidimensionais (2D) com resolução suficiente para determinação de estruturas 3D. Isto ocorre devido a trocas conformacionais do peptídeo, que se apresenta em equilíbrio dinâmico entre estado adsorvido às micelas e livre em solução e, como visto nos resultados de CD para HMT-1, o peptídeo apresenta uma estrutura randômica em solução e helicoidal em micelas de DPC- d_{38} .

Os assinalamentos dos núcleos de 1H foram feitos empregando-se a técnica padrão de Wüthrich (1986). Assim sendo, as correlações de TOCSY foram utilizadas para identificar acoplamentos de sistemas de *spin* intra-residuais (H_N - H_α e H_N -H de cadeias laterais), determinando-se cada resíduo da sequência de HMT-1. Na Figura 3.35 (p. 108) é possível observar o padrão de TOCSY praticamente para todos os resíduos de aminoácido da sequência peptídica de HMT-1.

No mapa de contornos parcial da Figura 3.35 (p. 108) é possível observar a conectividade dos núcleos de hidrogênio amídico com H_α e H de cadeias laterais de cada resíduo. Os resíduos não ambíguos como Val-3, Asp-5, His-12, Met-13, Glu-14 e Arg-24 puderam ser identificados de forma inequívoca empregando-se uma análise conjunta do mapa de contornos TOCSY, $^1H^{13}C$ -HSQC-editado e $^1H^{15}N$ -HMQC-SOFAST. Algumas regiões de $^1H^{13}C$ -HSQC-editado estão apresentados na Figura 3.36 (p. 109), onde as correlações devidas ao acoplamento 1J de CH e CH_3 (fase positiva) estão em preto e de CH_2 em vermelho (fase negativa). Na Figura 3.36A (p. 109) é possível distinguir facilmente todos os resíduos de Ile (6, 7, 17, 19 e 20) que apresentam deslocamentos químicos de carbono maiores que 65 ppm. Além destes, Gly-8 foi também de fácil identificação, pois é o único resíduo com C_α ligado a dois hidrogênios (CH_2), apresentam-se destacado em vermelho e com valor de deslocamento químico próximo a 45 ppm. Na Figura 3.36B é possível observar grande parte dos acoplamentos entre carbono e hidrogênio de cadeias laterais. Em preto (fase positiva), estão as correlações C_β - H_β de Ile (resíduos 6, 7, 17, 19 e 20) e Val-3, além de H_γ dos resíduos de Leu-2 e Leu-16.

N L V S D I I G S K K H M E K L I S I I K K C R - NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 24-NT

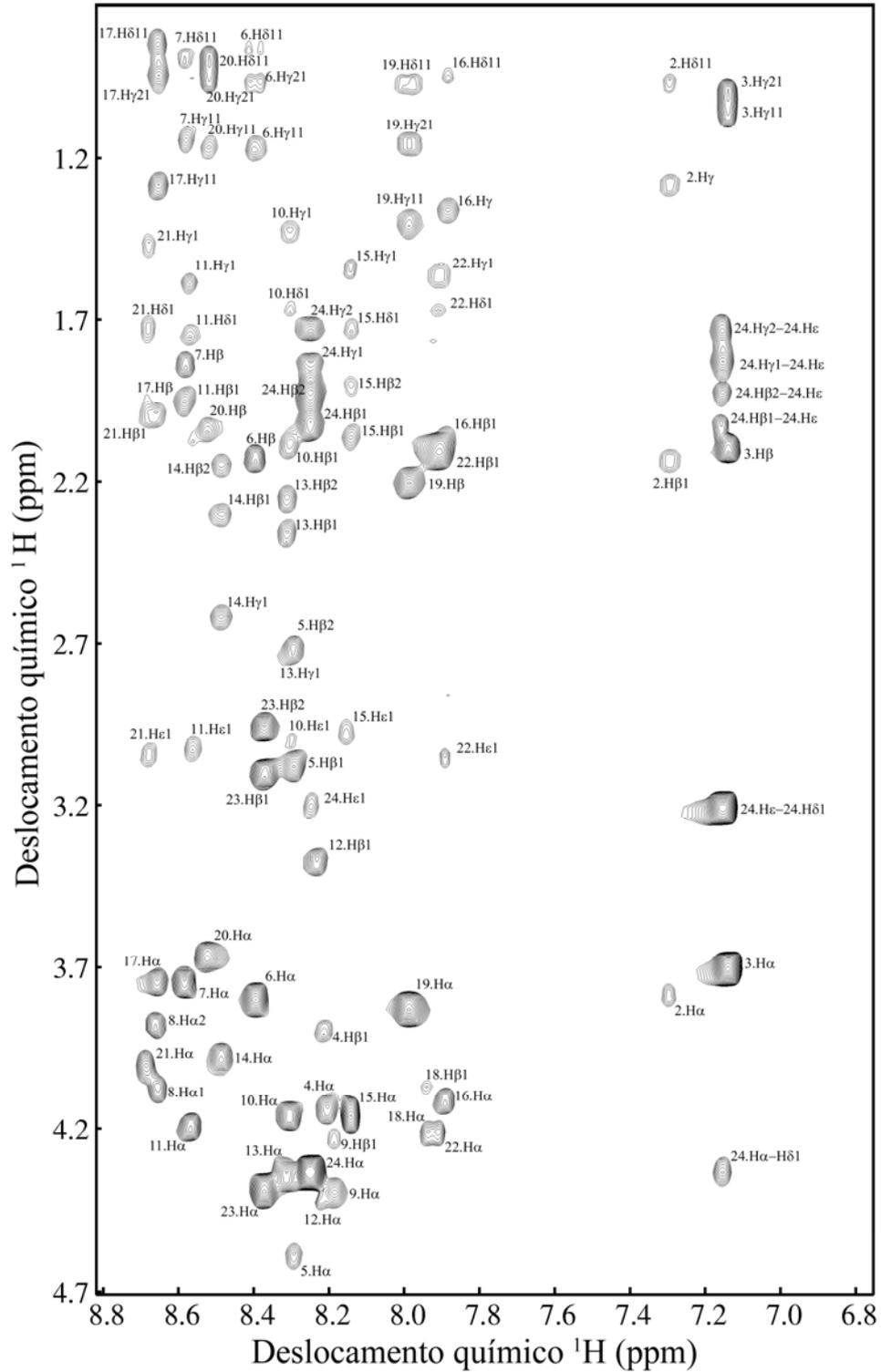


Figura 3.35 - Mapa de contornos parcial TOCSY (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/H₂O 30:70 v/v.

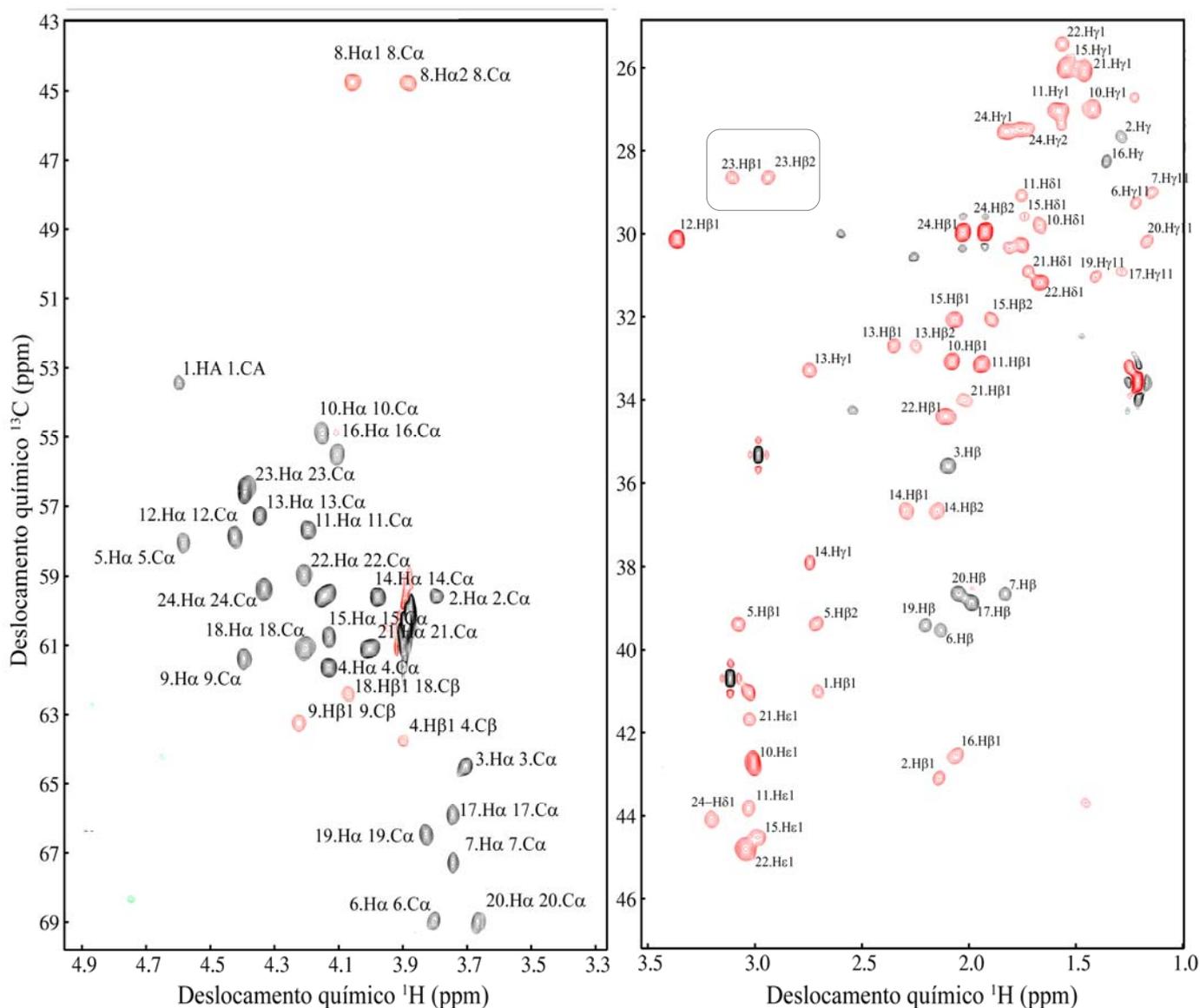


Figura 3.36 - Mapas parciais de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/H₂O 30:70 v/v. (A) Região de acoplamentos $^1J\text{-HC}\alpha$ e (B) Região de acoplamentos $^1J\text{-HC}$ de cadeias laterais de aminoácidos.

Para assinalamento dos resíduos mais frequentes na estrutura primária de HMT-1 foi necessária a análise conjunta dos mapas de contornos de TOCSY e NOESY para identificação de conectividade entre resíduos de aminoácidos da cadeia peptídica de HMT-1. Na Figura 3.37 (p. 110) estão mostradas regiões do mapa de contornos NOESY de interações características de estrutura α -hélice. Algumas interações de média distância do tipo $d_{\alpha\text{N}}(i,i+n)$ podem ser verificadas na Figura 3.37A, enquanto interações sequenciais entre núcleos de hidrogênio amídico ($d_{\text{NN}}(i,i+1)$) podem ser notadas na Figura 3.37B.

N L V S D I I G S K K H M E K L I S I I K K C R - NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 24-NT

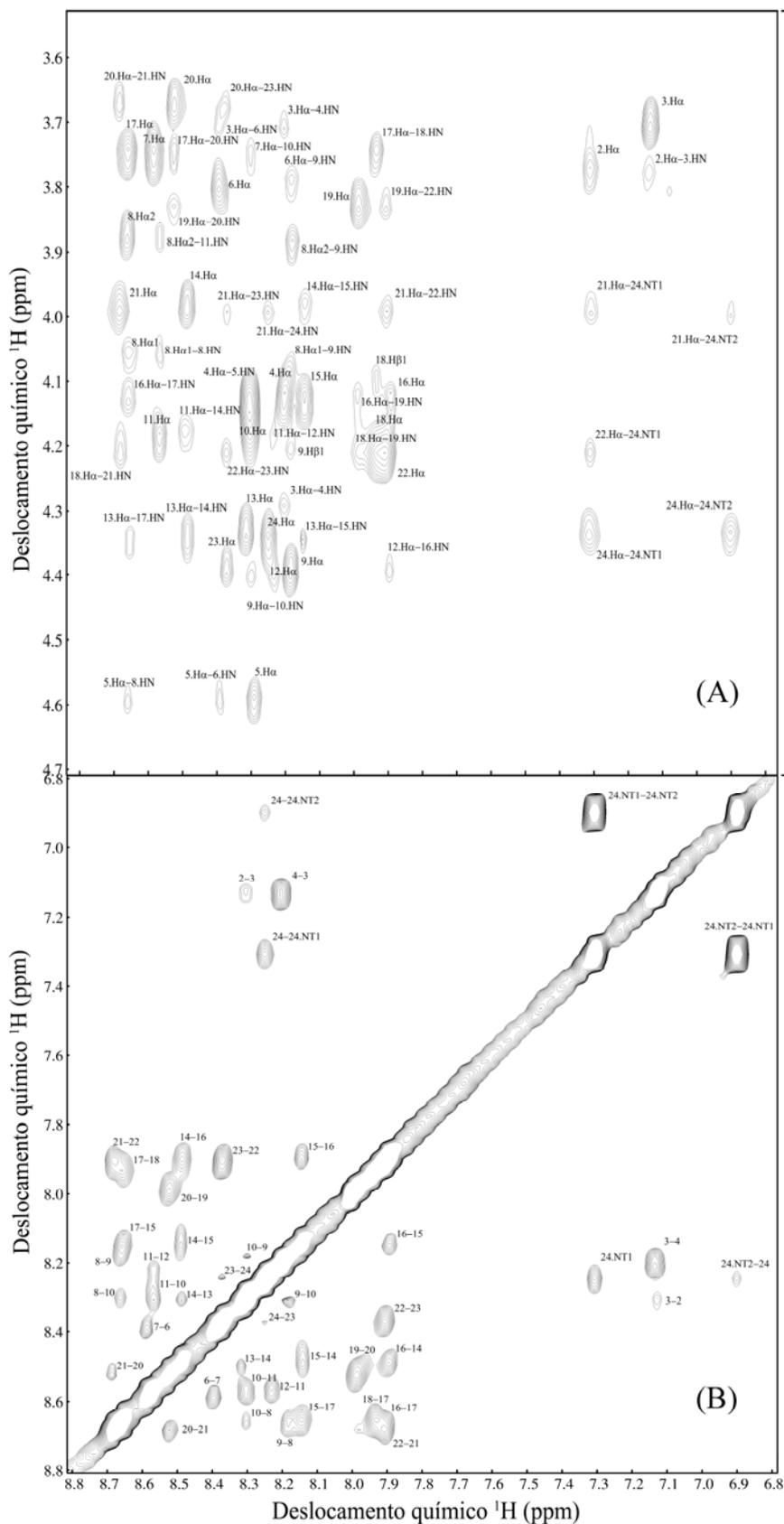


Figura 3.37 - Mapas de contornos parciais NOESY (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/H₂O 30/70 v/v. (A) Região de interação $d_{\alpha N}(i,i+n)$ (B) Região de interação de interação $d_{NN}(i,i+n)$.

Estas correlações sequenciais e de média-distância foram fundamentais para a atribuição correta de resíduos mais frequentes da estrutura primária de HMT-1, como Lys e Ile. Além disso, o grande número destas interações sequenciais e de média distância, encontradas também em outras regiões do mapa de contornos NOESY, sugere um grau elevado de ordenação de estrutura secundária do peptídeo.

Concomitantemente a essa atribuição, foram determinados também os sinais de núcleos de nitrogênio amídico (H_N) por meio da análise do mapa de contornos $^1H^{15}N$ -HMQC-SOFAST (Figura 3.38). A dispersão dos deslocamentos químicos de H_N indica também a presença de uma estrutura secundária como verificada nos espectros de CD registrados na presença de 30% (em volume) de TFE (Figura 3.31, p. 102)

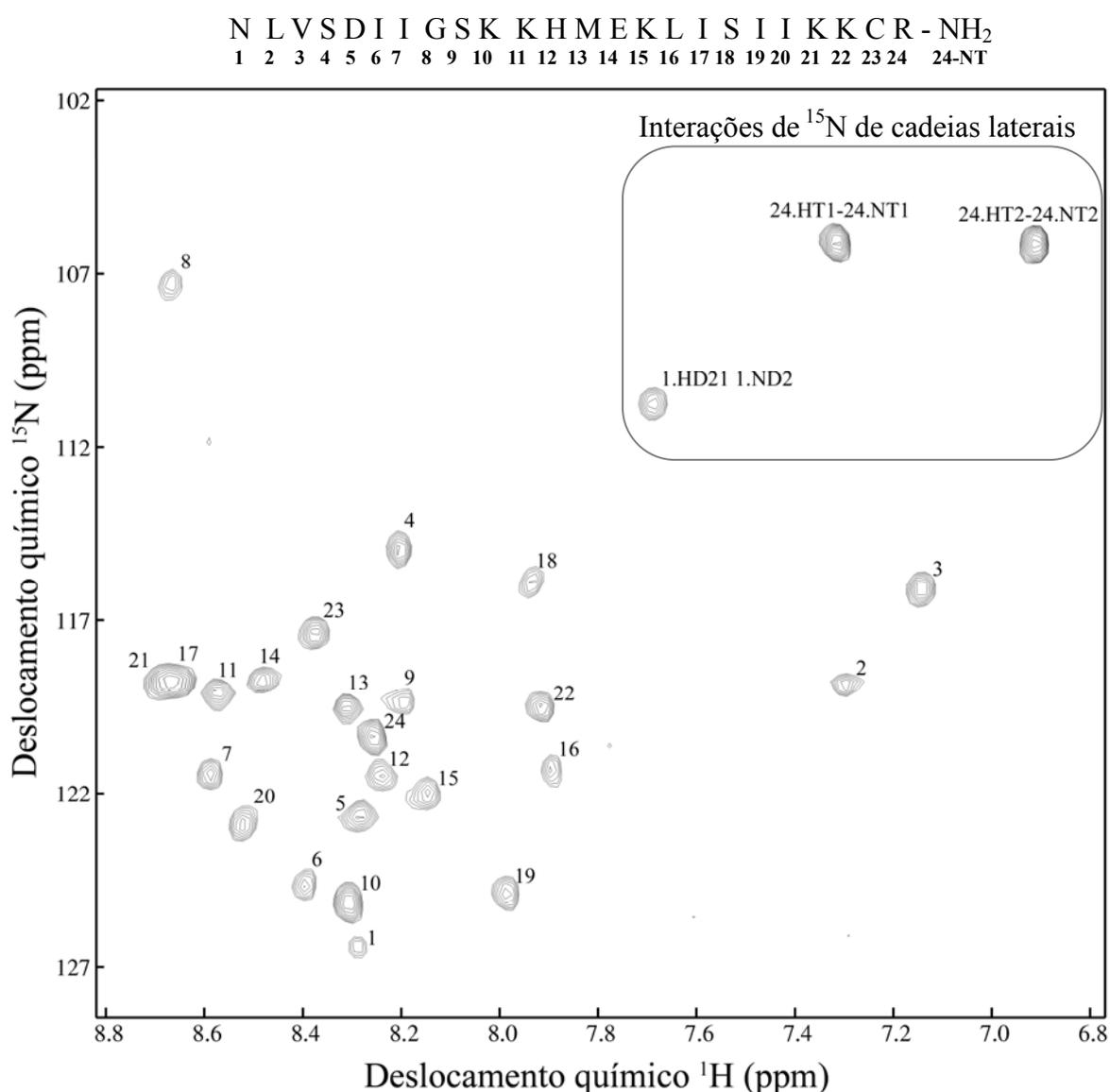


Figura 3.38 - Mapa de contornos parcial $^1H^{15}N$ -HMQC-SOFAST (600 MHz) de HMT-1 em solução TFE/H₂O 30:70 v/v. Região de acoplamentos 1J -H-N.

Os nOes inter-residuais característicos de estrutura helicoidal estão resumidos graficamente na Figura 3.39. A sobreposição de interações $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ a partir do resíduo de Leu-2 até a extremidade C-terminal amidada (resíduo Arg-24) sugere uma estrutura α -hélice em praticamente toda a cadeia peptídica. Também pode ser observada em menor extensão, uma continuidade de nOes do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ do resíduo de Ile-6 até Cys-23, indicando uma certa rigidez da parte central da cadeia peptídica de HMT-1.

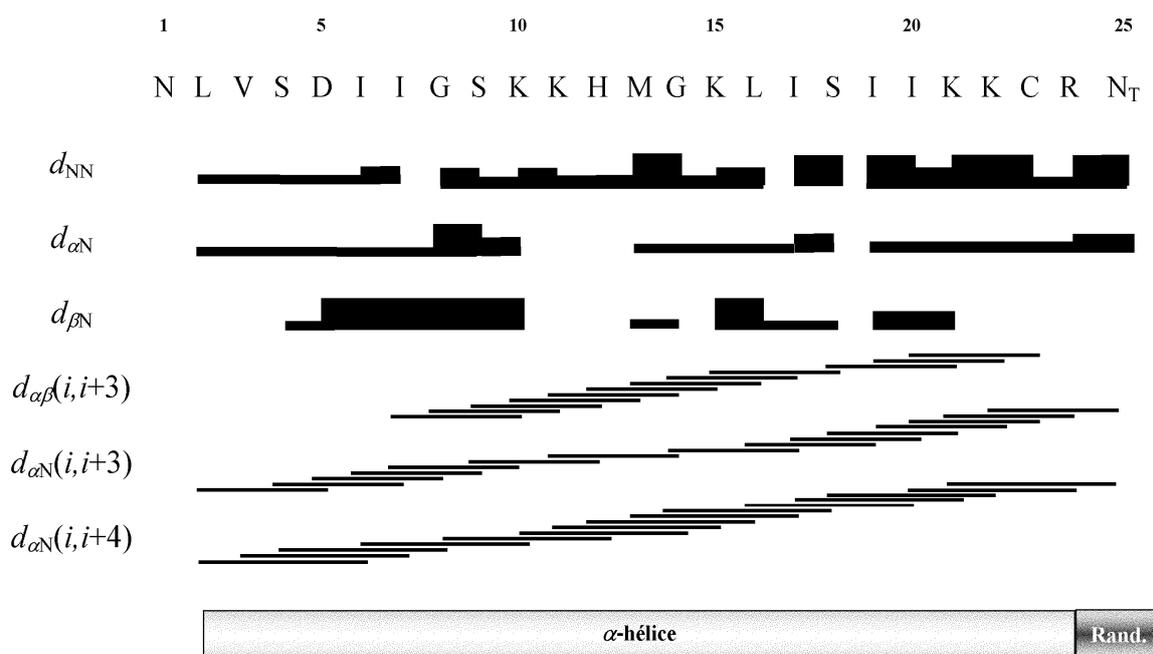


Figura 3.39 - Diagrama de conectividade de nOes para o peptídeo HMT-1 em solução aquosa de TFE a 30% v/v. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ no diagrama estão diferenciadas como fortes, médias e fracas de acordo com a espessura das linhas. Várias interações de média distância $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ foram observadas e estão representadas por linha finas que unem os resíduos que interagem entre si. A extensão da hélice no peptídeo está indicada pelo retângulo situado na parte inferior a Figura.

Após a análise completa dos mapas de contornos TOCSY, NOESY, $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC e $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC foi possível a determinação dos deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N do peptídeo HMT-1 em TFE, conforme listados na Tabela 3.12 (p. 113). Com exceção do resíduo de Asn-1, todos os demais resíduos de aminoácidos tiveram os deslocamentos químicos de seus núcleos devidamente assinalados.

Tabela 3.12 - Deslocamentos químicos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N (em ppm) de HMT-1 em TFE (600 MHz)

Resíduos	δ_{N}	$\delta_{\text{C}\alpha}$	$\delta_{\text{C}\beta}$	δ_{HN}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$ ($\beta_1-\beta_2$)	$\delta_{\text{H}\gamma}$ ($\gamma_1-\gamma_2$)	δ_{Outros}
Asn-1	125,33	53,41	40,99		4,51	2,83		$7,68\delta_{12}-7,68\delta_{22}$
Leu- 2	118,84	59,60	43,07	7,30	4,23	1,88	1,51	$0,98\delta_{11}-0,97\delta_{22}$
Val-3	116,05	64,55	35,56	7,13	3,71	2,08	1,05-0,99	
Ser-4	114,92	61,65	63,80	8,20	4,20	4,09-3,90		
Asp-5	122,70	58,05	39,35	8,29	4,58	3,18-2,95		
Ile-6	124,62	68,97	39,51	8,39	3,80	2,13	1,70-0,94	$0,91\delta_{11}$
Ile-7	121,41	67,28	38,65	8,58	3,74	1,82	1,51	$0,89\delta_{11}$
Gly-8	107,30	42,82		8,66	3,88 4,07			
Ser-9	119,30	61,40	63,27	8,19	4,40	4,19-4,07		
Lys-10	125,11	59,78	33,08	8,30	4,15	2,07	1,50	$1,70\delta_1-3,01\epsilon_1$
Lys-11	119,10	57,70	33,15	8,57	4,17	2,06-1,91	1,59	$1,89\delta_1-3,03\epsilon_1$
His-12	120,55	57,81	30,14	8,24	4,41	3,37		
Met-13	119,56	57,28	32,68	8,31	4,34	2,35-2,25	2,74	
Glu-14	118,70	59,59	36,67	8,48	3,98	2,29-2,15	2,62	
Lys-15	121,97	60,72	32,04	8,14	4,14	2,07-1,89	1,53	$1,68\delta_{11}-2,98\epsilon_1$
Leu-16	121,31	59,39	42,55	7,90	4,13	1,95	1,44	$0,92\delta_{11}-0,95\delta_{22}$
Ile-17	118,75	65,88	38,83	8,65	3,74	1,98	1,42	$0,89\delta_{11}-0,90\delta_{22}$
Ser-18	115,87	61,08	62,43	7,93	4,20	4,07		
Ile-19	124,89	66,45	39,40	7,98	3,82	2,20	1,74-1,16	$0,93\delta_{11}$
Ile-20	122,89	69,01	38,65	8,52	3,67	2,04	1,62-1,20	$0,83\delta_{11}-0,86\lambda_{22}$
Lys-21	118,79	61,12	34,00	8,69	4,00	1,98-1,96	1,47	$1,72\delta_1-3,00\epsilon_1$
Lys-22	119,53	58,97	34,38	7,91	4,21	2,05	1,56	$1,66\delta_1-3,03\epsilon_1$
Cys-23	117,32	56,50	28,62	8,37	4,10	3,26-3,25		
Arg-24	120,17	59,35	29,95	8,26	4,33	2,02-1,92	1,83-1,73	$3,20\delta_1-7,15\epsilon_1$

3.2.3.2 Análise do peptídeo HMT-2

Os resultados de CD mostraram que, em solução tampão fosfato e micelas de DPS e SDS, o peptídeo HMT-2 apresenta alto teor de estrutura em α -hélice. Foram então preparadas amostras de HMT-2 em solução 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato, 300 mmol.L⁻¹ de SDS-*d*₂₅ e 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈. A Figura 3.40 apresenta a região de deslocamento químico dos núcleos de hidrogênio amídico (H_N) dos espectros 1D de RMN de ¹H das amostras preparadas. Não foi possível obter espectros bem resolvidos para determinação estrutural somente em solução de SDS-*d*₂₅ (Figura 3.40C). Entretanto, em 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato (Figura 3.40A) e 400 mmol.L⁻¹ de micelas de DPC-*d*₃₈ (Figura 3.40B), os sinais de RMN do peptídeo apresentaram-se bem resolvidos e com alta dispersão, indicando uma estrutura parcialmente rígida da molécula nestes ambientes. A seguir serão apresentados os resultados para a determinação estrutural de HMT-2 em dois meios diferentes: (A) em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ DPC-*d*₃₈ e (B) solução de tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹.

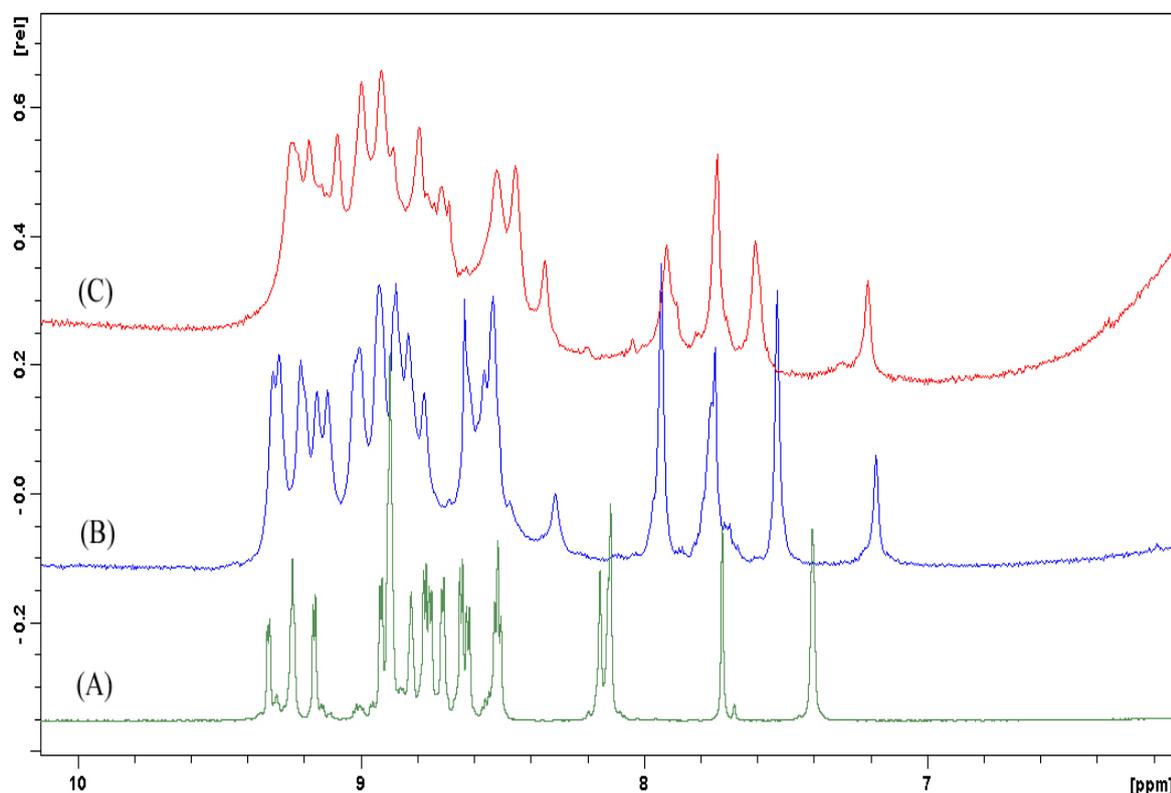


Figura 3.40 - Região de deslocamento químico de núcleos de ¹H amídicos do espectro 1D de RMN de 1 mmol.L⁻¹ de HMT-2 a 25 °C (600 MHz). (A) 30% (v/v) TFE-*d*₂ em H₂O; (B) 400 mmol.L⁻¹ DPC-*d*₃₈ e (C) 400 mmol.L⁻¹ SDS-*d*₂₅.

A – RMN de HMT-2 em micelas de DPC-*d*₃₈

Os resultados estruturais obtidos previamente por CD em solução micelar de DPC-*d*₃₈ (Figura 3.32C, p. 104) e vesículas de POPC (Figura 3.32D, p. 104) mostraram uma preferência conformacional em α -hélice de HMT-2 em ambos os meios. Moléculas de DPC-*d*₃₈ são detergentes que formam micelas com interface muito similar a de vesículas de POPC e, por esta razão, a estrutura de HMT-2 foi estudada na presença de 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈. A Figura 3.41 (p. 116) mostra o mapa de contornos parcial TOCSY do peptídeo HMT-2 em solução micelar de DPC-*d*₃₈. A alta abundância de resíduos de Lys e Ile na sequência peptídica de HMT-2 dificultou as atribuições. Algumas sobreposições de correlações intra-residuais de H α e H_N, como de Ser-18/Lys-22, Ser-9/His-12 e Met-13/Cys-23, podem ser observadas na Figura 3.41 (p. 116) e dificultaram a atribuição inequívoca de todos os resíduos do peptídeo HMT-2. Deve-se notar que, nesta região do mapa de contornos TOCSY, foram identificados somente 24 sistemas de *spins* da estrutura primária de HMT-2, ou seja, 24 resíduos de aminoácidos, enquanto que o peptídeo é formado por 48 resíduos de aminoácidos. Este resultado indica uma perfeita simetria espacial das duas cadeias peptídicas que constituem HMT-2. Conclusivamente, os deslocamentos químicos dos núcleos dos resíduos de aminoácidos equivalentes de cada cadeia se sobrepõem nos espectros de ¹H, ¹³C e ¹⁵N. Como consequência, os mapas de contornos TOCSY de HMT-1 em solução TFE/H₂O e HMT-2 em solução micelar de DPC-*d*₃₈ apresentaram também grande similaridade, contribuindo para a atribuição completa de HMT-2.

Para a determinação dos deslocamentos químicos de ¹³C de C α e dos núcleos de carbono de cadeias laterais foram realizados experimentos de ¹H¹³C-HSQC-editado. O resultado deste experimento pode ser observado na Figura 3.42 (p. 117) que apresentou pouca sobreposição das correlações ¹H-¹³C. Dessa forma, as sobreposições de sistemas de *spin* no mapa de contornos TOCSY, como as que ocorreram entre os resíduos Ser-9/His-12 e Ser-18/Lys-22, puderam ser resolvidas pela análise conjunta com o mapa de contornos de ¹H ¹³C-HSQC editado (Figura 3.42, p. 117).

	N L V S D I I G S K K H M E K L I S I I K K C R - NH ₂																											
Cadeia A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24-NT			
Cadeia B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	48-NT			

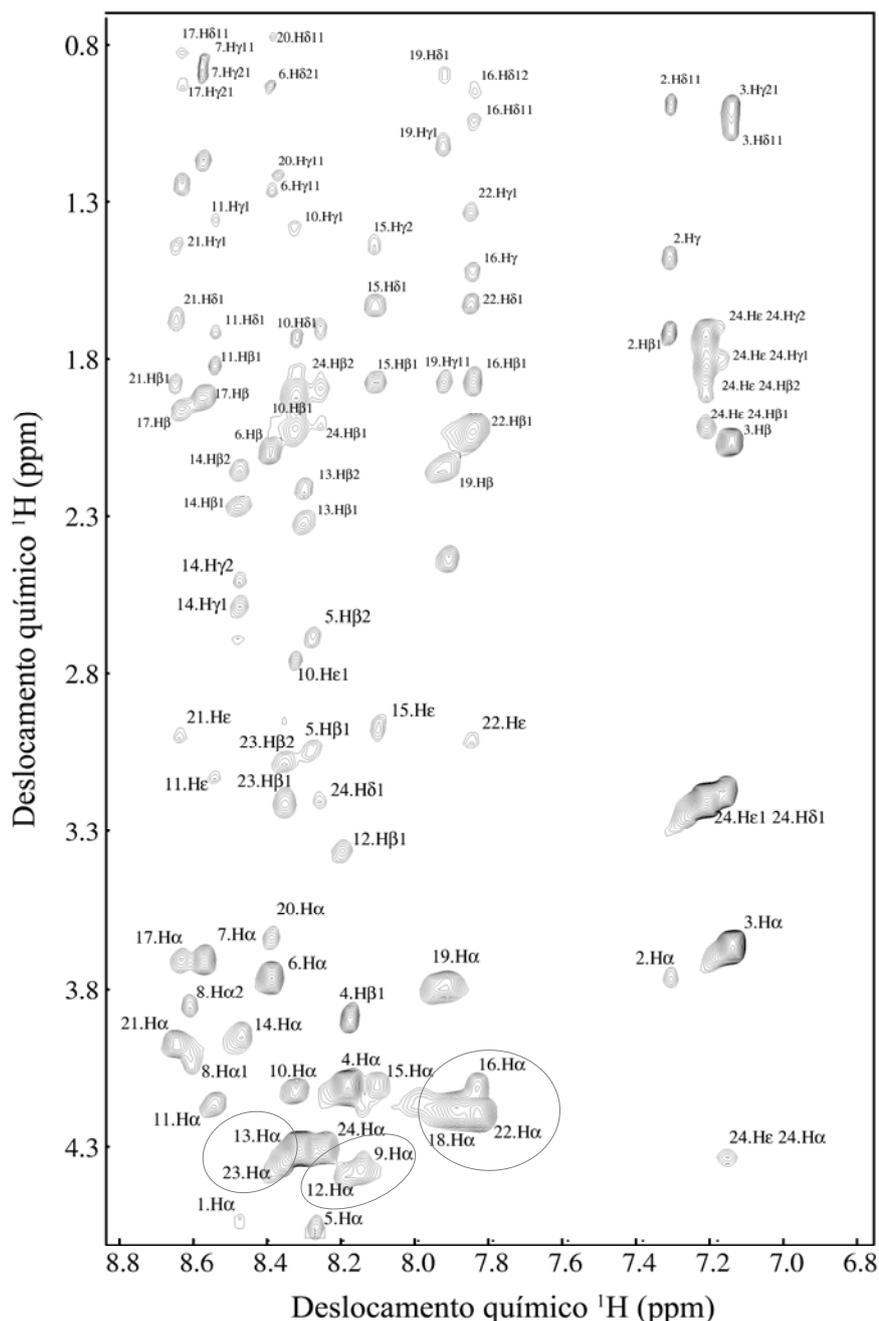


Figura 3.41 - Mapa de contornos parcial TOCSY (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-d₃₈. Os círculos indicam regiões de sobreposição.

Uma diferença marcante pode ser observada entre os mapas de contornos ¹H¹³C-HSQC-editado do monômero (Figura 3.36B, p. 109) e do dímero (Figura 3.42B, p. 117). O C_β do resíduo de Cys-23 de HMT-1 apresenta deslocamento químico de 28,7 ppm enquanto que em HMT-2, o carbono correspondente do resíduo de Cys de ambas as cadeias mostram um deslocamento químico muito maior e próximo a 36,5 ppm. Estes valores estão de acordo com estudos que revelam que C_β de resíduos de cisteína são

altamente sensíveis ao estado de oxidação do enxofre, resultando em deslocamento químico maior para o estado oxidado e menor para o estado reduzido do átomo de enxofre (Sharma e Rajarathnam, 2000), sendo esta a principal evidência da presença do dímero frente a simetria espacial entre as cadeias monoméricas de HMT-2.

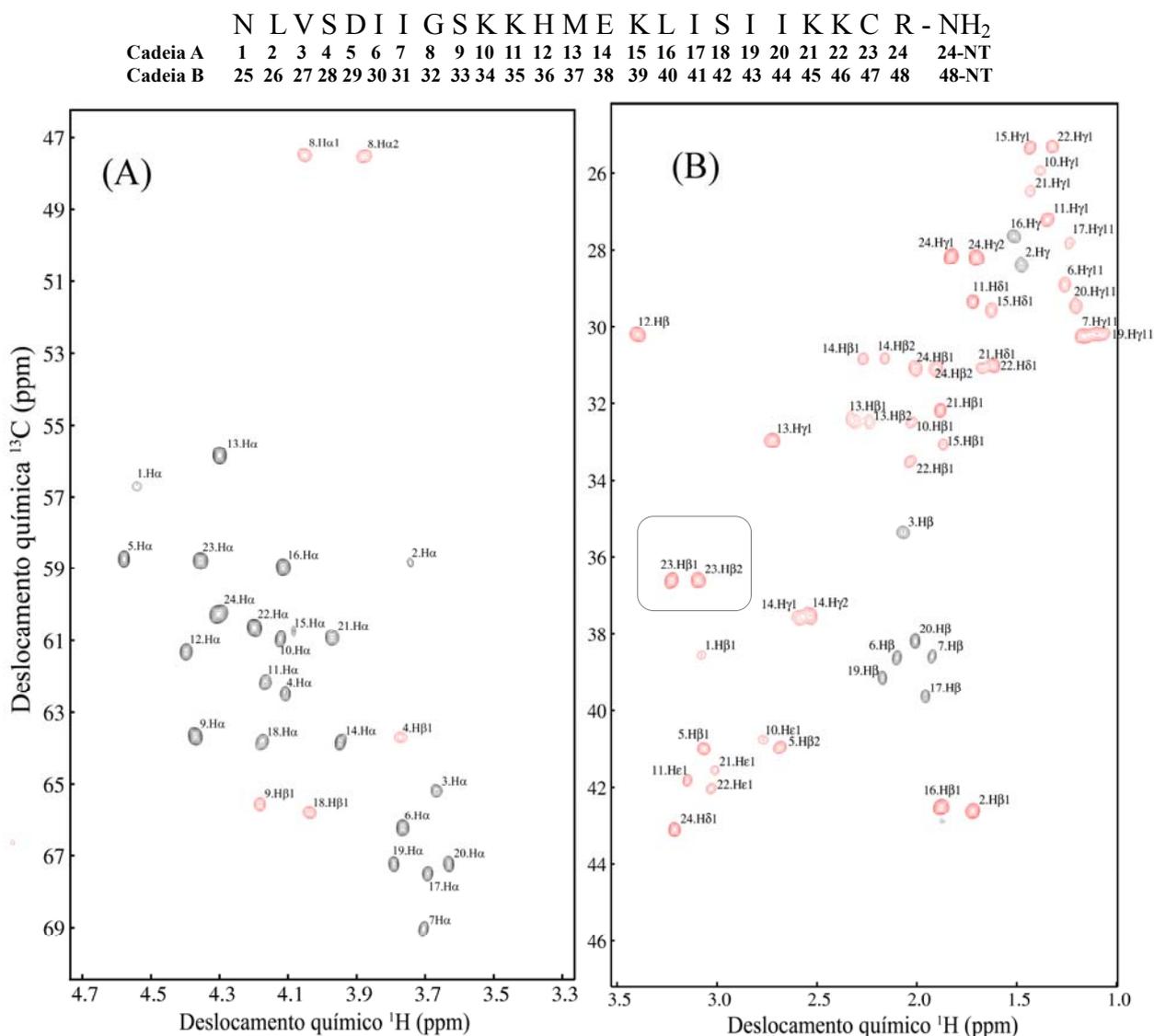


Figura 3.42 - Mapa de contornos parcial ¹H¹³C-HSQC-editado (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-d₃₈. (A) Região de acoplamentos ¹J_{HCα} e (B) Região de acoplamentos ¹J_{HC} de cadeias laterais de aminoácidos.

O mapa de contornos NOESY (Figura 3.43, p. 118) permitiu identificar as conectividades de núcleos de hidrogênio inter-residuais. A região de correlações entre núcleos de hidrogênio amídico ($d_{NM(i,i+1)}$) do mapas de contornos NOESY (Figura 3.43B) apresentou um grande número de interações sequenciais, compreendendo praticamente toda a extensão das cadeias peptídicas de HMT-2. Este tipo de interação não foi observado para os resíduos de Ile-7 e Gly-8, que apresentaram deslocamento químico de H_N muito próximos.

	N L V S D I I G S K K H M E K L I S I I K K C R - NH ₂																								
Cadeia A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24-NT
Cadeia B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	48-NT

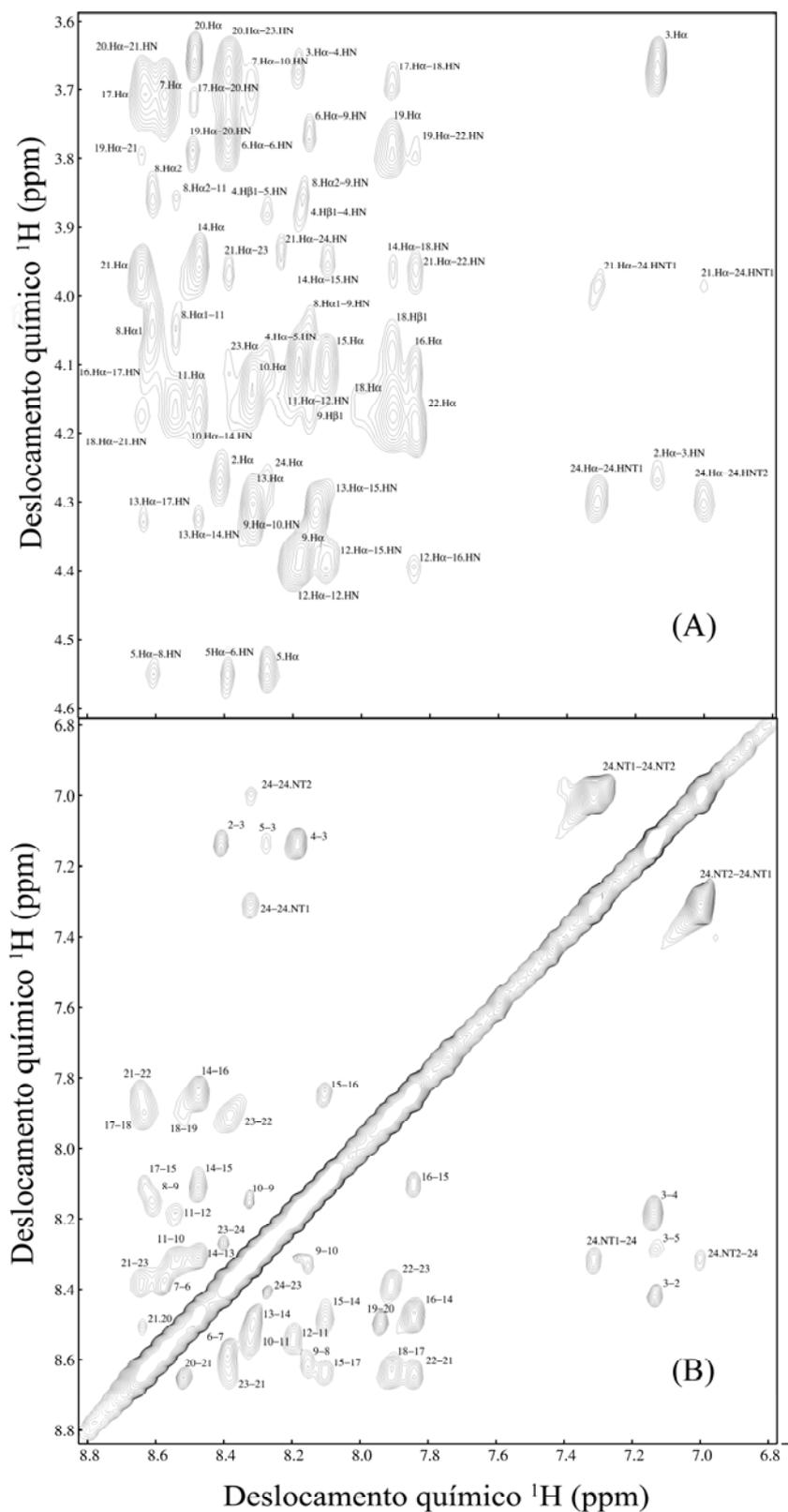


Figura 3.43 - Mapas de contornos parciais NOESY (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈. (A) Região de interação $d_{\alpha N}(i,i+n)$ (B) Região de interação $d_{NN}(i,i+n)$.

Outras conectividades características de estruturas α -helicoidais foram identificadas no mapa de contornos NOESY (Figura 3.43A, p. 118), incluindo $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, que permitem atribuições inequívocas dos resíduos mais abundante e indicam uma estrutura secundária bem definida do peptídeo em micelas de DPC- d_{38} .

Foi realizado também um experimento de $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (Figura 3.44) para estabelecer os deslocamentos químicos dos núcleos de nitrogênios amídicos. Foi possível observar uma boa dispersão destes deslocamentos químicos, concordando com a previsão de estrutura secundária obtida a partir dos espectros de CD (Figura 3.32, p. 104).

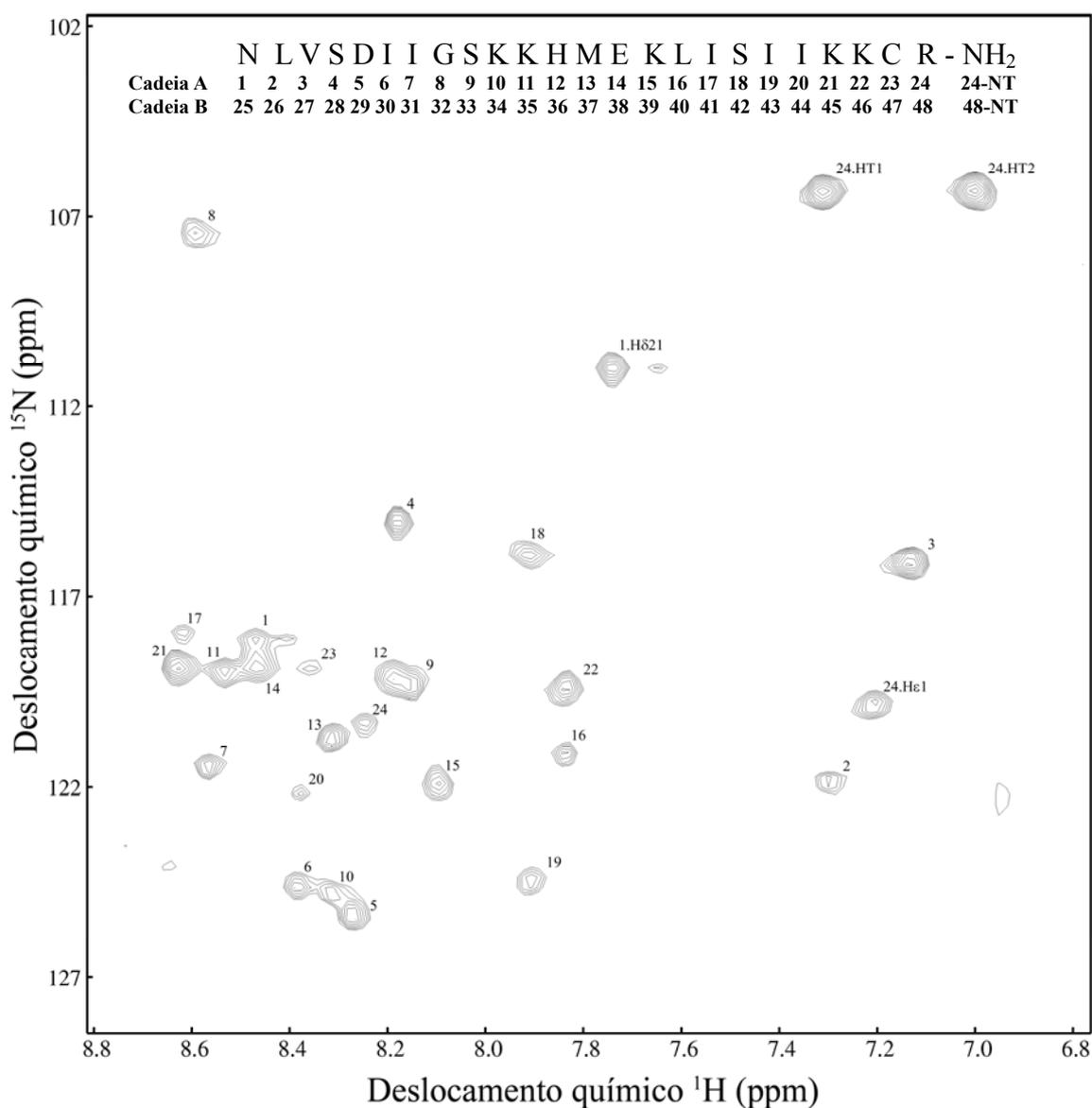


Figura 3.44 - Mapa de contornos parcial $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (600 MHz) de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38} . Região de acoplamentos $^1J_{\text{HN}}$.

A Figura 3.45 apresenta os nOes inter-residuais característicos de estrutura helicoidal observados no mapa de contornos NOESY. Assim como para HMT-1 em solução de TFE, o peptídeo dimérico apresentou uma extensão da hélice na cadeia principal na região do resíduo de Leu-2 até Arg-24, incluindo a extremidade C-terminal das cadeias A e B. Este resultado é explicitado pela continuidade das correlações $d_{\alpha N(i,i+3)}$ e $d_{\alpha N(i,i+4)}$ desde Leu-2 até Arg-24.

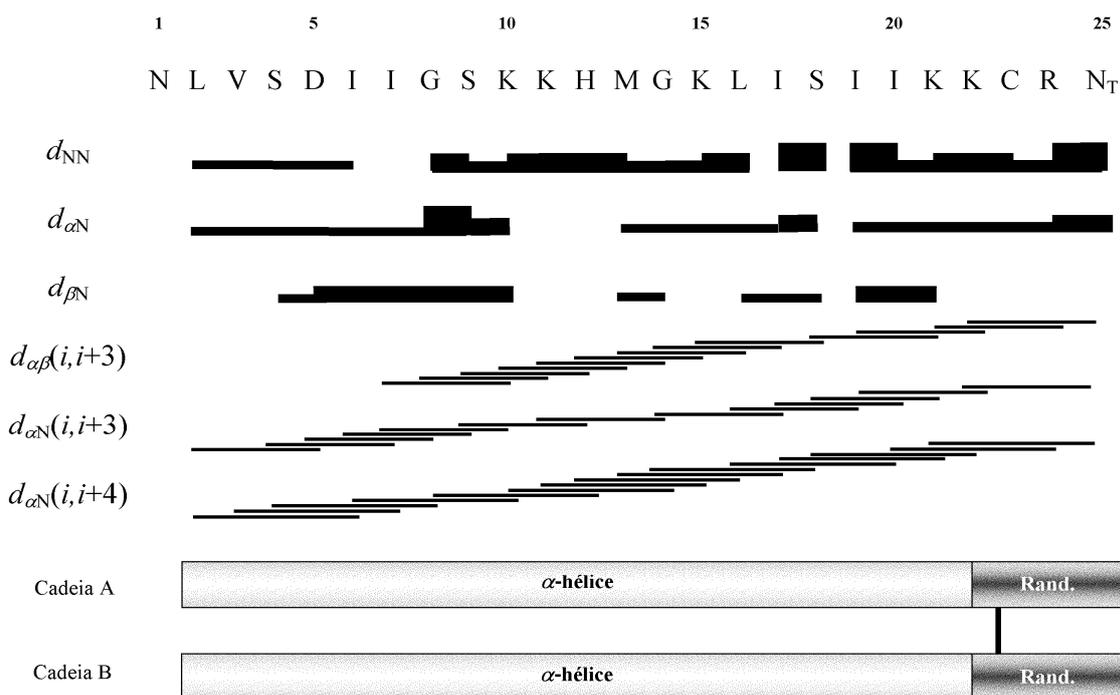


Figura 3.45 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-d₃₈. Apresentação dos assinalamentos de interações características de estrutura secundária regular presente em peptídeos. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ no diagrama estão diferenciadas como fortes, médias e fracas de acordo com a espessura das linhas. Várias interações de média distância $d_{\alpha N(i,i+3)}$, $d_{\alpha\beta(i,i+3)}$ e $d_{\alpha N(i,i+4)}$ foram observadas e estão representadas por linha finas que unem os resíduos que interagem entre si. A extensão da hélice no peptídeo está indicada nos retângulos.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de ¹H, ¹³C e ¹⁵N dos resíduos de ambas as cadeias do peptídeo HMT-2 foram atribuídos e estão listados na Tabela 3.13 (p. 121). Esses deslocamentos químicos estão de acordo com os valores médios encontrados em estruturas de α -hélice.

Tabela 3.13 - Deslocamento químico (em ppm) de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{15}N de HMT-2 em DPC- d_{38} a 400 mmol.L $^{-1}$ (600 MHz)

Resíduos	δ_{N}	$\delta_{\text{C}\alpha}$	$\delta_{\text{C}\beta}$	δ_{HN}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$ (β_1 - β_2)	$\delta_{\text{H}\gamma}$ (γ_1 - γ_2)	δ_{Outros}
cadeia A e cadeia B								
Asn-1	121,63	56,01	38,49		4,55	3,06-2,68		110,99 $N_{\delta 2}$
Leu- 2	121,77	58,00	42,61	7,30	4,20	1,95	1,62	1,00 δ_{11} -0,95 δ_{12}
Val-3	116,15	63,96	35,27	7,14	3,68	2,06	1,04-0,98	
Ser-4	115,00	61,44	62,58	8,18	4,09	3,88		
Asp-5	125,37	57,91	40,96	8,27	4,55	3,05-2,67		
Ile-6	124,65	64,95	38,62	8,38	3,77	2,09	1,60-0,87	0,93 δ_{11}
Ile-7	121,49	67,60	38,54	8,56	3,71	1,92	1,19-0,89	0,84 δ_{11}
Gly-8	107,43	47,38		8,60	3,85 4,04			
Ser-9	119,27	62,54	64,31	8,14	4,37	4,14-4,06		
Lys-10	124,80	60,00	32,38	8,32	4,13	2,02-1,92	1,38	1,73 δ_{11} -2,90 ϵ_1
Lys-11	118,98	61,15	27,10	8,54	4,16	1,95	1,35	1,84 δ_{11} -3,04 ϵ_1
His-12	120,54	60,36	30,13	8,19	4,39	3,36		
Met-13	120,68	55,17	32,35	8,29	4,32	2,32-2,22	2,70	
Glu-14	118,87	62,69	30,74	8,47	3,95	2,26-2,14	2,58-2,51	
Lys-15	121,88	59,78	32,96	8,10	4,12	2,00	1,48	1,69 δ_{11} -2,96 ϵ_1
Leu-16	121,11	58,14	42,50	7,84	4,11	1,87	1,52	0,95 δ_{11} -0,94 δ_{12}
Ile-17	118,14	66,19	39,55	8,62	3,72	1,96	1,24-0,87	0,88 δ_{11}
Ser-18	115,90	62,69	64,55	7,89	4,18	4,04		
Ile-19	124,44	65,89	39,12	7,92	3,80	2,16	1,16-0,94	0,89 δ_{11}
Ile-20	122,90	65,93	38,22	8,44	3,67	2,02	1,19-0,92	0,77 δ
Lys-21	118,88	59,98	32,12	8,64	3,98	1,93	1,44	1,69 δ_{11} -2,97 ϵ_1
Lys-22	119,42	59,74	33,43	7,84	4,18	2,00	1,45	1,65 δ_{11} -3,01 ϵ_1
Cys-23	118,90	57,94	36,55	8,35	3,94	3,32-3,25		
Arg-24	120,32	59,34	30,99	8,27	4,30	2,01-1,92	1,82-1,73	3,20 δ_{11} -7,15 ϵ

B – RMN de HMT-2 em solução 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato

O mapa de contornos TOCSY do peptídeo HMT-2 em solução tampão fosfato apresentou também boa dispersão de sinais, com sobreposições apenas daqueles relativos aos núcleos de hidrogênio dos resíduos Ile-7 /Ile-17 e Met-13 /Arg-24, sendo possível atribuí-los a quase todos os núcleos de hidrogênio não lábeis da sequência. Pôde-se observar uma grande simetria espacial entre as duas cadeias, porém não tão completa como em DPC-*d*₃₈. Alguns sinais na região de H_α-H_N como os de Leu-26 e Arg-48 foram também observados conforme mostrado na Figura 3.46.

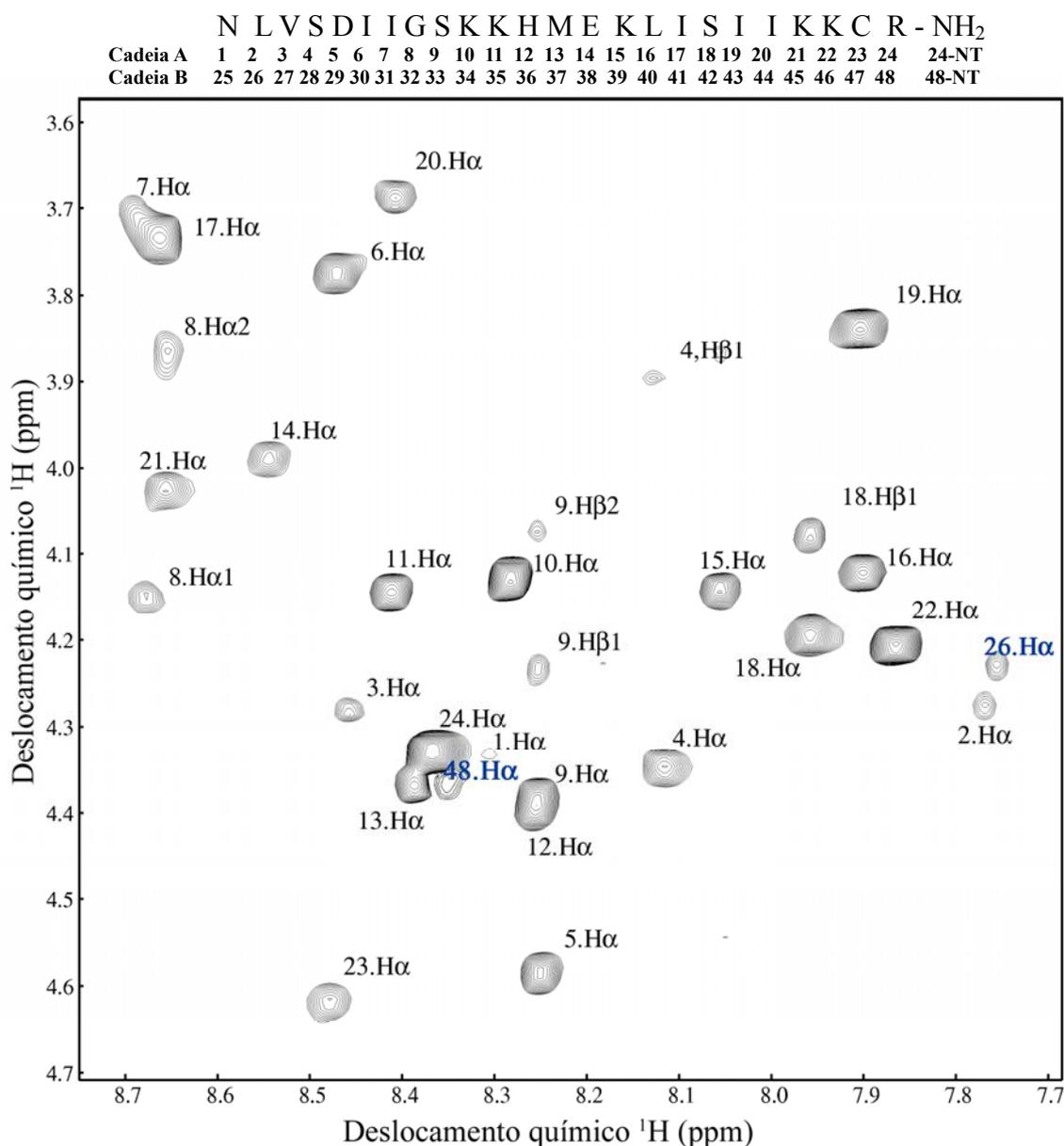


Figura 3.46 - Mapa de contornos parcial TOCSY (800 MHz) de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹ em pH 7,0.

Os sinais diferentes atribuídos respectivamente aos resíduos de Leu-2/Leu-26 e Arg-24/Arg-48, os quais estão situados em extremidades opostas da cadeia monomérica, são indicadores de diferentes orientações destes resíduos para cada uma das cadeias (Cadeia A e Cadeia B). Deve-se notar que somente após a atribuição completa dos sinais para o peptídeo (Tabela 3.15, p. 127), esses resíduos foram identificados como argininas Arg-24 (Cadeia A)/Arg-48 (Cadeia B) e Leu-2 (Cadeia A)/Leu-26 (Cadeia B) como mostrados na Figura 3.46 (p. 122). Todos os demais resíduos apresentaram deslocamentos químicos de ^1H equivalentes refletindo a grande similaridade estrutural entre as cadeias A e B do homodímero.

O mapa de contornos NOESY (Figura 3.47, p. 124) apresentou uma boa dispersão de sinais, sendo possível a atribuição inequívoca das correlações relativas às estruturas secundária e terciária do peptídeo. A similaridade relativa entre os mapas de contornos NOESY de HMT-2 em DPC- d_{38} e em solução aquosa (tampão fosfato) facilitou a atribuição das correlações entre os resíduos de aminoácidos. A observação de nOes devidos a interações do tipo $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ (Figura 3.47B, p. 124) para o intervalo de resíduos de Leu-2/Ile-6, Gly-8/Leu-16, Ile-17/Ser-18 e Ile-19/N-terminal e interações do tipo $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$ (Figura 3.47A, p. 124) atribuídas a praticamente todos os resíduos compreendidos de Asp-5/Lys-22 sugerem uma extensão contínua de estrutura helicoidal nas cadeias peptídicas de HMT-2 em solução 40 mmol.L $^{-1}$ de fosfato (Wüthrich,1986). Entretanto, no mapa de contornos NOESY de HMT-2 em solução tampão fosfato, foram observadas correlações adicionais em relação àquelas verificadas para HMT-2 na presença de micelas de DPC- d_{38} , principalmente em regiões espectrais onde são observadas interações entre cadeias laterais. A análise criteriosa destas regiões revelou a presença de nOes de longa distância (LR) devidos às interações entre as cadeias A e B de HMT-2. Estas correlações estão assinaladas em azul na Figura 3.48 (p. 125) e listadas na Tabela 3.14. As correlações 4, 5, 6, 8, 9 e 10 da Tabela 3.14 ocorrem entre resíduos que apresentaram deslocamentos químicos de ^1H equivalentes para ambas as cadeias de HMT-2 e foram atribuídas como inter-cadeias. Ao serem consideradas como correlações intra-cadeias verificou-se incompatibilidade entre elas, pois apresentaram violações de nOes, resultando em estruturas com valores de energia muito elevados ($\Delta G^\circ \geq 150 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

Tabela 3.14 - Interações de longa distância I(LR) inter-cadeias

Nº I(LR)	Cadeia A	Cadeia B	Nº I(LR)	Cadeia A	Cadeia B
1	24.HH1	46.H $_{\beta}$	6	17.H $_{\gamma 11}$	37.H $_{\epsilon 1}$
2	24.HH1	46.H $_{\gamma}$	7	7.H $_{\alpha}$	26.H $_{\beta 1}$
3	24.HH1	44.H $_{\beta}$	8	16.H $_{\gamma}$	40.H $_{\gamma 21}$
4	20.H $_{\alpha}$	40.H $_{\beta 1}$	9	7.H $_{\delta 11}$	26.H $_{\gamma}$
5	17.H $_{\alpha}$	37.H $_{\epsilon 1}$	10	10.H $_{\zeta}$	30.H $_{\alpha}$

	N L V S D I I G S K K H M E K L I S I I K K C R - NH ₂																											
Cadeia A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24-NT			
Cadeia B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	48-NT			

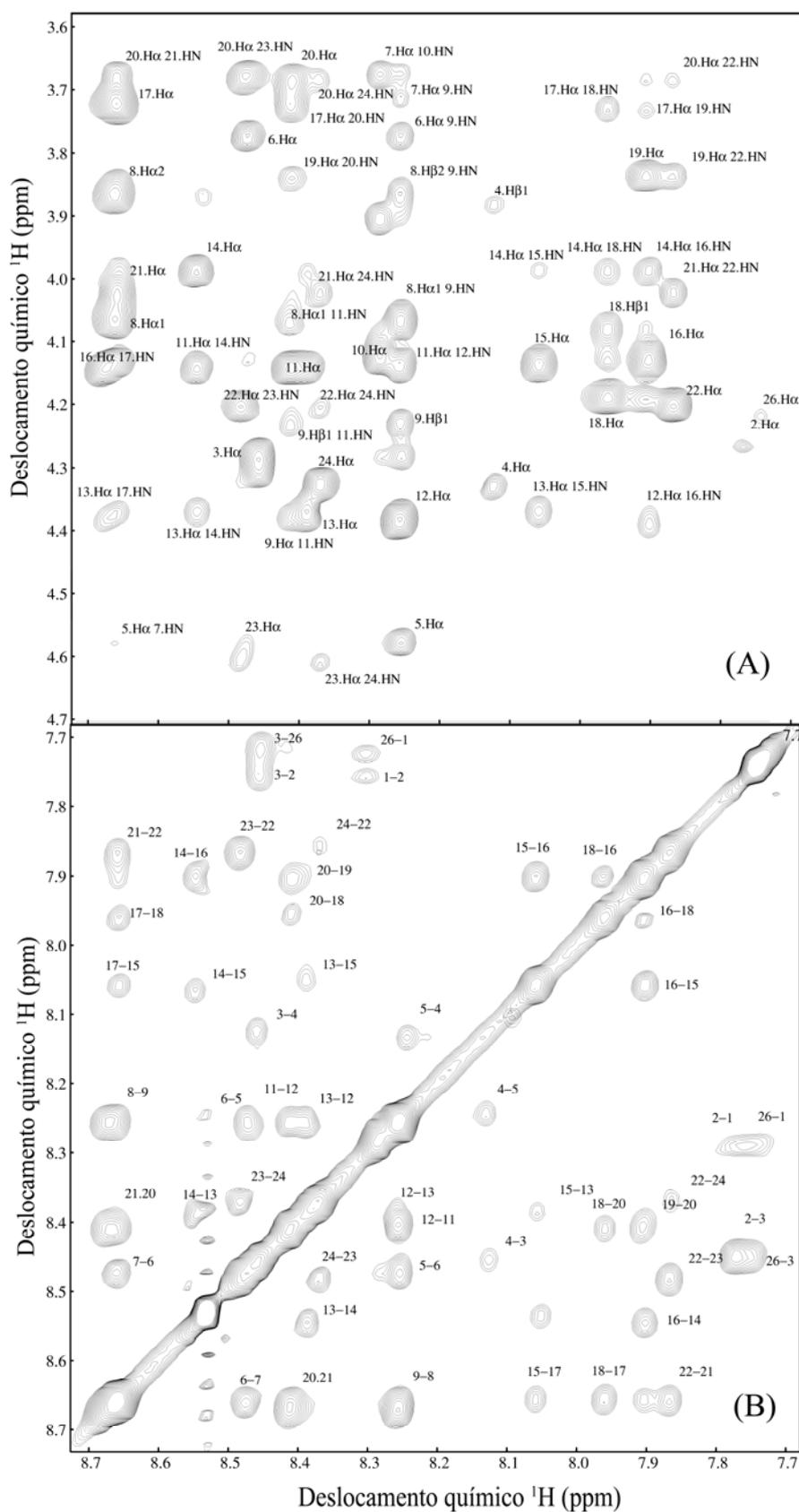


Figura 3.47 - Mapas de contornos parciais NOESY (800 MHz) de HMT-2 em solução 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato. (A) Região de interação $d_{\alpha N}(i, i+n)$ (B) Região de interação de interação $d_{NN}(i, i+n)$.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24-NT
Cadeia A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24-NT
Cadeia B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	48-NT

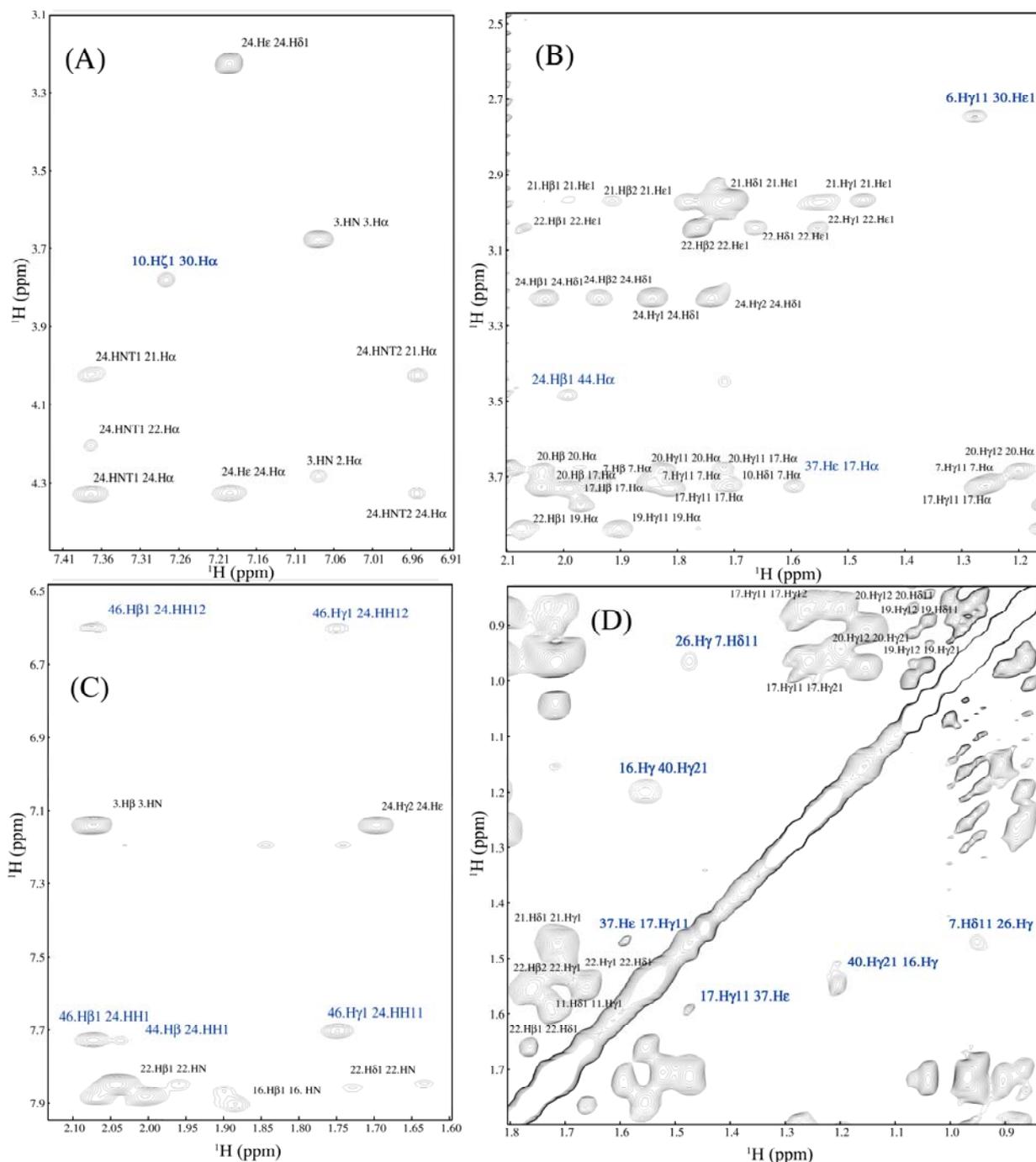


Figura 3.48 - Mapas de contornos NOESY (800 MHz) parciais das interações intercadeias de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹ em pH 7,0. As interações assinaladas em azul correspondem às interações de longas distâncias inter-cadeias.

Estas correlações apresentadas na Tabela 3.14 (p. 123) são observadas em regiões onde não há sobreposições de sinais, podendo ser atribuídas inequivocamente. Dentre elas, devem-se ressaltar as interações entre os resíduos Arg-24/Ile-44 (Figura 3.48C) e Ile-7/Leu-26 (Figura 3.48D), que envolvem resíduos que apresentaram

sinais duplicados, possibilitando diferenciar entre Arg-24 e Arg-48 e também entre Leu-2 e Leu-26.

Todos os nOes devidos à interações inter-residuais foram resumidos graficamente na Figura 3.49. Em geral, as conectividades são praticamente as mesmas observadas em micelas de DPC- d_{38} (Figura 3.45, p. 120), sendo as diferenças principais as ausências de conectividades do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha N}(i,i+4)$ para Leu-2, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ entre resíduos da extremidade N-terminal (Leu-2, Val-3, Ser-4, Asp-5, Ile-6), bem como a presença de nOes de longa distância entre as cadeias A e B (linhas tracejadas na (Figura 3.49) Tais interações de nOes de longa distância estão listadas na Tabela 3.14 (p. 123).

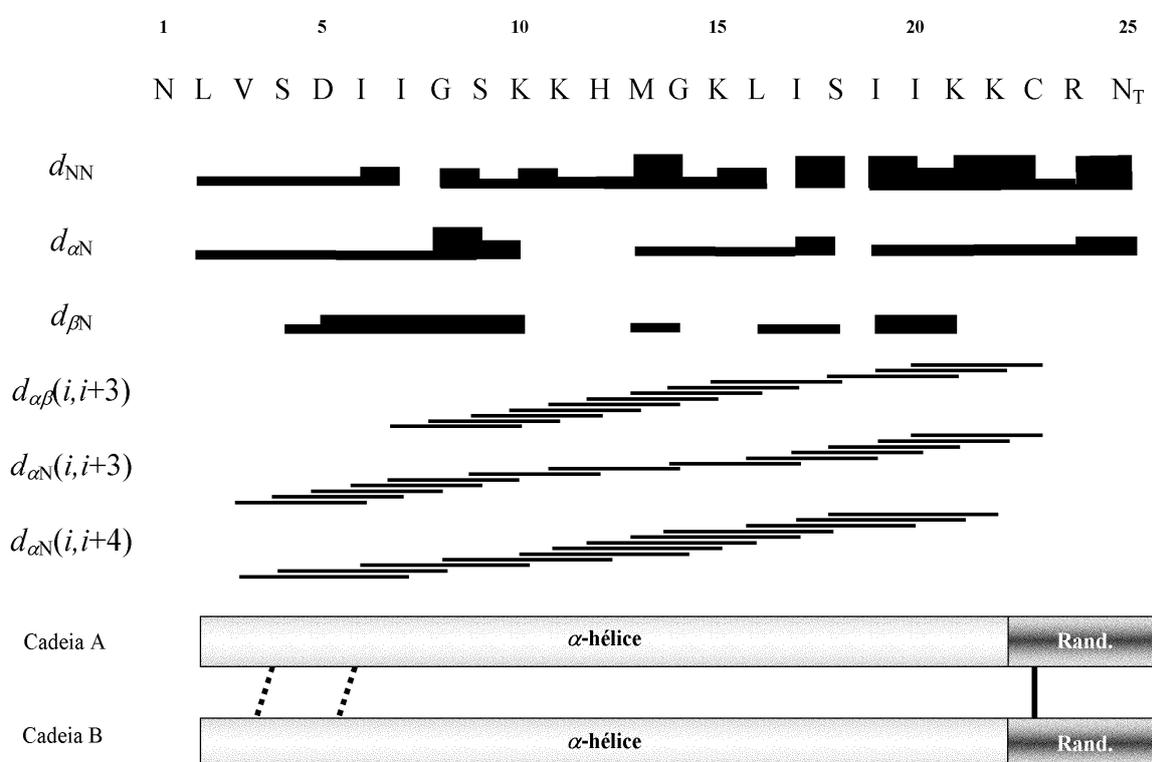


Figura 3.49 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹: Apresentação dos assinalamentos de interações características de estrutura secundária regular presente em peptídeos. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ no diagrama estão diferenciadas como fortes, médias e fracas de acordo com a espessura das linhas. Várias interações de média distância $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ foram observadas e estão representadas por linha finas que unem os resíduos que interagem entre si. A extensão da hélice no peptídeo está indicada nos retângulos.

A Tabela 3.15 (p. 127) apresenta os deslocamentos químicos dos núcleos de ¹H, ¹³C e ¹⁵N de HMT-2 em solução tampão fosfato. Com exceção dos resíduos de Asn-25, não identificado, e de Leu-26 e Arg-48, os deslocamentos químicos foram idênticos tanto para a cadeia A quanto para a cadeia B.

Tabela 3.15 - Deslocamentos químicos (em ppm) de ^1H , ^{13}C e ^{15}N de HMT-2 em 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato (800 MHz)

Resíduo	δ_{N}	$\delta_{\text{C}\alpha}$	$\delta_{\text{C}\beta}$	δ_{HN}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$ (β_1 - β_2)	$\delta_{\text{H}\gamma}$ (γ_1 - γ_2)	δ_{Outros}
Cadeia A								
Asn-1	121,65	56,89	38,99		4,44	3,44-2,94		
Leu- 2	122,12	57,78	44,01	7,57	4,28	1,94	1,57	0,97 δ_{11} -0,97 δ_{21}
Val-3	115,87	63,62	34,77	8,01	3,76	2,06	0,99-0,95	
Ser-4	116,11	61,73	62,48	8,14	4,28	4,08-4,07		
Asp-5	125,07	58,15	41,06	8,25	4,58	3,21-2,99		
Ile-6	125,08	66,05	38,09	8,45	3,77	2,12	1,50-0,97	0,92 δ_{11}
Ile-7	121,00	67,02	38,32	8,65	3,72	1,81	1,53-0,89	0,86 δ_{11}
Gly-8	109,38	48,01		8,66	4,14 3,87		1,22	
Ser-9	118,74	62,34	63,98	8,25	4,37	4,19-4,07		
Lys-10	124,12	60,63	32,86	8,28	4,13	2,08-1,92	1,55	1,72 δ_{11} -3,78 ϵ_1
Lys-11	119,32	61,72	27,54	8,46	4,15	2,04	1,53	1,82 δ_{11} -3,05 ϵ_1
His-12	121,03	59,92	29,93	8,25	4,40	3,47		
Met-13	120,80	55,74	32,43	8,36	4,37	2,34-2,26	2,73	
Glu-14	119,17	63,11	30,41	8,57	3,99	2,32-2,20	2,69-2,41	
Lys-15	121,54	59,32	32,16	8,05	4,13	2,06	1,54	1,77 δ_{11} -2,98 ϵ_1
Leu-16	121,55	57,03	42,20	7,90	4,13	1,88	1,52	0,95 δ_{11} -0,92 δ_{12}
Ile-17	120,05	67,34	40,71	8,65	3,72	1,97	1,48-0,95	0,85 δ_{11}
Ser-18	118,00	63,09	64,76	7,95	4,19	4,08		
Ile-19	124,54	65,99	39,15	7,92	3,84	2,19	1,68-1,16	0,90 δ_{11}
Ile-20	123,00	66,73	37,52	8,45	3,68	2,04	1,82-1,19	0,86 δ_{11}
Lys-21	120,18	59,54	31,76	8,65	4,03	1,95-1,94	1,46	1,70 δ_{11} -2,98 ϵ_1
Lys-22	120,72	60,87	34,19	7,86	4,20	2,02	1,55	1,69 δ_{11} -3,03 ϵ_1
Cys-23	119,10	57,57	37,71	8,44	4,34	3,28-3,26		
Arg-24	120,40	60,00	30,90	8,42	4,32	2,03-1,94	1,80-1,73	3,22 δ_{11} -7,19 ϵ_1
Cadeia B								
Leu-26	121,56	57,87	42,33	7,77	4,27	1,97	1,39	0,83 δ_{11}
Arg-48	120,55	59,62	31,07	8,34	4,38	2,05-1,89	1,80-1,71	3,19 δ 7,15 ϵ

3.2.4 Determinação das estruturas tri-dimensionais a partir de dados de RMN

Após as atribuições das estruturas analisadas por RMN, as correlações de nOes foram convertidas em distâncias semi-quantitativas e os deslocamentos químicos utilizados para obtenção de ângulos diedros. Com estes dados foram construídas listas, contendo restrições intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD). A Tabela 3.16 mostra o número de restrições de cada conjunto de dados obtidos por RMN.

Tabela 3.16 - Número de restrições totais R(T), restrições intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN

Peptídeo/Meio	Nº de R(T)	Nº de R(IR)	Nº de R(SQ)	Nº de R(MR)	Nº de R(LR)	Nº de R(AD)
HMT-1/TFE	481	261	103	78	0	39
HMT-2/DPC	712	399	139	98	0	76
HMT-2/Tampão	721	396	141	114	15	70

A determinação estrutural dos peptídeos em cada meio foi realizada utilizando-se os conjuntos de restrições geométricas apresentados na Tabela 3.16, que foram analisados previamente pela programa *Queen* (Nabuurs *et al.*, 2003) para determinação do conteúdo de informação em cada conjunto de restrições. Os resultados desta análise podem ser observados na Figura 3.50 (p. 130) e mostram que, dentre todas as restrições, somente algumas apresentaram valores atípicos, com limites de distância superiores a 5,00 Å, e estão apresentadas na Tabela 3.17 (p. 129). Essas são restrições que apresentaram valores elevados de unicidade (I_{uni}) ou informação média (I_{med}).

Analisando-se primeiramente o conjunto de restrições obtido para HMT-1 em solução isotrópica de TFE/H₂O 30:70 v/v, apenas as restrições R_1 , R_2 , R_3 e R_4 (Tabela 3.17) apresentaram valores elevados de I_{uni} ($I_{uni} > 1$), sendo todos devidos apenas a sinais de nOes e não a ângulos diedros (Figura 3.50A, p. 130). Estas restrições apresentaram valores elevados de I_{uni} , pois foram originadas de nOes que puderam ser atribuídos somente em um dos lados da diagonal no mapa de contornos NOESY, devido à interferência do solvente TFE. Entretanto, estas mesmas restrições apresentam-se agrupadas e com baixos valores de I_{med} , portanto não exercem grandes impactos sobre as estruturas calculadas (Figura 3.50B, p. 130) e, por isso, foram mantidas para os cálculos de dinâmica molecular.

Tabela 3.17- Relação das restrições que apresentaram valores elevados de informação única (I_{uni}) e média (I_{med}) para HMT-1 e HMT-2 em meios diferentes

Peptídeo/Meio	R(tipo de restrição)	Correlação
HMT-1/TFE	R_1 (MR)	$7.H_\alpha - 10.H_{\beta 1}$
	R_2 (MR)	$14.H_\alpha - 17.H_\beta$
	R_3 (MR)	$17.H_\alpha - 20.H_\beta$
	R_4 (MR)	$19.H_\alpha - 22.H_{\beta 1}$
HMT-2/DPC	R_5 (MR)	$10.H_\alpha - 14.H_N$
	R_6 (MR)	$16.H_\alpha - 20.H_N$
	R_7 (MR)	$34.H_\alpha - 37.H_{\beta 1}$
	R_8 (MR)	$40.H_\alpha - 44.H_N$
	R_9 (MR)	$34.H_{\gamma 1} - 37.H_{\epsilon 1}$
HMT-2/Tampão	R_{10} (LR)	$24.HH1 - 46.H_\beta$
	R_{11} (LR)	$24.HH1 - 46.H_\gamma$
	R_{13} (LR)	$24.HH1 - 44.H_\beta$
	R_{14} (LR)	$20.H_\alpha - 40.H_{\beta 1}$
	R_{15} (LR)	$17.H_\alpha - 37.H_{\epsilon 1}$
	R_{16} (LR)	$17.H_{\gamma 1} - 37.H_{\epsilon 1}$
	R_{17} (LR)	$7.H_\alpha - 26.H_{\beta 1}$
	R_{18} (LR)	$16.H_\gamma - 20.H_{\gamma 2}$
	R_{19} (LR)	$7.H_{\delta 1} - 26.H_\gamma$
	R_{20} (LR)	$10.H_\zeta - 30.H_\alpha$

MR = média distância, LR = longa distância

A análise do conjunto de dados de HMT-2 em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈ mostra que os sinais de nOe que originaram as restrições R_5 , R_6 , R_7 e R_8 (Tabela 3.17) apresentaram também valores elevados de I_{uni} (Figura 3.50C, p. 130) pelos mesmos motivos apresentados anteriormente (p. 128), e os valores de I_{med} (Figura 3.50D, p. 130) se apresentaram baixos. Por outro lado, a restrição R_9 apresentou valores elevados de I_{uni} e I_{med} e a correlação correspondente precisou ser reanalisada no mapa de contornos NOESY. O grau elevado de informações contidas nessa restrição deve-se à probabilidade considerável de que o sinal seja artefato ou resultado de difusão de *spin*, não estando relacionado com alguma informação estrutural. Os experimentos de NOESY com tempos de mistura diferentes confirmaram que essa correlação corespondente a R_9 é devida ao fenômeno (ou efeito) de difusão de *spin*. Neste caso, R_9 foi removida do conjunto de restrições para o cálculo estrutural de HMT-2 em DPC-*d*₃₈ empregando dinâmica molecular.

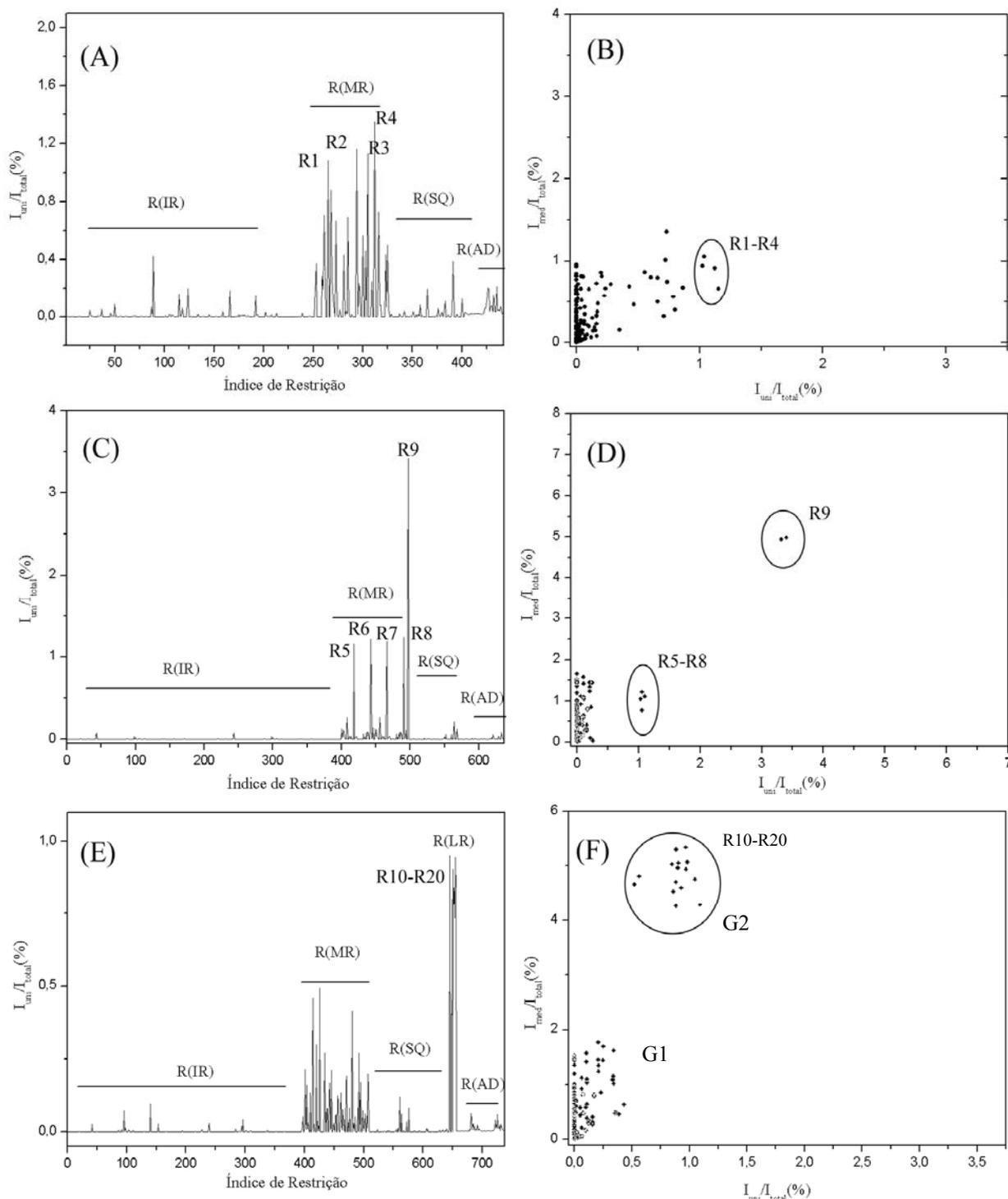


Figura 3.50 - Gráficos de unicidade (I_{uni}) pelo índice de cada restrição (coluna da esquerda) e gráficos de informação média (I_{med}) por informação única (I_{uni}) para HMT-1 e HMT-2. (A e B) restrições de HMT-1 em solução de TFE/H₂O 30/70 v/v; (C e D) restrições de HMT-2 em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC e (E e F) restrições de HMT-2 em solução 40 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato .

A análise do conjunto de restrições de HMT-2 em solução aquosa (tampão fosfato) revelou que os sinais de nOes inter-cadeias (Figura 3.50E, p. 130) que originaram as restrições R(LR) (R_{10} a R_{20} , Tabela 3.17, 129) apresentaram valores baixos

de I_{uni} , pois foram atribuídos em ambos os lados da diagonal do NOESY, porém essas restrições apresentaram altos valores de I_{med} . É importante chamar a atenção para dois agrupamentos diferentes na Figura 3.50F (p. 130), destacados como grupos $G1$ e $G2$. Em $G1$ estão agrupados praticamente todas as restrições encontradas para HMT-2 em solução tampão, enquanto que, em $G2$, encontram-se apenas R(LR), representadas na Tabela 3.17 (p. 129). Apesar de $G2$ apresentar altos valores de I_{med} , estes não indicam necessariamente que as restrições que o constituem sejam provenientes de atribuições equivocadas ou de artefatos do espectro. Essas restrições foram as únicas restrições inter-cadeia encontradas e que, por consequência, são as únicas responsáveis pela orientação de uma cadeia em relação à outra. Logo, essas restrições contribuem unicamente para definição de uma estrutura quaternária (orientação de uma cadeia em relação à outra), enquanto as demais restrições contribuem para a estrutura secundária de cada cadeia.

Após a análise de cada conjunto de restrições (HMT-1/TFE, HMT-2/DPC e HMT-2/Tampão), estas foram submetidas a cálculos de dinâmica molecular no programa Xplor-NIH, de onde foram obtidas 200 conformações para cada conjunto de restrições. Os parâmetros de qualidade estrutural foram obtidos pelo servidor *iCing*, utilizando-se os programas PROCHECK. A seguir estes resultados serão apresentados para cada peptídeo separadamente.

3.2.4.1 Estruturas calculadas para o peptídeo HMT-1

A Figura 3.51A (p. 132) mostra as estruturas mais estáveis obtidas do cálculo de dinâmica molecular. Neste ambiente isotrópico de TFE/H₂O, o peptídeo HMT-1 apresenta uma estrutura em α -hélice em praticamente toda a extensão da cadeia peptídica (Figura 3.51B), sendo esta hélice linear.

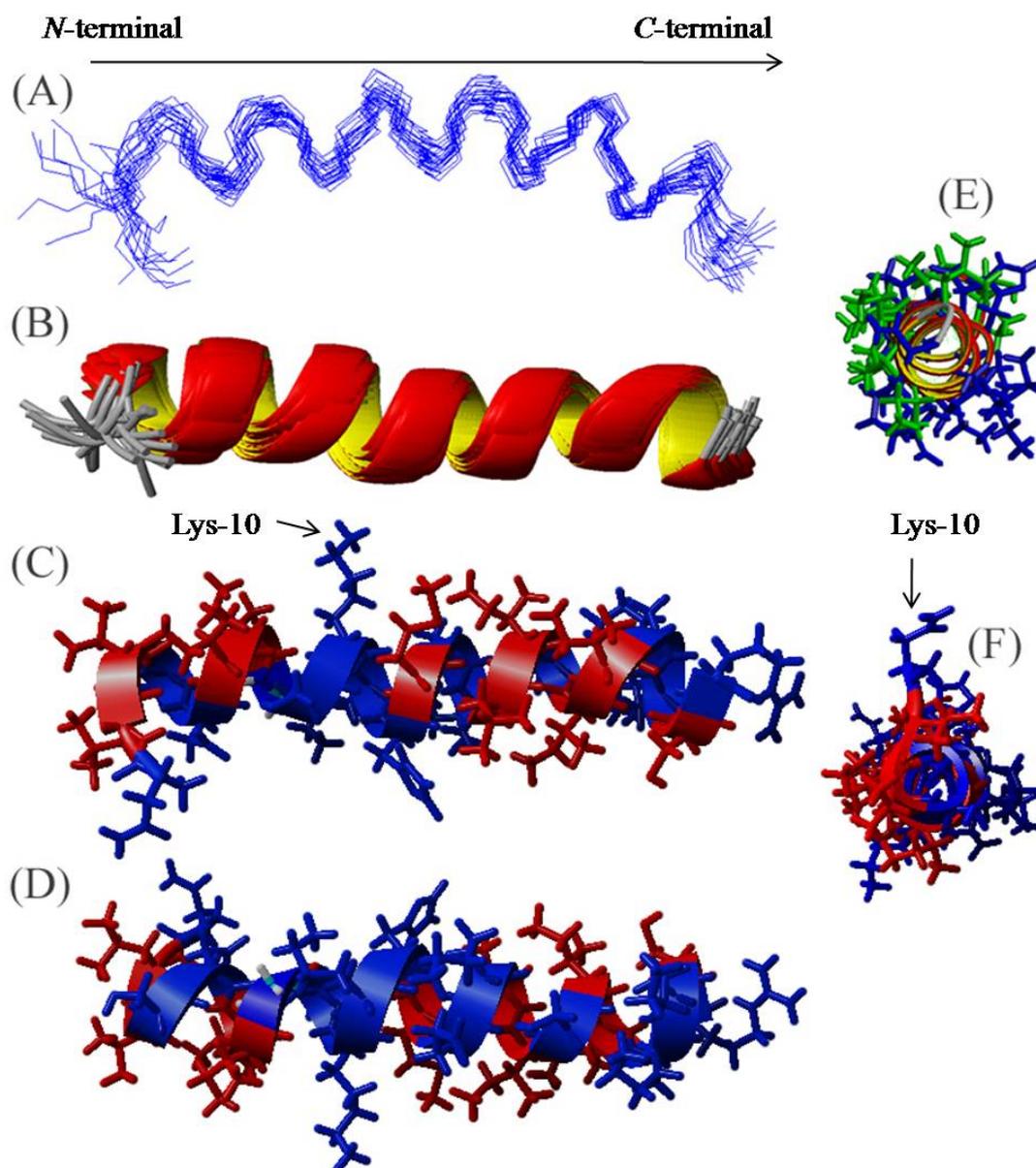


Figura 3.51- Estruturas calculadas de HMT-1 em TFE/H₂O (70/30, v/v) a partir de dados de RMN. (A) Sobreposição da cadeia principal das estruturas mais estáveis, do resíduo 1 ao 24; (B) Estruturas mais estáveis com estrutura em α -hélice; (C) Face hidrofílica saindo do plano, com resíduos de aminoácidos apolares em vermelho; (D) Face hidrofílica saindo do plano, com resíduos polares em azul; (E) Demonstração frontal da hélice (azul polares e verde apolares) (F) Demonstração frontal da hélice (azul polares e vermelho apolares).

A extremidade *C*-terminal apresenta uma maior estabilização da estrutura helicoidal em relação à extremidade *N*-terminal. O peptídeo apresenta também um caráter anfipático relativo com uma face hidrofílica (região em vermelho na Figura 3.51C) e outra hidrofóbica (região em azul Figura 3.51D). A anfipaticidade não é perfeita devido à presença de um resíduo de Lisina (Lys-10) na face hidrofóbica da hélice. O gráfico de Ramachandran (Figura 3.52, p. 133) mostra a coerência das

distribuições de ângulos de torção do peptídeo em relação a outros ângulos de várias proteínas depositadas em banco de dados e os resultados estão descritos na (Tabela 3.18, p. 134). Pode-se verificar que 96,9% dos resíduos estão na região permitida, 2,6% estão em outras regiões permitidas e apenas 0,5% dos resíduos encontram-se em região não permitida. Como pode ser observado na Figura 3.52 Leu-2 é o único resíduo que se encontra em regiões não-permitidas, pois se situa na extremidade *N*-terminal onde não ocorre a estabilização da hélice. Os valores de RMSD destas estruturas foram de 0,89 Å para toda a cadeia peptídica e 0,67 Å para o segmento helicoidal.

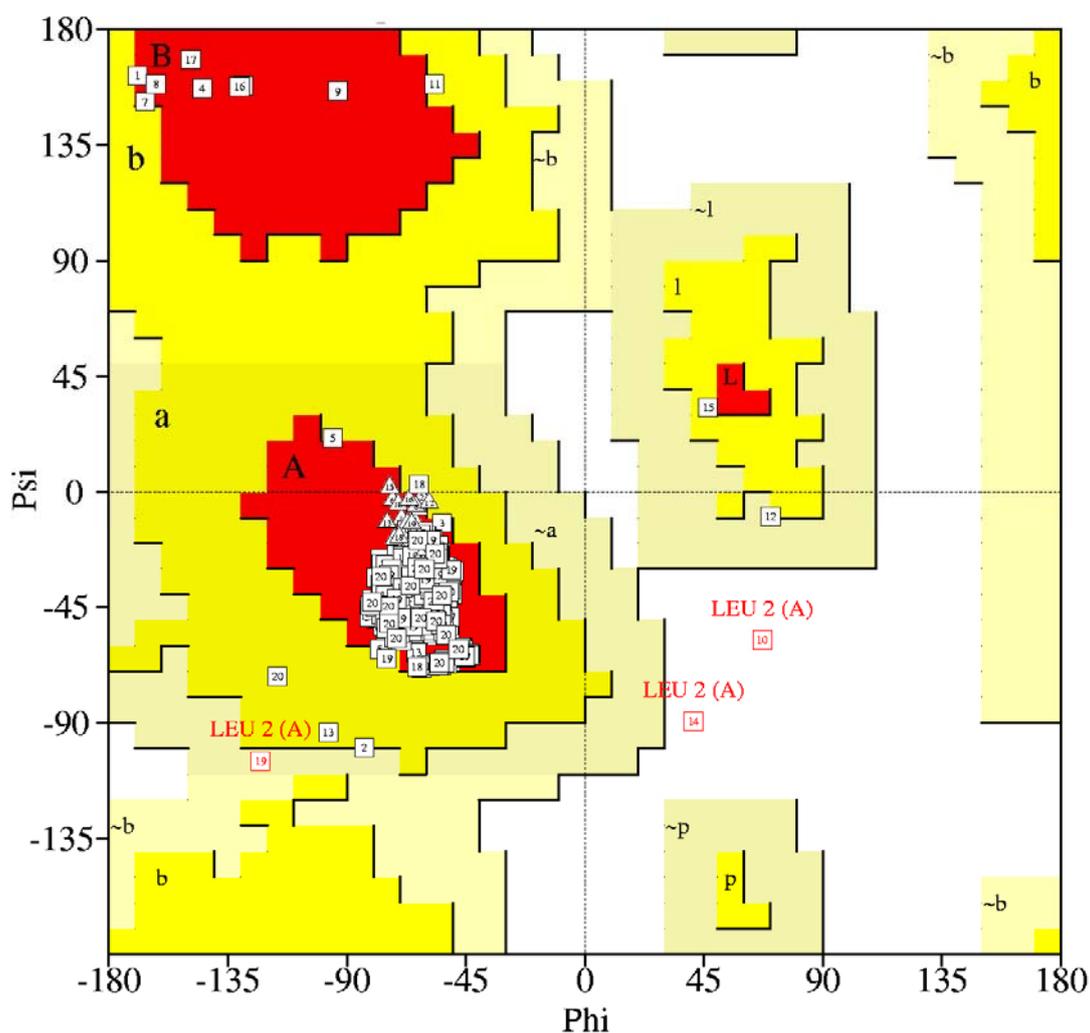


Figura 3.52 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de HMT-1 em solução de TFE/H₂O. Regiões favorecidas [A,B,L], regiões permitidas [a, b, l, p] e regiões menos permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]. As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões em amarelo escuro indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em amarelo claro indica estruturas pouco flexíveis.

Tabela 3.18 - Dados dos cálculos estruturais de HMT-1 em TFE/H₂O

Restrições de nOe	
RMSD – Todos os resíduos ^a	
Cadeia principal	0,89 Å
Cadeia principal e átomos pesados	1,58 Å
RMSD– Seguimento helicoidal ^{a, b}	
Cadeia principal	0,67 Å
Cadeia principal e átomos pesados	1,30 Å
Análise gráfica por Ramachandran ^a	
Resíduos em região favorecidas	96,9%
Resíduos em regiões permitidas	2,4%
Resíduos em regiões menos permitidas	0,2%
Resíduos em regiões não permitidas	0,5%

a-Dados do programa MOLMOL; b- Dados de L-2 a C-23

3.2.4.2 Estruturas calculadas para o peptídeo HMT-2 em solução micelar de DPC-*d*₃₈

O conjunto com as 20 estruturas mais estáveis calculadas para HMT-2 em DPC-*d*₃₈ está representado na Figura 3.53A (p. 135). Apesar de a lista de restrições ser consistente, considerando-se os teores de informação, as restrições de distância não foram suficientes para definir uma orientação relativa para as duas cadeias como um todo (Figura 3.53A). No entanto, a sobreposição individual das cadeias mostra que elas, quando consideradas separadamente, apresentam-se bem definidas e com valores baixos de RMSD de 0,67 Å e 0,65 Å para as cadeias A e B, respectivamente. Para a homotarsinina como um todo, foi observado um valor de RMSD de 3,57 Å, valor bastante alto, devido à ausência de orientação entre as cadeias, o que mostra que, neste ambiente de membrana, o peptídeo encontra-se em uma estrutura aberta, podendo interagir com uma superfície maior da micela (Figura 3.53B e C).

Ambas as cadeias apresentaram uma maior desordem na extremidade *N*-terminal comparada ao peptídeo HMT-1 em solução de TFE e um menor caráter anfipático das cadeias. Além disto, foi possível verificar uma dobra sutil na região de Ile-6 e Ile-7, sugerindo uma leve inserção da extremidade *N*-terminal nas micelas de DPC-*d*₃₈.

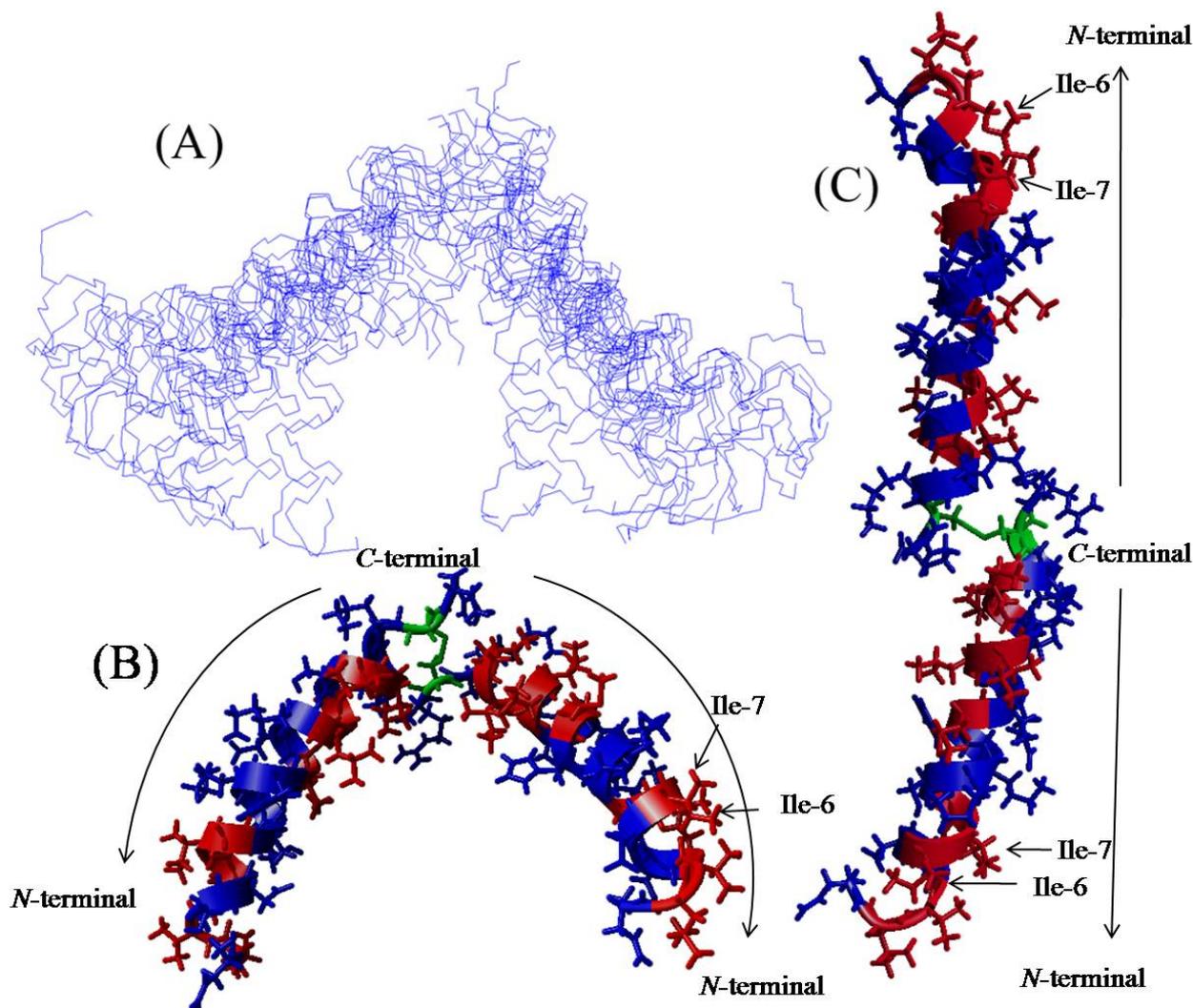


Figura 3.53 - Estruturas calculadas de HMT-2 em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ DPC a partir de dados de RMN. (A) Sobreposição da cadeia principal das estruturas mais estáveis do resíduo 1 ao resíduo 48; (B) estrutura com menor abertura entre as cadeias monoméricas; (C) estrutura com maior abertura entre as cadeias monoméricas. Em vermelho estão representados os resíduos apolares, em azul os polares e em verde as cadeias laterais de resíduos de cisteína.

O conjunto das 20 estruturas mais estáveis foi submetido à validação pelo programa PROCHEK, conforme mostrado no diagrama de Ramachandran na Figura 3.54 (p. 136). O diagrama possibilita outra visão da qualidade do conjunto calculado e os dados estão resumidos na Tabela 3.19 (p. 136). Os pontos encontram-se agregados na região típica de α -hélice, sendo que 89,6% encontram-se nas regiões mais favorecidas do diagrama, 10% estão situados em regiões permitidas e 1,4% encontra-se em regiões não permitidas. É importante notar que o valor elevado para regiões não permitidas deve-se apenas aos resíduos de Cys de ambas as cadeias, mostrando uma dinâmica elevada nesta região do peptídeo, na qual ocorre a ligação entre as cadeias.

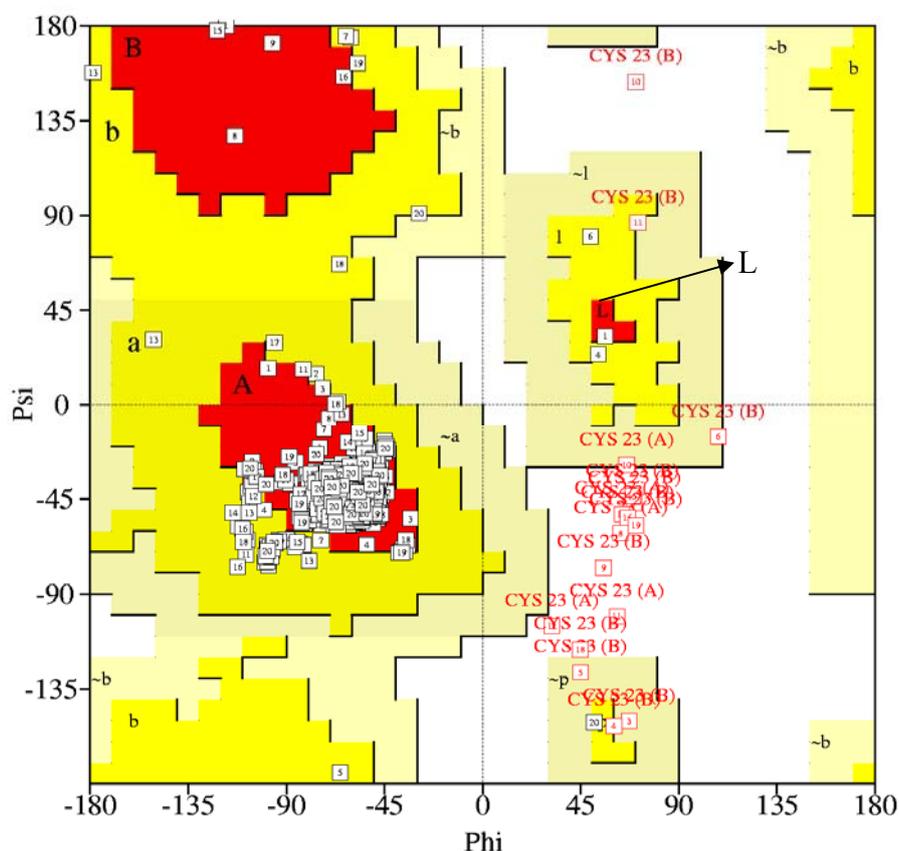


Figura 3.54 - Gráfico de Ramachandran para as vinte estruturas mais estáveis de HMT-2 em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ de DPC-d₃₈. Regiões favorecidas [A,B,L], regiões permitidas [a, b, l, p] e regiões menos permitidas [~a, ~b, ~l, ~p]. As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões em amarelo escuro indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em amarelo claro indica estruturas pouco flexíveis.

Tabela 3.19 - Dados dos cálculos estruturais de HMT-2

Restrições de nOe	Sistema	
	DPC	Tampão
RMSD- Todos os resíduos ^a		
Cadeia principal	3,57 Å	0,98 Å
Cadeia principal e átomos pesados	4,58 Å	1,20 Å
RMSD- Seguimento helicoidal ^{a, b}		
Cadeia principal	3,03 Å	0,93 Å
Cadeia principal e átomos pesados	4,50 Å	1,18 Å
Análise gráfica por Ramachandran ^a		
Resíduos em região favorecidas	89,6%	94,6%
Resíduos em regiões permitidas	8,3%	4,8%
Resíduos em regiões menos permitidas	0,7%	0,6%
Resíduos em regiões não permitidas	1,4%	0%

a- Dados do programa MOLMOL; b- Dados de Leu-2 a Cys-23

3.2.4.3 Estrutura calculada para o peptídeo HMT-2 em solução tampão fosfato

O conjunto das 20 estruturas mais estáveis calculadas encontra-se representado na Figura 3.55A (p. 138), bem como a estrutura de menor energia, com suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias explicitadas (Figura 3.55B), sendo percebidas grandes regiões de α -hélices em cada cadeia (A e B), além de uma orientação simétrica entre ambas para formar uma estrutura quaternária do tipo “super hélice”. A estrutura apresenta uma anfipaticidade alta com os resíduos hidrofóbicos concentrados no seu interior e os resíduos hidrofílicos situados na superfície externa da molécula (Figura 3.55D). No interior da estrutura, predominantemente apolar, encontram-se ainda três resíduos de aminoácidos polares (Asp-5, Ser-9 e Lys-34) (Figura 3.55C). Estes resíduos apresentam papel fundamental na estabilização da estrutura super hélice de HMT-2. A Figura 3.55E mostra a proximidade dos resíduos devida a ligações de hidrogênio que estão representadas em amarelo. O resíduo de Asp-5 (vermelho) pode apresentar ainda atração eletrostática com resíduo de Lys-34 (laranja), favorecendo ainda mais a proximidade destes sítios da cadeia peptídica. Os resíduos de glicina (Gly-10 e Gly-34) em ambas as cadeias do peptídeo ajudam a limitar as interações inter-residuais e a assegurar que a região central do segmento helicoidal do peptídeo possua elevada entropia conformacional. Conseqüentemente, as cadeias peptídicas tornam-se flexíveis o bastante para possibilitar uma pequena torção das hélices, permitindo o entrelaçamento entre elas, levando à formação de uma estrutura em super-hélice.

Alguns estudos mostram que peptídeos antimicrobianos tendem a formar oligômeros com o intuito de proteger os resíduos hidrofóbicos da ação de proteases até que alcancem a superfície da membrana (Bechinger e Lohner, 2006). Em solução aquosa, as superfícies hidrofóbicas do peptídeo antimicrobiano dimérico distinctina (Batista *et al.*, 1999) se auto-associam para formar um tetrâmero, no qual as porções hidrofóbicas da molécula se isolam do ambiente hidrofílico (Resende *et al.*, 2009). No caso do peptídeo dimérico HMT-2, a molécula pode adotar uma estrutura de super-hélice para exercer uma função de auto-proteção à degradação. Em contraste, a estrutura em super-hélice de HMT-2 expõe ainda mais os resíduos carregados positivamente (Lys, His e Arg), podendo facilitar sua aproximação à superfície da membrana bacteriana. A perda desta estrutura super-hélice ocorreria na superfície da bicamada de modo similar ao observado para as estruturas de HMT-2 em micelas de DPC- d_{38} (Figura 3.53, p. 135). Neste caso, a estrutura aberta de HMT-2 permite um maior contato das regiões hidrofílicas de cada cadeia com a superfície da membrana. Além disso, expõe os

resíduos hidrofóbicos de HMT-2 e, assim, possibilita a interação do peptídeo com a região hidrofóbica da membrana.

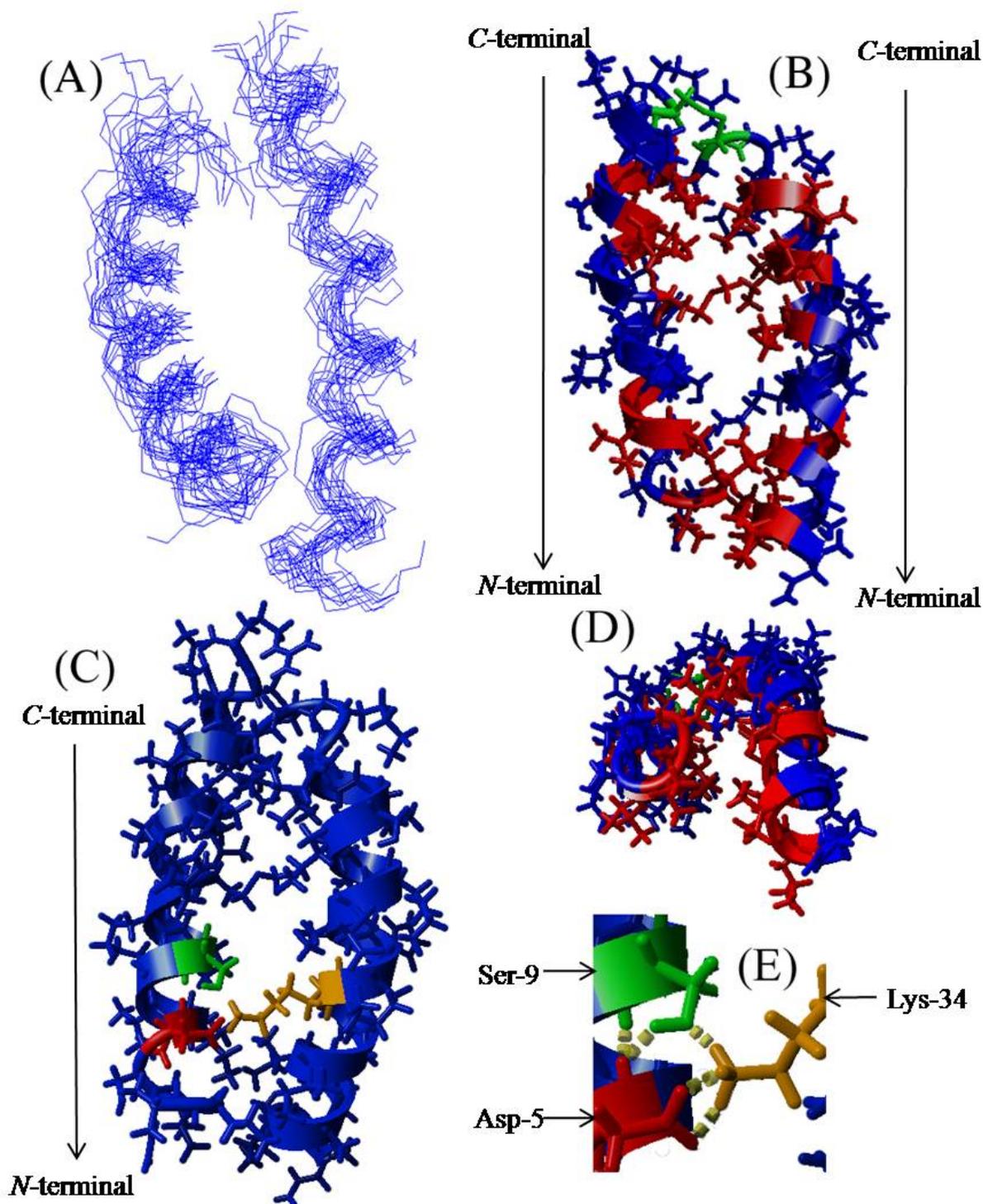


Figura 3.55 - Estruturas da cadeia principal de HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L^{-1} calculadas a partir de dados de RMN. (A) Sobreposição das estruturas mais estáveis do resíduo 2 ao resíduo 46; (B) Estrutura mais estável, em vermelho resíduos apolares, em azul resíduos polares e em verde resíduos de Cys; (C) representação dos resíduos hidrofílicos na região hidrofóbica (Asp-5 em vermelho, Ser-9 em verde e Lys-34 em laranja); (D) demonstração frontal da hélice; (E) ligações de hidrogênio entre Asp-5, Ser-9 e Lys-34.

Devido à complexidade da estrutura de HMT-2 em solução tampão fosfato a 40 mmol.L⁻¹ foi necessário uma análise por resíduos do conjunto de estruturas, utilizando o servidor *iCing*, como um parâmetro adicional da qualidade das estruturas. O resultado pode ser observado na Figura 3.56A e mostra informações corretas de conformação para grande parte da cadeia polipeptídica de HMT-2, apresentando poucos resíduos em conformações não usuais.

(A) **Análise baseada nos resíduos de aminoácidos**

Cadeia A

1-9	ASN1	LEU2	VAL3	SER4	ASP5	ILE6	ILE7	GLY8	SER9
10-19	LYS10	LYS11	HIS12	MET13	GLU14	LYS15	LEU16	SER18	ILE19
20-24	ILE20	LYS21	LYS22	CYS23	ARG24				

Cadeia B

1-9	ASN1	LEU2	VAL3	SER4	ASP5	ILE6	ILE7	GLY8	SER9
10-19	LYS10	LYS11	HIS12	MET13	GLU14	LYS15	LEU16	SER18	ILE19
20-24	ILE20	LYS21	LYS22	CYS23	ARG24				

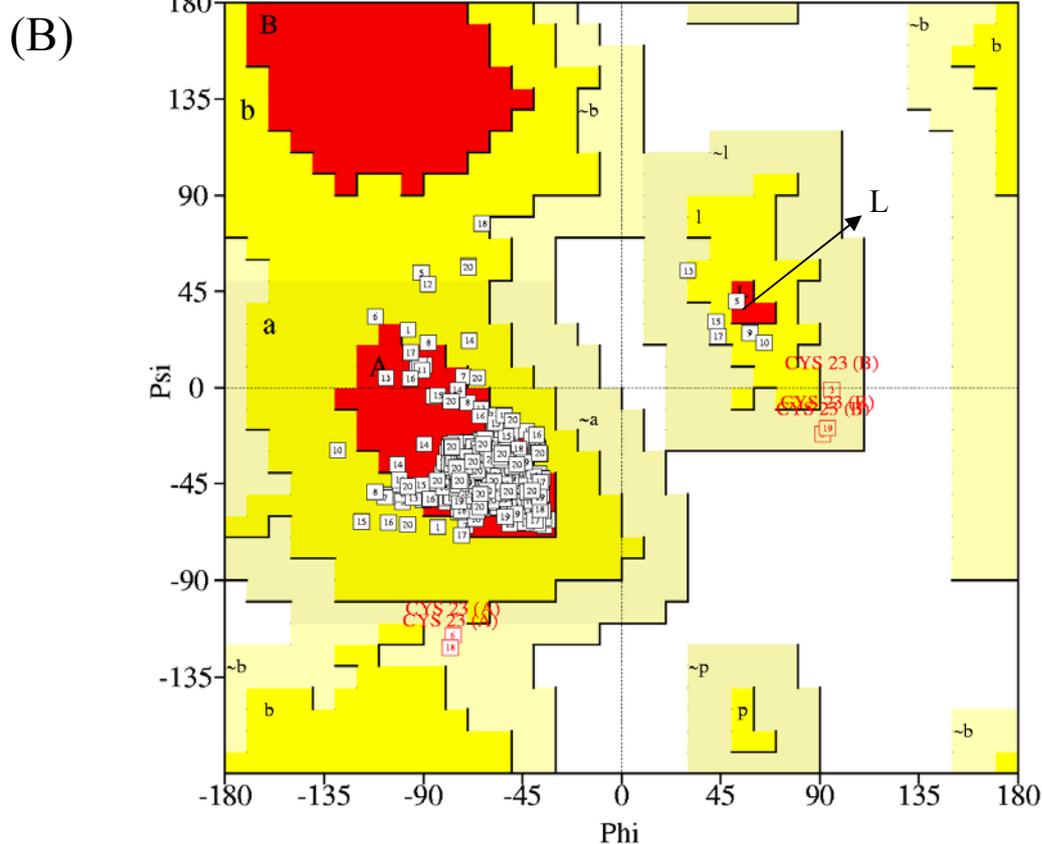


Figura 3.56 - Resultados da análise de qualidade estrutural e validação dos modelos calculados para HMT-2 em solução tampão fosfato 40 mmol.L⁻¹. (A) Resumo da análise para cada resíduo de aminoácido. As cores verde, laranja e vermelho representam, respectivamente, estrutura de boa qualidade, de qualidade mediana ou pouco comum. (B) Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis. Regiões favorecidas [A,B,L], regiões permitidas [a, b, l, p] e regiões menos permitidas [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p].

Na Figura 3.56A (p. 139), as sequências das duas cadeias estão apresentadas, com cada resíduo de aminoácido representado pela convenção de três letras e colorido com as cores verde, laranja ou vermelha. Esse esquema de três cores diz respeito à qualidade da região que compreende cada resíduo de aminoácido, sendo que a cor verde indica uma região de boa qualidade, a cor laranja indica qualidade mediana ou uma região pobre em informações estruturais e a cor vermelha, qualidade estrutural ruim ou estruturação pouco comum. Pode-se notar que os resíduos em vermelho concentram-se em regiões específicas, sendo resíduos de aminoácidos presentes em regiões próximas às extremidades *N*-terminal e regiões contendo resíduos de cisteínas, responsáveis pela ligação dissulfeto, devido a conformações consideradas improváveis. Os resíduos com a cor laranja podem ser resultado das limitações em se obter mais restrições (de distância ou não) inter-cadeias devido ao grande número de sobreposições entre os sinais no mapa de contornos NOESY na região de interação entre estas cadeias laterais. Entretanto, apesar dessas regiões terem sido classificadas como passíveis de incorreções (cor laranja), representam conformação pouco comum, pois estão situados na região central de cada cadeia peptídica, a qual possui uma alta torção das cadeias peptídicas principais devido à estrutura super-hélice. A análise do diagrama de Ramachandran (Figura 3.56B, p. 139) mostra que a maior parte dos pontos encontra-se na região favorecidas (94,6%) enquanto que somente 5,4% encontram-se em região menos favorecidas.

3.2.5 Calorimetria de titulação isotérmica

Os estudos de termodinâmica foram realizados para descrever as interações entre peptídeo e vesículas unilamelares grande (LUVs). Neste estudo foram preparadas vesículas de 100 nm de diâmetro com diferentes formulações e soluções de peptídeo padronizadas por análise de aminoácidos. Na Tabela 3.20 (p. 141) estão descritas as soluções com as respectivas abreviaturas utilizadas para representá-las de modo a simplificar a apresentação dos dados. Em todas as titulações, cada injeção das vesículas gera um fluxo de calor negativo característico de reações exotérmicas, que decresce em magnitude com injeções consecutivas. Experimentos controle foram realizados pela injeção de LUVs em tampão, tendo sido verificadas liberações de calor constantes (h_{dil}) de aproximadamente - 0,05 μ cal por injeção. Este é o calor de diluição de vesículas e todas as titulações de LUVs em peptídeo foram ajustadas pela sua subtração. A obtenção das isotermas de interação foi realizada por ajuste de um modelo que descreve apenas

um sítio de interação, obtido usando o pacote de *softwares* da Microcal.

Tabela 3.20 - Soluções de LUVs para estudos termodinâmicos

Soluções	LUVs	Carga da LUV
Vesículas de POPC de 100 nm, 300 mmol.L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0 e NaCl a 200 mmol.L ⁻¹	POPC/Tris	Neutra
Vesículas de POPC de 100 nm, 100 mmol.L ⁻¹ tampão fosfato, pH 7,5 e NaCl a 200 mmol.L ⁻¹	POPC/Fosfato	Neutra
Vesículas de POPC/POPG (3:1) de 100 nm, 300 mmol.L ⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0 e NaCl a 200 mmol.L ⁻¹	POPG/Tris	Negativa
Vesículas de POPC/POPG (3:1) de 100 nm, 100 mmol.L ⁻¹ tampão fosfato, pH 7,5 e NaCl a 200 mmol.L ⁻¹	POPG/Fosfato	Negativa

Para o peptídeo HMT-1, somente a titulação com LUVs de POPG/Tris (Figura 3.57, p. 142) mostrou uma interação significativa e que permitiu um ajuste da isoterma de interação, fornecendo um valor de $K_{app} = 326,2 \text{ L.mol}^{-1}$. Os traços calorimétricos integrados da titulação de HMT-1 com LUVs de POPG/Tris estão apresentados na Figura 3.57B e mostram variações negativas do calor de interação (h_i), características de reações exotérmicas. A variação de entalpia da interação peptídeo-LUVs ΔH^0 pôde ser calculada de acordo com a Equação 3.1:

$$\Delta H^0 = \frac{\sum_i \delta h_i}{(c_{pep}^0 V_{cell})} \quad (3.1)$$

onde δh_i representa os calores de injeção subtraídos dos calores de diluição, c_{pep}^0 é a concentração total de peptídeo dentro da célula calorimétrica e V_{cell} é o volume da mesma célula. O resultado mostra um $\Delta H^0 = -2,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$ de reação exotérmica, resultado de interações eletrostáticas do peptídeo com LUVs carregadas negativamente. O cálculo dos parâmetros termodinâmicos ΔG^0 e ΔS^0 apresentados na Tabela 3.21 (p. 144) mostram que o processo de interação ocorre de forma espontânea e é favorecido também pelo fator entrópico da interação. Entretanto, deve-se notar que a contribuição entrópica é da ordem de 10^3 vezes menor do que a contribuição entálpica. Isto pode indicar uma interação estritamente superficial e eletrostática, resultando em uma pequena desorganização na estrutura das LUVs ocasionada pela influência do peptídeo.

A titulação de HMT-1 com as demais LUVs de POPC/Tris, POPC/Fosfato e POPG/Fosfato a temperatura de 25 °C revelou uma interação fraca entre peptídeo-LUVs, não permitindo o ajuste da isoterma de interação para estes sistemas. A Figura 3.57 apresenta os traços calorimétricos da titulação de HMT-1 com LUVs de

POPC/Tris para exemplificar estas interações fracas. Nestas três titulações, a injeção de 5 μL de LUVs em HMT-1 produz um calor h_i constante de aproximadamente - 0,08 μcal , muito próximo ao h_{dil} (-0,05 μcal) das LUVs.

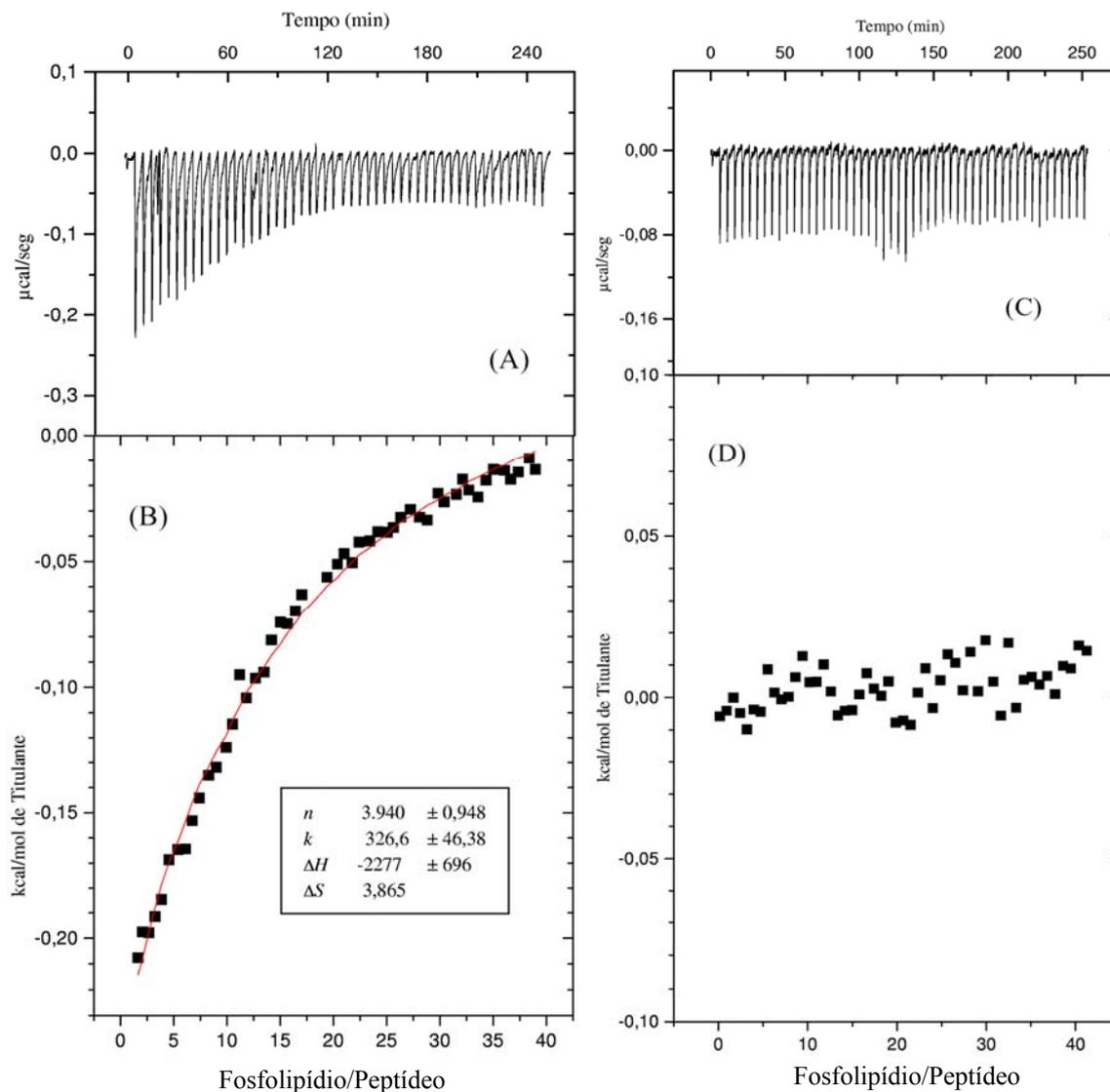


Figura 3.57 – Valores de calorimetria de titulação isotérmica de HMT-1 com LUVs de POPG/Tris. (A) Fluxo de calor em função do tempo da titulação isotérmica da titulação de HMT-1 ($0,099 \text{ mmol.L}^{-1}$) com LUVs de POPG/Tris (20 mmol.L^{-1}) a 25°C . (B) Calor de interação (■) HMT-1-POPG/Tris em função da razão molar de peptídeo/fosfolipídeo. (C) Fluxo de calor em função do tempo da titulação isotérmica da titulação de HMT-1 ($0,095 \text{ mmol.L}^{-1}$ na célula do calorímetro) com LUVs de POPC-Tris (20 mmol.L^{-1}) a 25°C . (D) Calor de interação (■) de HMT-1 e LUVs de POPC-Tris em função da razão molar peptídeo/fosfolipídeo.

Estes resultados apontam para uma interação relativamente fraca de HMT-1 com LUVs eletricamente neutras (POPC/Tris e POPC/Fosfato), e que a presença do tampão fosfato interfere de forma significativa na interação de HMT-1 com as LUVs carregadas negativamente. Isto pode ocorrer por uma complexação dos íons PO_4^{3-} com sítios positivos do peptídeo (Lys e Arg), interferindo consequentemente na interação

eletrostática de HMT-1 com a superfície de carga negativa das LUVs de POPG.

Os estudos calorimétricos da titulação de HMT-2 com LUVs de POPC/Fosfato e POPG/Fosfato não foram também passíveis de ajuste da isoterma de interação. Os valores de calor de interação (h_i) para estas titulações apresentaram-se próximos ao calor h_{dil} das LUVs (dados não apresentados). Por outro lado, as titulações de HMT-2 por injeções de alíquotas de 5 μL de LUVs de POPG/Tris e POPC/Tris a temperatura de 25 °C mostram interações consideráveis em cada sistema peptídeo-LUVs (Figura 3.58).

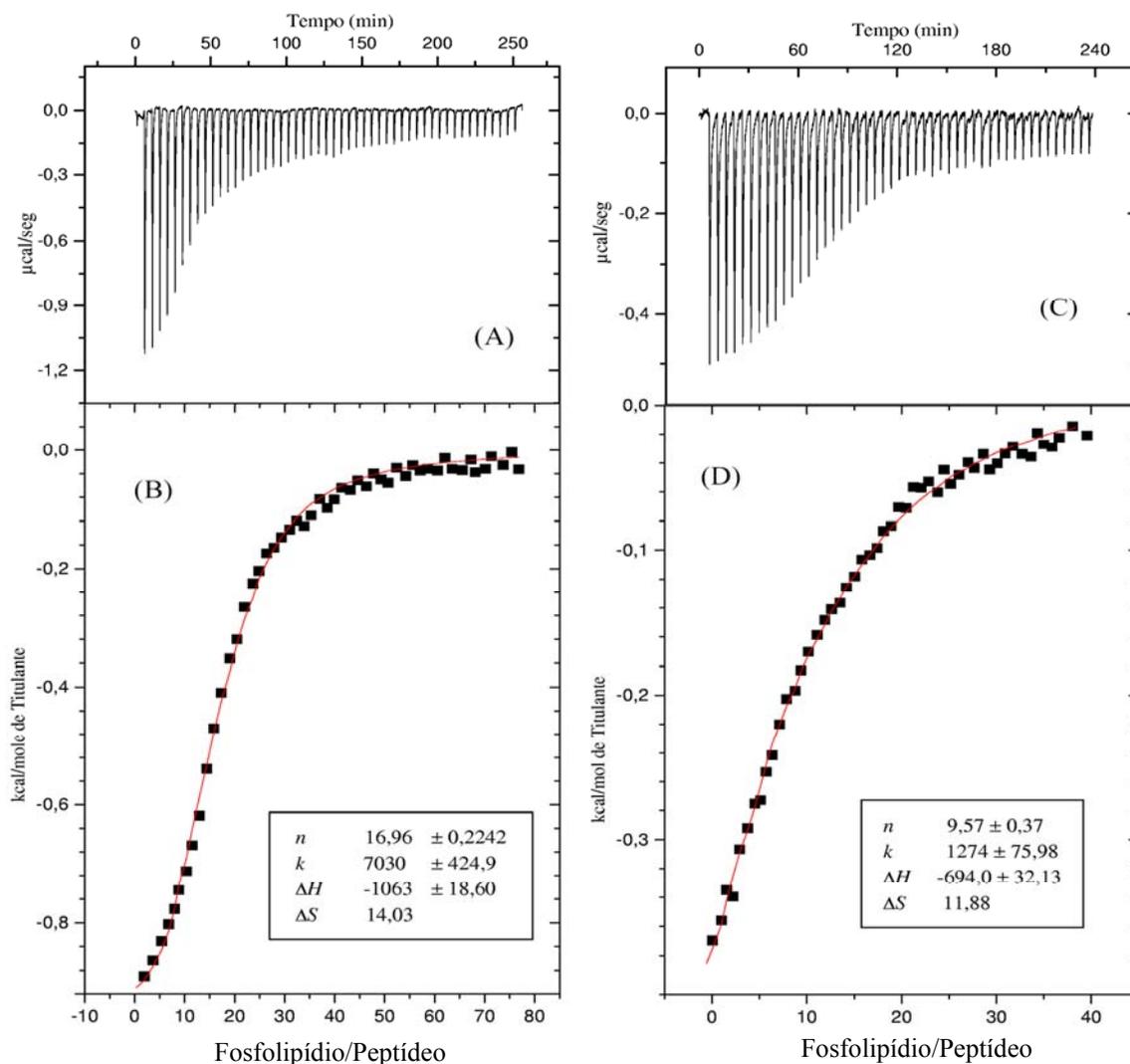


Figura 3.58- Valores de calorimetria de titulação isotérmica de HMT-2. (A) Fluxo de calor em função do tempo da titulação isotérmica da titulação de HMT-2 ($0,055 \text{ mmol.L}^{-1}$) com LUVs de POPG-Tris (20 mmol.L^{-1}) a 25 °C. (B) Calor de interação (■) de HMT-1-POPG/Tris em função da razão molar peptídeo/fosfolipídeo. (C) Fluxo de calor em função do tempo da titulação isotérmica da titulação de HMT-2 ($0,98 \text{ mmol.L}^{-1}$) com LUVs de POPC-Tris (20 mmol.L^{-1}) a 25 °C. (D) Calor de interação (■) de HMT-2-POPC/Tris em função da razão molar peptídeo/fosfolipídeo.

Os traços calorimétricos integrados da titulação de HMT-2 com LUVs estão ilustrados nas Figuras 3.58B e D. Os dados mostram que a interação de LUVs de POPC/Tris e de POPG/Tris com o peptídeo gera variações negativas do fluxo de calor,

que é característica de reações exotérmicas e com afinidades diferentes para LUVs eletricamente neutras e LUVs negativamente carregadas. A Figura 3.58 (p. 143) mostra que os primeiros traços calorimétricos possuem o maior calor h_i e que as injeções seguintes liberam menor quantidade de calor que as anteriores. A injeção de LUVs eletricamente negativas (POPG/Tris) em HMT-2 produz um calor h_i de aproximadamente $-1,1 \mu\text{cal}$ (Figura 3.58A), maior do que o calor h_i para injeção de LUVs eletricamente neutras (POPC/Tris) de $-0,5 \mu\text{cal}$ (Figura 3.58C). Com este resultado foi possível calcular a entalpia de interação ΔH^0 para a titulação de HMT-2 com LUVs de POPG/Tris e POPC/Tris, resultando em valores de $-1,06 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-0,69 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. Isto mostra que o maior potencial negativo da membrana resulta em uma maior interação de HMT-2 com o bicamada lipídica. As constantes de interação aparente (K_{app}) de HMT-2 com vesículas negativamente carregadas e neutras são de $7,0 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ e $1,2 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$, respectivamente, confirmando também a maior interação de HMT-2 com LUVs de POPG/Tris. Este mesmo comportamento é observado no estudo do peptídeo antimicrobiano mangainina 2, cuja titulação com LUVs neutras resultou em um K_{app} menor do que para a titulação com vesículas negativamente carregadas (Wieprecht *et al.*, 1999). Destes valores de K_{app} obtidos para HMT-2 em LUVs, foram calculados os demais parâmetros termodinâmicos ΔG^0 e ΔS^0 listados na Tabela 3.21.

Tabela 3.21 - Parâmetros termodinâmicos obtidos pelo experimento de ITC para a interação dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 com LUVs a 25 °C

Titulação	n	K_{app} (L.mol^{-1})	ΔG^0 (cal.mol^{-1})	ΔH^0 (cal.mol^{-1})	ΔS^0 (cal.mol^{-1})
HMT-1 e POPG/Tris	$3,9 \pm 0,9$	326,6	-3409	-2277	3,79
HMT-2 e POPC/Tris	$9,57 \pm 0,3$	1274	-4234	-694	11,87
HMT-2 e /POPG/Tris	$16,96 \pm 0,2$	7030	-5243	-1063	14,02

Vale ressaltar que nestes estudos, embora as interações ocorram entre peptídeo e moléculas de POPC e POPG auto-organizadas na forma de vesículas, a análise termodinâmica foi realizada para o processo de complexação entre as moléculas de peptídeo e monômeros dos fosfolipídeos. Os dados termodinâmicos (Tabela 3.21) mostraram que ambos os processos de interação de HMT-2 com LUVs de POPG/Tris ou com LUVs de POPC/Tris são favorecidos tanto por entalpia quanto por entropia. De acordo com estes resultados, observou-se um valor maior em módulo da variação de

entalpia para o sistema peptídeo-POPG/Tris ($\Delta H^\circ = -1063 \text{ cal.mol}^{-1}$) do que a interação de HMT-2 com POPC/Tris ($\Delta H^\circ = -694 \text{ cal.mol}^{-1}$). Esta constatação pode ser explicada devido à maior interação eletrostática entre HMT-2 e LUVs de POPG/Tris carregadas negativamente do que entre HMT-2 e LUVs de POPC/Tris zwitteriônicas. Com relação à contribuição da entropia, esta pode decorrer da dessolvatação do peptídeo e dos fosfolípidos durante a interação entre ambos, resultando em um maior número de moléculas de água livres em solução. Neste caso, a maior interação e a maior relação estequiométrica (17 moléculas do fosfolípidio para cada molécula de HMT-2) de HMT-2 com LUVs de POPG/Tris ($K_{\text{app}} = 7030 \text{ L.mol}^{-1}$) causam uma maior dessolvatação neste sistema e, conseqüentemente, uma maior contribuição entrópica ($\Delta S^\circ = 14,02 \text{ cal.mol}^{-1}$). Por outro lado, a menor interação entre HMT-2 e LUVs de POPC/Tris ($K_{\text{app}} = 1274 \text{ L.mol}^{-1}$) gera uma menor dessolvatação do sistema, resultando também em uma menor variação da entropia ($\Delta S^\circ = 11,87 \text{ cal.mol}^{-1}$). Além da dessolvatação, a desorganização de moléculas de fosfolípidio na estrutura das LUVs motivada pela inserção de moléculas do peptídeo HMT-2 na bicamada lipídica, contribui também para a entropia de ambos os sistemas.

Outro parâmetro termodinâmico e de grande importância neste contexto, é a variação de energia livre (ΔG°), que pode ser definida para este estudo como uma variação energética devido à transferência do peptídeo do ambiente aquoso, estado inicial, ao estado final quando o peptídeo se encontra ligado na membrana (Babakhani *et al.*, 2008). Valores negativos como aqueles encontrados para as interações de HMT-1 com POPG/Tris ($\Delta G^\circ = -3409 \text{ cal.mol}^{-1}$), HMT-2 com POPC/Tris ($\Delta G^\circ = -4234 \text{ cal.mol}^{-1}$) e HMT-2 com POPG/Tris ($\Delta G^\circ = -5243 \text{ cal.mol}^{-1}$) indicam processos espontâneos de inserção dos peptídeos nas bicamadas fosfolipídicas.

Finalmente, uma comparação dos dados termodinâmicos mostrados na Tabela 3.21 (p. 144) entre os sistemas HMT-1-POPG/Tris e HMT-2-POPG/Tris revelam uma maior interação do peptídeo dimérico com as LUVs carregadas negativamente. Como visto nos resultados estruturais obtidos por RMN de HMT-2 em micelas de DPC- d_{38} (Figura 3.53C, p. 135), o peptídeo dimérico possui uma estrutura aberta que permite a interação de ambas as cadeias com a micela. Neste caso, a maior interação entre HMT-2 em relação à HMT-1 com LUVs de POPG/Tris, está relacionada com a maior superfície de contato entre o dímero e as LUVs, ocasionando em uma maior atração eletrostática neste sistema.

3.2.6 Espalhamento de luz dinâmico

Alguns estudos mostram que peptídeos antimicrobianos, ao interagir com vesículas fosfolipídicas, formam agregados supramoleculares que podem resultar em um aumento ou diminuição do volume das vesículas (Abrunhosa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). Dessa forma, os experimentos de DLS foram conduzidos para a observação do comportamento do diâmetro hidrodinâmico (D_h) das LUVs frente à adição de peptídeo e os resultados estão mostrados na Figura 3.59.

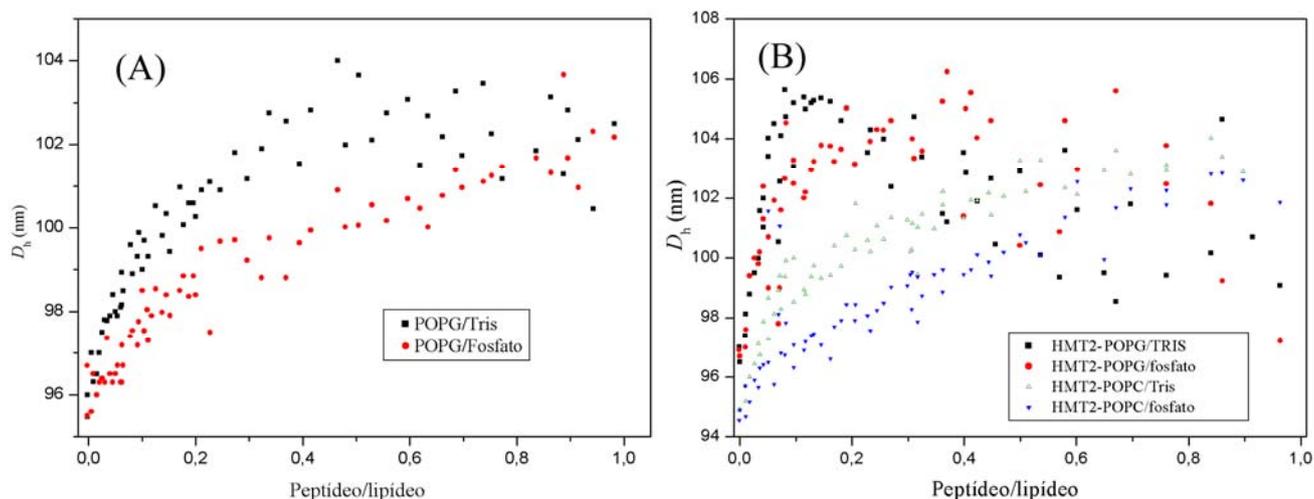


Figura 3.59 – Efeito dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 no diâmetro hidrodinâmico de LUVs. (A) Diâmetro hidrodinâmico de LUVs em função da razão molar [HMT-1/LUVs]. [HMT-1] = 1 mmol.L⁻¹, (■) POPG/Tris (preto), (○) POPG/Fosfato (vermelho). (B) Diâmetro hidrodinâmico de LUVs em função da razão molar [HMT-2/LUVs]. [HMT-2] = 1 mmol.L⁻¹. (■) POPG-Tris (preto), (○) POPG/Fosfato (vermelho), (Δ) POPC/Tris (verde), (▲) POPC/Fosfato (azul).

A Figura 3.59 mostra que os peptídeos HMT-1 e HMT-2 causam aumento no diâmetro hidrodinâmico nas LUVs. A Figura 3.59A mostra a variação do D_h das LUVs de POPG/Tris e POPG/Fosfato com adição do peptídeo HMT-1. As variações no D_h de LUVs POPC/Fosfato e POPC/Tris causadas por HMT-1 foram desprezíveis e não se observou um padrão no aumento de D_h , portanto não foram apresentadas. Nestes experimentos de DLS, cada ponto da curva foi gerado pela medida de espalhamento de luz dinâmico da solução contendo LUVs, após a adição de 10 μ L de solução de peptídeo. É possível observar que o peptídeo HMT-1 interage com as LUVs de POPG/Tris e POPG/Fosfato, causando um aumento do D_h das LUVs de aproximadamente 8 nm. Entretanto, este efeito em LUVs de POPG/Tris ocorre em menor razão de peptídeo/lipídeo (0,4 para LUVs de POPG/Tris e 0,8 POPG/Fosfato), sugerindo que uma molécula de HMT-1 interage com um maior número de moléculas

de fosfolipídeo em LUVs de POPG/Tris do que POPG/Fosfato, confirmando assim o efeito interferente do tampão fosfato na interação peptídeo-lipídeo.

A Figura 3.59B (p. 146) mostra a variação do D_h de LUVs em função da razão molar entre HMT-2 e fosfolipídeo. É possível observar também que o aumento do D_h ocorre até um valor máximo, a partir de onde há uma diminuição no diâmetro das LUVs. Isto indica que, nestas relações molares, ocorrem alterações no tamanho de vesículas, levando a um segundo processo termodinâmico diferente da adsorção do peptídeo à superfície da membrana. Este processo é dependente da relação molar entre peptídeo e fosfolipídeos e pode estar relacionado à indução de formação de novas estruturas das vesículas ou, ainda, à destruição parcial destas (Wenk e Seelig, 1998). Assim, para cada sistema é possível estimar valores de razão molar de peptídeo/fosfolipídeo capazes de danificar as vesículas. Esta análise mostra que, para o sistema HMT-2/POPG-Tris, o máximo de D_h é alcançado a uma razão molar peptídeo/fosfolipídeo de aproximadamente 0,1. Por outro lado, na presença do tampão fosfato (POPG/Fosfato), mesmo em LUVs carregadas negativamente, o valor da razão molar foi duas vezes maior ($\sim 0,2$). Portanto, é necessário um menor número de moléculas de HMT-2 para danificar as LUVs de POPG/Tris do que POPG/Fosfato. Estes dados apresentam-se em acordo com aqueles observados por calorimetria de titulação isotérmica, que mostram o efeito dos íons PO_4^{3-} na interação de HMT-2 com LUVs. Em vesículas eletricamente neutras, os valores da razão molar peptídeo/fosfolipídeo são ainda maiores, mostrando que o potencial negativo da membrana é fundamental para a interação do sistema peptídeo/LUVs e possível ruptura da bicamada lipídica.

3.2.7 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 foram testadas contra a bactéria Gram-postiva *S. aureus*, e contra as Gram-negativas *P. aureginosa* e *E. coli*, sendo comparada com antibióticos convencionais, conforme descrito na Tabela 3.22 (p. 148). O peptídeo HMT-2 apresentou maior atividade para todos os microrganismos em comparação com HMT-1, tendo uma concentração inibitória mínima (MIC) de $11,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $23,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aureginosa*, respectivamente. A cadeia monomérica não apresentou atividade contra *P. aureginosa* e as MICs para *S. aureus* e *E. coli* foram da ordem de quatro vezes e 15 vezes maior, respectivamente, do que as MICs de HMT-2.

Tabela 3.22 - Atividade antimicrobiana de HMT-1 e HMT-2

Microrganismo	Gram	MIC ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)				
		HMT-1	HMT-2	DS01	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29313	Positiva	46,5	11,6	26,5	<11	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativa	23,2	1,5	6,6	46	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Negativa	ND	23,2	NT	25	25

*ND – Não determinado,*NT – Não testado, *DS 01 = Peptídeo antimicrobiano controle

3.3 Peptídeo antimicrobiano LyeTx I

O peptídeo LyeTx I é uma toxina que foi isolada recentemente do veneno de aracnídeos da espécie *Lycosa erythrognatha* (Yan e Adams, 1998), que podem ser encontrados com relativa facilidade na região sudeste do Brasil (Santos *et al.*, 2009). A Tabela 3.23 apresenta a sequência primária do peptídeo LyeTx I, que é composto por 25 resíduos de aminoácidos.

Tabela 3.23 - Sequência primária do peptídeo LyeTx I

Peptídeo	Sequência
LyeTx I	IWLTA LKFLG KNLGK HLAQK QLAQL-NH ₂

NH₂ representa a amidação da região C-terminal

Este item descreve o estudo da atividade antimicrobiana de LyeTx I e a estrutura secundária do peptídeo em ambientes que mimetizam as condições de membranas bacterianas.

3.3.1 Síntese, purificação e caracterização

Com o objetivo de se estudar a atividade biológica e sua estrutura em ambientes que mimetizam membranas, o peptídeo LyeTx I foi sintetizado manualmente através da síntese em fase sólida. A Tabela 3.24 (p. 149) apresenta o acompanhamento desta síntese, que apresentou uma dificuldade especial no 20º acoplamento, correspondente ao resíduo de Leu. Foram necessários três reacoplamentos deste resíduo para se alcançar um rendimento próximo a 100% de acoplamento, confirmado pelo teste de *Kaiser*. Mesmo assim foi preciso aumentar em seis vezes o excesso de derivado de aminoácido Fmoc-Leu-OH e ativadores (HOBt e DIC). Além deste, os acoplamentos 21 (Fmoc-Ala-

OH), 23 (Fmoc-Leu-OH) e 24 (Fmoc-Trp(*Ot*-Bu)-OH) apresentaram-se também incompletos e exigiram reacoplamentos.

Tabela 3.24 – Dados do acompanhamento da síntese de LyTex I

Ordem de acoplamento	Derivado Aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Leu-OH	5	4,0	-	+
2°	Fmoc-Lys-Boc-OH	3	1,5	-	+
3°	Fmoc-Ala-OH	3	1,5	-	+
4°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	-	+
5°	Fmoc-Gln-OH	3	1,5	-	+
6°	Fmoc-Gln-OH	3	1,5	-	+
7°	Fmoc-Lys-Boc-OH	3	1,5	-	+
8°	Fmoc-Ala-OH	3	1,5	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	-	+
10°	Fmoc-His(Trt)-OH	3	1,5	-	+
11°	Fmoc-Lys-Boc-OH	3	1,5	-	+
12°	Fmoc-Gly-OH	3	1,5	-	+
13°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	-	+
14°	Fmoc-Asn-(Trt)-OH	3	1,5	-	+
15°	Fmoc-Lys-Boc-OH	3	1,5	-	+
16°	Fmoc-Gly-OH	3	1,5	-	+
17°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	-	+
18°	Fmoc-Phe-OH	3	1,5	-	+
19°	Fmoc-Lys-Boc-OH	3	1,5	-	+
20°	Fmoc-Leu-OH	3	1,5	+	~
-	# Fmoc-Leu-OH	3	1,5	+	~
-	# Fmoc-Leu-OH	4	2,0	-	~
-	# Fmoc-Leu-OH	6	2,5	-	+
21°	Fmoc-Ala-OH	4	2,0	+	~
-	# Fmoc-Ala-OH	4	2,0	-	+
22°	Fmoc-Thr(<i>t</i> -Bu)-OH	4	2,0	-	+
23°	Fmoc-Leu-OH	4	2,0	+	~
-	# Fmoc-Leu-OH	4	2,0	--	+
24°	Fmoc-Trp(<i>Ot</i> -Bu)-OH	4	2,0	+	~
-°	# Fmoc-Trp(<i>Ot</i> -Bu)-OH	4	2,0	+	~
-°	# Fmoc-Trp(<i>Ot</i> -Bu)-OH	4	2,0	-	+
25°	Fmoc-Ile-OH	4	2,0	-	+

Etapas de reacoplamento * Repetição do testes de *Kaiser* para confirmação. + Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre. - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre. ~ Teste não realizado.

Ao final da síntese, o peptídeo foi clivado da resina e analisado por CLAE e EM. A Figura 3.60 (p. 150) apresenta o perfil de CLAE do peptídeo bruto em que é possível observar a presença de um pico proeminente com t_r de 15,9 min, além de outros dois picos de intensidades menores com t_r de 15,6 e 13,8 min. A mesma amostra

foi submetida também à análise por EM-MALDI-ToF (Figura 3.61, p. 151) que comprova a presença de um íon com $[M+H]^+$ de m/z 2831,4, muito próximo da massa calculada de LyeTx I ($[M+H]^+$ de m/z 2831,7). É possível notar também a presença de picos devidos a íons de $[M+H]^+$ de m/z 2760, 4, $[M+H]^+$ de m/z 2703,5 e $[M+H]^+$ de m/z 2691,5, correspondendo a análogos com ausência de resíduos de Ala, Ala-Gly e Ala-Ser, respectivamente.

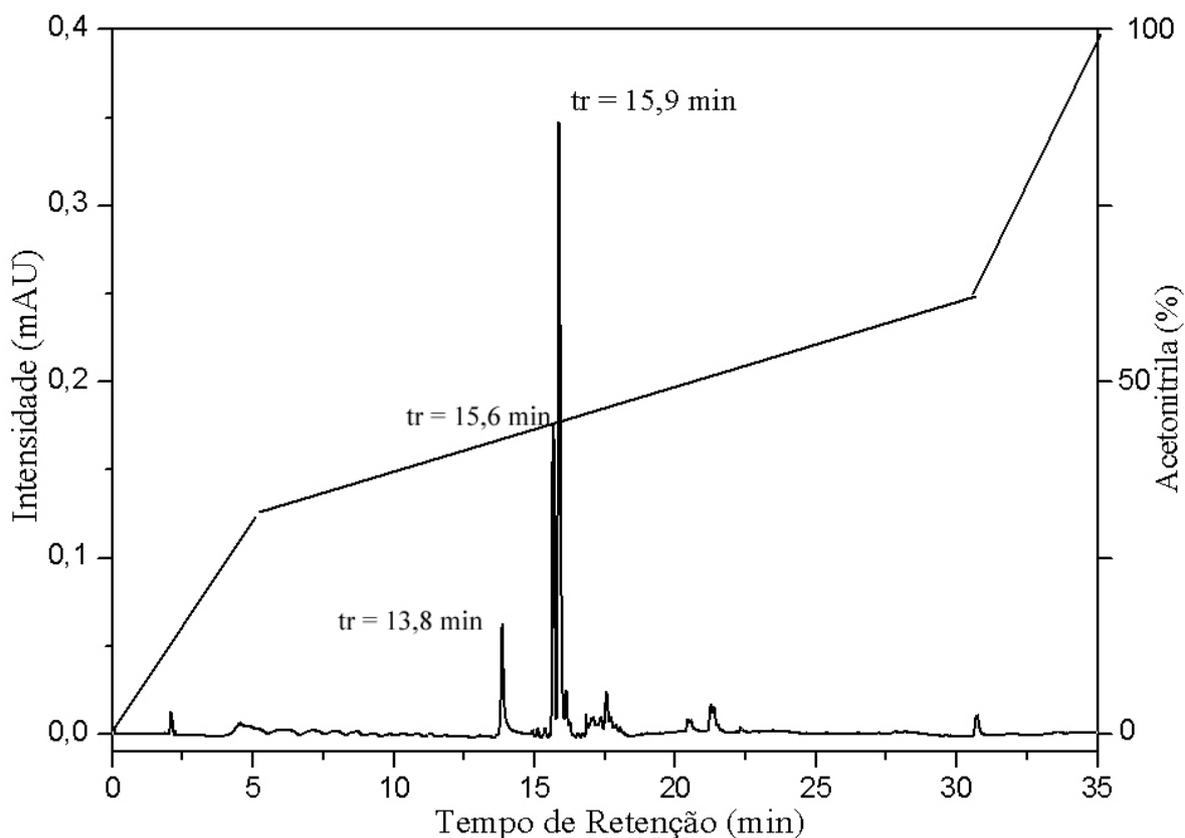


Figura 3.60 - Perfil de cromatografia de fase reversa de amostra da síntese do peptídeo LyeTx I bruto. Amostra injetada (25 μ L) em coluna C18 *Ydac* 218TP510 (250mm x 4,6mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

O peptídeo foi purificado por CLAE e o resultado desta purificação pode ser observado na Figura 3.62 (p. 151). É possível notar no espectro de EM-MALDI-ToF (Figura 3.62A) a presença significativa de apenas um pico do íon de $[M+H]^+$ de m/z 2831,6, correspondendo ao peptídeo LyeTx I. O sucesso da purificação pode ser confirmado também por CLAE como mostra a Figura 3.62C, pela presença de um único pico com t_r de 15,8 min, mostrando um grau de pureza de 97%. O rendimento da síntese após a purificação foi de aproximadamente 35%.

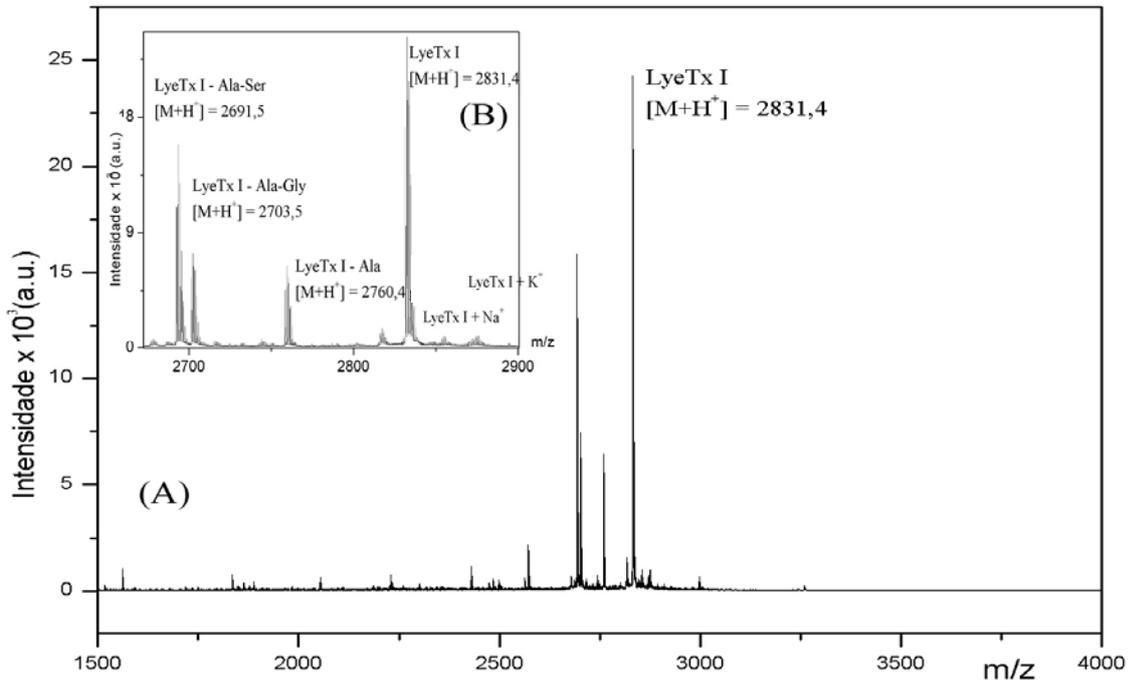


Figura 3.61 - (A) Espectro de Massas (EM-MALDI) do peptídeo LyeTx I bruto. (B) Expansão mostrando picos devidos a LyeTx I e análogos

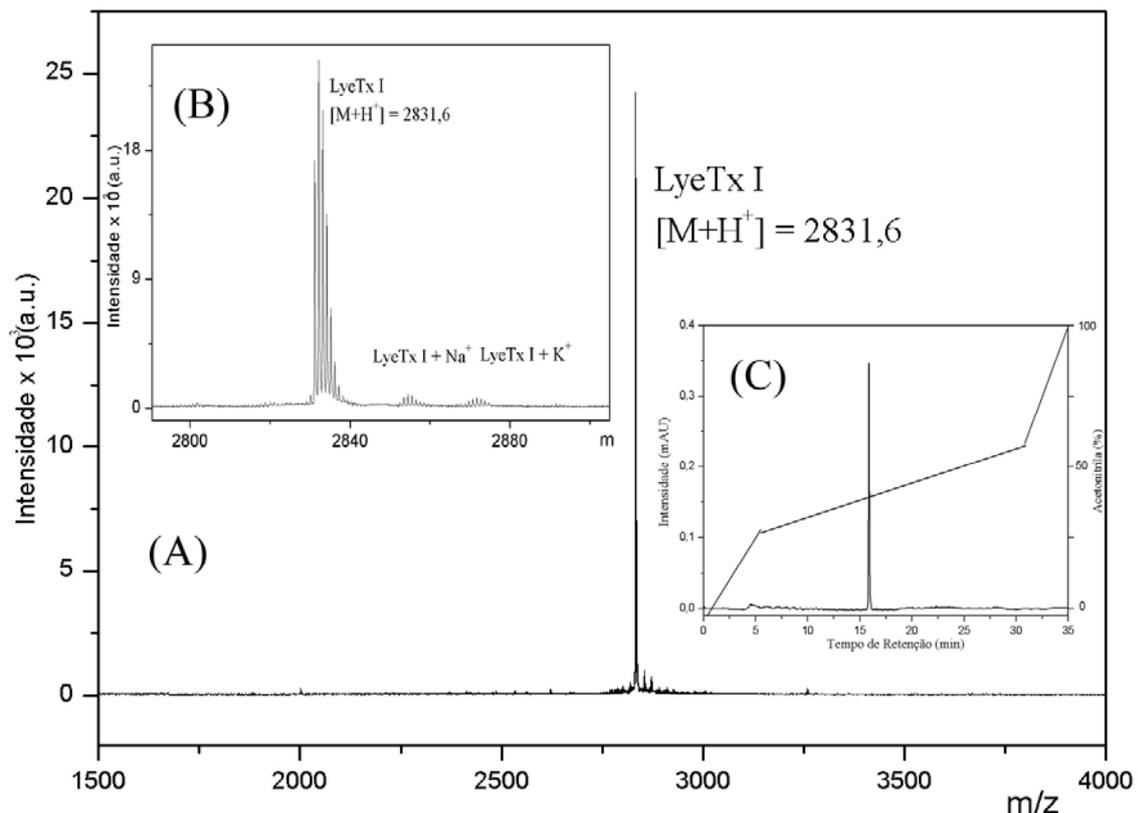


Figura 3.62 - (A) Espectro de Massas (EM-MALDI) do peptídeo LyeTx I purificado (B) Expansão mostrando picos devidos a LyeTx I (C) Perfil de CLAE de amostra purificada de LyeTx I. Amostras injetadas (25 μ L) em coluna C18 *Vydac* 218TP510 (250mm x 4,6mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila.

3.3.2 Testes antimicrobianos do peptídeo sintético LyeTx I

Após obtenção do peptídeo sintético LyeTx I com alto grau de pureza, este foi submetido a ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana. O peptídeo foi testado em bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), cujos resultados estão listados na Tabela 3.25. O peptídeo LyeTx I apresentou-se ativo contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* com concentração inibitória mínima de 1,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 2,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 11,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. A Tabela 3.25 mostra que estes dados são similares àqueles publicados para licotoxinas isoladas de *Lycosa carolinensis* e também para outros peptídeos antimicrobianos (Yan e Adams, 1998; Giacometti *et al.*, 1999).

Tabela 3.25 - Atividade antimicrobiana de LyeTx I

Microorganismo	Gram	MIC ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)			
		LyeTx I	Lyc-II (Yan e Adams, 1998)	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29313	Positivo	1,4	11,6	<11	*ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo	2,8	4,8	46	25
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	Negativo	11,3	13,2	25	25

*ND – Não determinado

3.3.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Com o objetivo de determinar as preferências conformacionais de LyeTx I que ajudem a explicar a atividade biológica e o modo de interação do peptídeo com membrana, foram realizados estudos estruturais por dicroísmo circular. Os resultados destes estudos estão apresentados na Figura 3.63 (p. 153).

Analisando as Figura 3.63A (espectro em preto) e Figura 3.63B (espectro em preto) pode-se observar que o peptídeo exibe estrutura predominantemente randômica em solução tampão fosfato em pH 7,5 e Tris-HCl em pH 8,0, respectivamente. Por outro lado, mudanças significativas no formato da curva de LyeTx I em solução tampão fosfato são observadas já com a adição de 20% de TFE (espectro em verde, Figura 3.63A). Contudo, a formação de uma curva característica de estrutura α -hélice é observada somente após a adição de 20 % TFE (Figura 3.63A), atingindo um máximo de conteúdo de hélice em soluções de 60% de TFE. Esta característica pode ser confirmada pelo aumento das amplitudes de sinais de estruturas helicoidais, como

mínimos em $\lambda_{\text{máx}}$ 208 nm e $\lambda_{\text{máx}}$ 222 nm e um máximo em $\lambda_{\text{máx}}$ 192 nm.

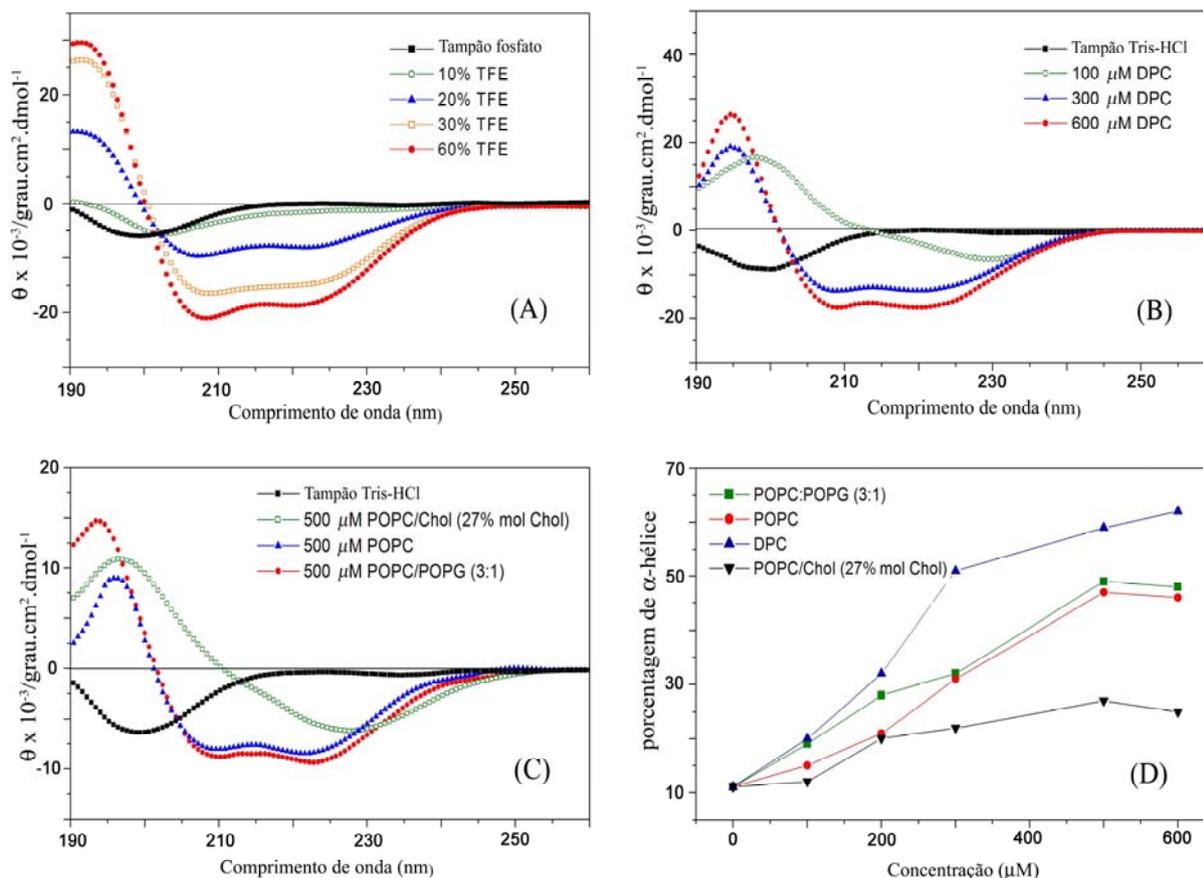


Figura 3.63 - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo LyeTx I (35 mmol.L⁻¹). (A) Soluções em TFE/H₂O; (B) Soluções em micelas de DPC e tampão Tris pH 8.0; (C) LUVs-POPC, LUVs-POPC-Col e LUVs-POPC/POPG (3:1) e (D) detalhes do conteúdo de hélice calculadas em função da concentração de TFE, LUVs-POPC, LUVs-POPC/POPG e micelas de DPC.

A Figura 3.63B mostra o comportamento estrutural de LyeTx I frente à sua adição em micelas de DPC. Novamente, é possível observar mudanças consideráveis no formato da curva de LyeTx I em solução tampão Tris-HCl com adição de 100 μmol.L⁻¹ de DPC (espectro em verde). Um máximo de conteúdo de hélice em LyeTx I é observado na presença de 600 μmol.L⁻¹ de DPC e, nesta concentração micelar, o peptídeo apresenta um conteúdo máximo de hélice de aproximadamente 63%, como mostra a curva da porcentagem de α -hélice em função da concentração de DPC (Figura 3.63D).

As preferências conformacionais de LyeTx I foram verificadas também na presença de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de POPC e POPC/POPG (3:1) como pode ser observado na Figura 3.63C (p. 153). A adição de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SUVs de POPC ou POPC:POPG (3:1, m/m) em solução tampão de Tris-HCl levam também a um aumento significativo na conformação helicoidal de LyeTx I. Entretanto, deve-se notar que o grau de helicidade diminui na presença de SUVs de 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ POPC contendo 27% de colesterol (SUVs POPC/Col), indicando menor estruturação do peptídeo (espectro em verde, Figura 3.63C). Em concentrações próximas a 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fosfolipídeos, LyeTx I apresenta um conteúdo máximo de hélice igual a 47% em POPC e a 49% em POPC/POPG (Figura 3.63D). Por outro lado, esta saturação ocorre a 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SUVs de POPC/Col, correspondendo a um máximo de helicidade de aproximadamente 26%. Os dados de CD mostram que a presença do colesterol diminui a interação peptídeo-lipídeo.

3.3.4 Determinação estrutural por RMN

A estrutura 3D de LyeTx I foi investigada por espectroscopia de RMN na presença de micelas de DPC- d_{38} , uma vez que os estudos de CD indicaram um elevado conteúdo de α -hélice neste tipo de micela (Figura 3.63, p. 153). Além disso, o uso de micelas de DPC- d_{38} mimetizam melhor as características de membranas fosfolipídicas do que soluções isotrópicas de TFE em água.

Para o assinalamento sequencial das ressonâncias dos núcleos de ^1H foram empregados os mapas de contornos TOCSY e NOESY, como metodologia proposta por Wüthrich (1986). A Figura 3.64 (p. 155) apresenta a região do mapa de contornos TOCSY para acoplamentos intra-residuais de H_α e hidrogênio de cadeias laterais com núcleos de hidrogênio amídico (H_N), sendo possível observar o padrão de TOCSY para a maioria dos resíduos da sequência peptídica de LyeTx I.

I W L T A L K F L G K N L G K H L A K Q Q L A K L - N H ₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 25-NT

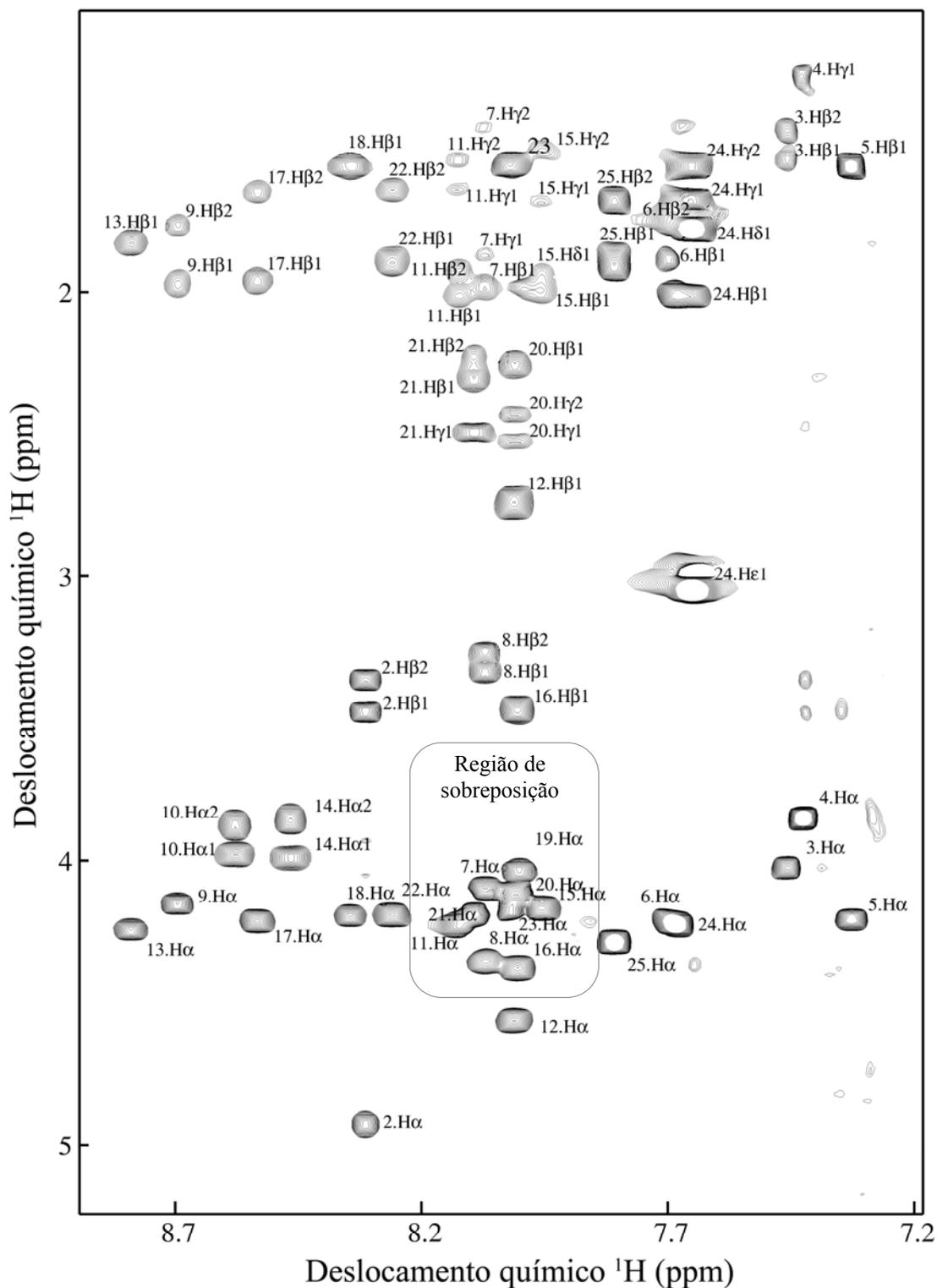


Figura 3.64 - Mapa de contornos parcial TOCSY (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar de DPC-*d*₃₈ 400 mmol.L⁻¹.

Além disso, nota-se também uma grande dispersão no deslocamento químico de (H_N) com sobreposições apenas nos resíduos de Lys-11/Gln-21 e Gln-20/Ala-23. As

interações sequenciais do tipo $d_{NN}(i,i+1)$ e $d_{\alpha N}(i,i+n)$ podem ser observadas nos mapas de contornos parciais da Figura 3.65 (p. 157), envolvendo grandes extensões da cadeia peptídica de LyeTx I como as regiões de Ala-5 a Gly-14, Lys-15 a Lys-19 e Gln-21 a 25-Leu. É possível também observar ainda na Figura 3.65B a presença de várias interações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ existentes desde o segundo resíduo (Trp-2) até a extremidade C-terminal, indicando um alto grau de ordenação de estrutura secundária. Vale ressaltar que o mapa de contornos de NOESY exibiu um número maior de correlações entre núcleos de ^1H próximas a extremidade C-terminal amidada em comparação com a extremidade N-terminal (Figura 3.65, p. 157). Este comportamento foi demonstrado anteriormente para os peptídeos antimicrobianos DD K (p. 77), HMT-1 (p. 110) e HMT-2 (p. 118) (Verly *et al.*, 2009) e reflete uma maior estruturação na região N-terminal de LyeTx I. Tal comportamento pode estar relacionado com um maior potencial de atividade biológica, como já mostrado em outros trabalhos, nos quais peptídeos amidados são mais ativos do que seus análogos não-amidados (Sforça *et al.*, 2004).

Experimentos heteronucleares de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (Figura 3.66, p. 158 e 3.67, p. 159) e $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC-SOFAST (Figura 3.68, p. 160) permitiram a atribuição completa aos núcleos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N de LyeTx I em micelas de DPC- d_{38} . O mapa de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado apresenta as correlações devidas a acoplamentos 1J de CH e CH_3 em preto e CH_2 em vermelho. Na Figura 3.66 (p. 158), a qual apresenta a região de acoplamento entre C_α e H_α , pode-se notar facilmente as correlações dos grupos CH_α de resíduos de Gly-10 e Gly-14, com deslocamento químicos de C_α menores que 49 ppm e em vermelho. Os demais resíduos estão assinalados também na Figura 3.66.

A Figura 3.67 apresenta a região de acoplamentos entre núcleos de ^{13}C e ^1H de cadeias laterais assinaladas e mostra uma grande dispersão destes núcleos, facilitando uma atribuição completa e inequívoca. O mapa de contornos $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC-SOFAST (Figura 3.68, p. 160) mostra correlações devidas ao acoplamento 1J de ^{15}N e ^1H amídicos e a grande dispersão dos deslocamentos químicos de ^{15}N resultou em poucas sobreposições no mapa de contornos. Estas sobreposições ocorrem entre H_N dos resíduos de Lys-7, Phe-8 e Gln-21 e, também, entre Asn-12, His-16 e Lys-19. Entretanto, a análise conjunta de todos os experimentos permitiu a atribuição completa também do mapa de contornos $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC-SOFAST.

I WLTALKFLGKN LGKHLA K Q Q L A K L -NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 25-NT

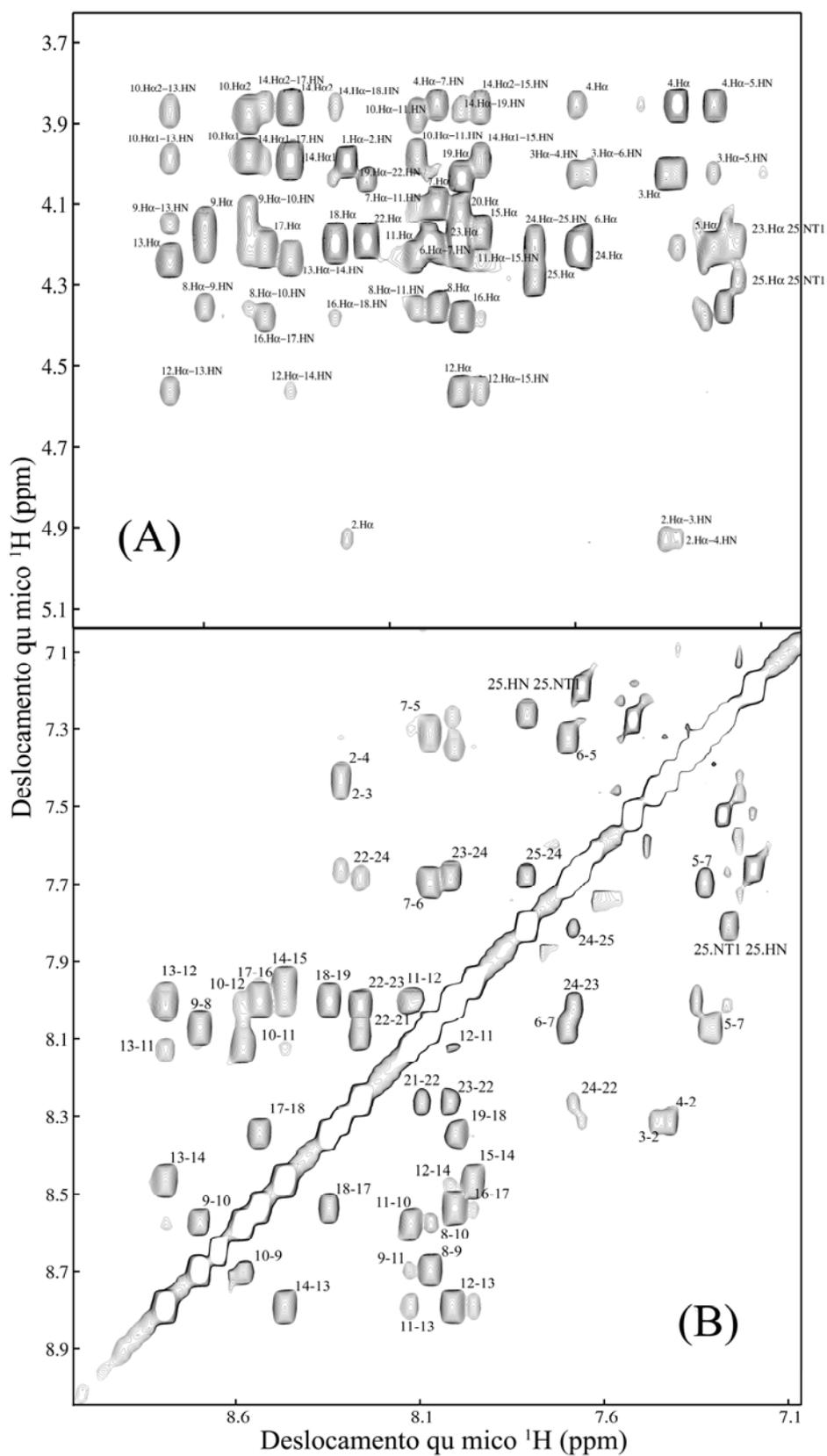


Figura 3.65 - Mapas de contornos parciais NOESY (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈. (A) Região de interação $d_{\alpha N}(i,i+n)$ (B) Região de interação de interação $d_{NN}(i,i+n)$.

I W L T A L K F L G K N L G K H L A K Q Q L A K L - N H ₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 25-NT

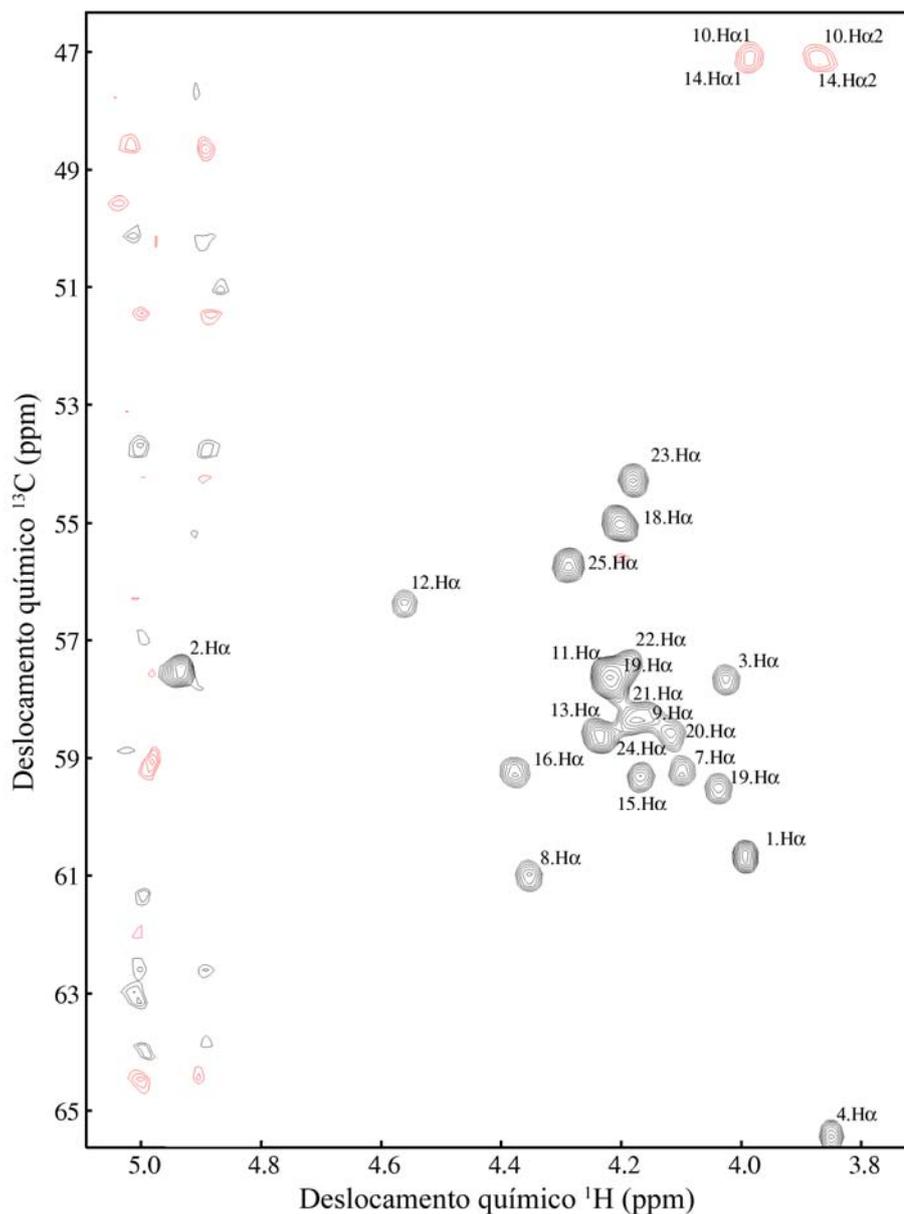


Figura 3.66 - Mapa de contornos parcial $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38} . Região de acoplamentos $^1J_{\text{HC}\alpha}$ de cadeias laterais de aminoácidos.

A atribuição completa aos núcleos de ^1H , ^{13}C e ^{15}N do peptídeo LyeTx I em micelas de DPC permitiu a determinação dos deslocamentos químicos destes núcleos, os quais estão apresentados na Tabela 3.26 (p. 161). Com exceção do nitrogênio amídico do resíduo de Leu-1, todos os demais resíduos tiveram seus núcleos com deslocamentos químicos determinados, apresentando-se próximos a valores estimados para estruturas helicoidais. Estes dados de deslocamento químico foram empregados para obtenção de restrições de ângulos diedros da cadeia principal de LyeTx I, para então serem utilizados em cálculos de dinâmica molecular.

I W L T A L K F L G K N L G K H L A K Q Q L A K L - N H ₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 25-NT

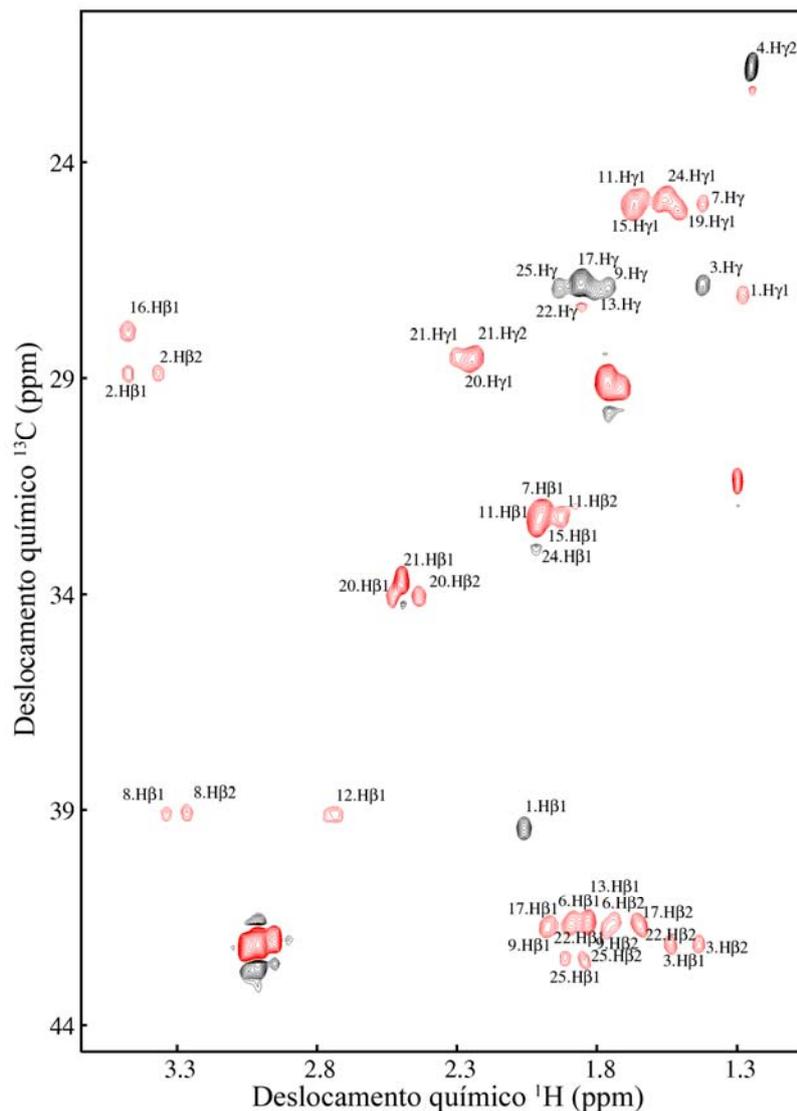


Figura 3.67 - Mapa de contornos parcial $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-editado (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} de DPC- d_{38} . Região de acoplamentos $^1J_{\text{HC}}$ de cadeias laterais.

O resumo das principais correlações características de estrutura α -hélice observadas no mapa de contornos NOESY de LyeTx I em micelas de DPC- d_{38} é apresentado na Figura 3.69 (p. 160). O alto número de correlações do tipo $d_{\alpha\text{N}}(i,i+3)$, $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ envolvendo os resíduos presentes entre Ala-5 e Leu-25, incluindo a amidação do grupo C-terminal, indicam uma conformação helicoidal nesta extensão da cadeia peptídica de LyeTx I, consistente com os resultados obtidos por CD em meio micelar de DPC. Os valores de intensidades de todos os nOes (intra-residuais e inter-residuais) observados no experimento de NOESY foram convertidos em distâncias semi-quantitativas, para serem empregadas juntamente com as restrições de ângulos diedros em cálculos de dinâmica molecular.

I W L T A L K F L G K N L G K H L A K Q Q L A K L - NH₂
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 25-NT

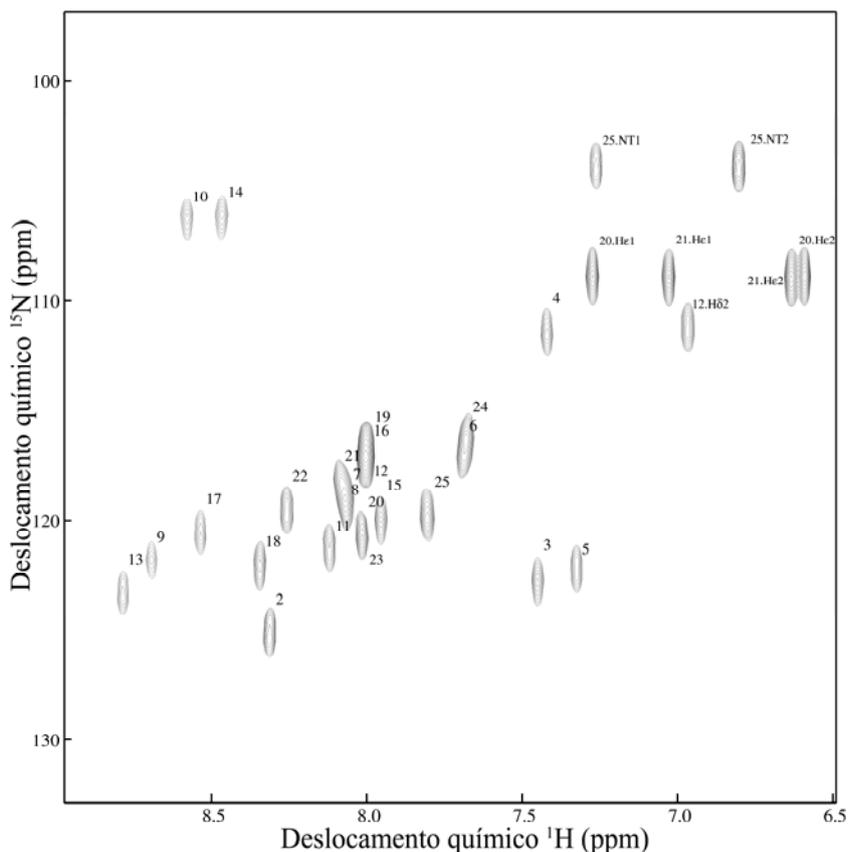


Figura 3.68 - Mapa de contornos parcial ¹H-¹⁵N-HMQC-SOFAST (600 MHz) de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-d₃₈. Região de acoplamentos ¹J_{HN}.

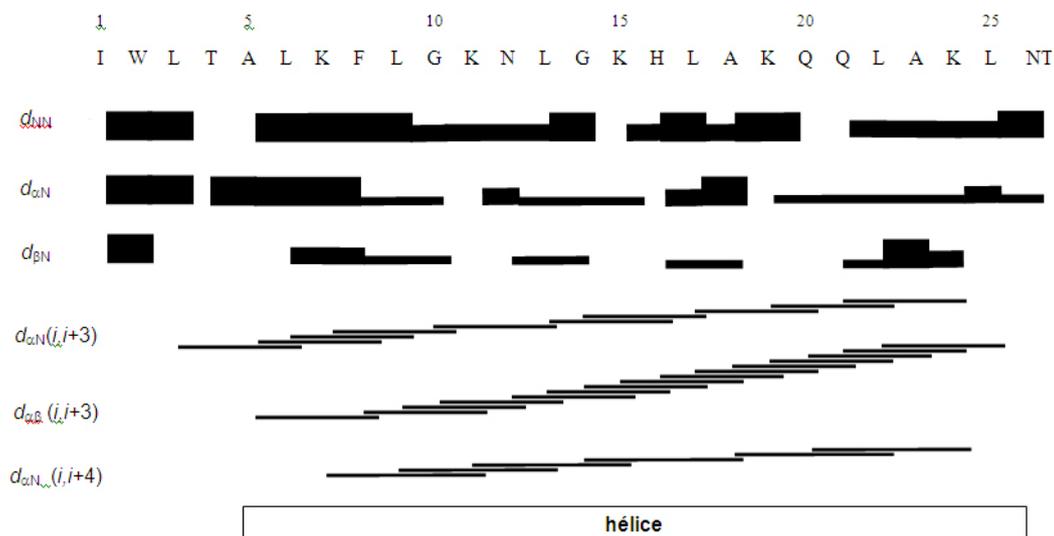


Figura 3.69 - Diagrama de conectividades de nOes para o peptídeo LyeTx I em solução micelar de DPC 400 mmol.L⁻¹. Apresentação dos assinalamentos de interações características de estrutura secundária regular presente em peptídeos. As intensidades das interações d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$ no diagrama estão diferenciadas como fortes, médias e fracas de acordo com a espessura das linhas. Várias interações de média distância $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ foram observadas e estão representadas por linha finas que unem os resíduos que interagem entre si.

Tabela 3.26 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{15}N e ^{13}C (em ppm) para o peptídeo LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} , 25°C (600 MHz)

Resíduo	δ_{NH}	$\delta_{\text{H}\alpha}$ (2;1)*	$\delta_{\text{H}\beta}$ (2;1)	δ_{outros}	$\delta_{\text{C}\alpha}$	$\delta_{\text{C}\beta}$	δ_{N}
Ile 1	8,46	3,99	2,05	H γ_{11} - 1,28	60,59	26,88	-
Trp 2	8,31	4,92	3,47	H ϵ_1 9,86, H ϵ_3 7,42	57,57	28,92	125,11
Leu 3	7,45	4,02	1,43 1,53	H δ_1 0,82, H δ_{21} 0,92	57,67	42,21	122,69
Thr 4	7,42	3,85	3,47	H γ_1 1,23	65,44	-	111,59
Ala 5	7,32	4,20	1,77	-	57,65	18,19	122,62
Leu 6	7,70	4,20	1,88	H γ_1 1,75, H δ_{11} 0,95	54,93	32,22	117,27
Lys 7	8,07	4,09	1,93	H γ_1 - 1,42, H δ_1 - 1,78, H ϵ_1 - 2,95	59,20	32,10	118,81
Phe 8	8,07	4,35	3,26 3,33	-	59,20	39,09	118,81
Leu 9	8,69	4,14	1,76 1,97	H γ_1 - 1,76, H δ_{11} - 1,01	55,09	41,68	121,90
Gly 10	8,57	3,87 3,98	-	-	47,03	-	106,21
Lys 11	8,12	4,22	2,01	H γ_2 - 1,53, H γ_1 - 1,64, H δ_1 - 1,92, H ϵ - 3,06	58,59	32,42	121,42
Asn 12	8,01	4,56	2,72 2,75	H γ_2 - 1,53, H γ_1 - 1,64, H δ_1 - 1,92, H ϵ - 3,06	56,34	39,12	117,08
Leu 13	8,78	4,24	1,82	H δ_{11} - 0,94	58,54	41,74	123,32
Gly 14	8,46	3,85 3,99	-	-	47,18	-	106,21
Lys 15	7,95	4,16	1,93	H γ_1 - 1,68, H γ_2 - 1,50, H ϵ_1 - 3,00, H δ_1 - 1,93	59,35	32,22	120,02
His 16	8,00	4,37	3,47		59,17	27,92	117,68
Leu 17	8,53	4,21	1,64 1,96	H γ - 1,65, H δ - 0,97	55,09	41,68	120,83
Ala 18	8,34	4,18	1,55	-	57,52	18,19	121,78
Lys 19	8,00	4,03	1,99	H γ_1 - 1,65 H δ_1 - 1,74, ϵ_1 - 3,00	59,50	32,22	119,80
Gln 20	8,01	4,11	2,25	H γ - 2,43, H γ - 2,52	59,32	28,61	117,88
Gln 21	8,09	4,19	2,22; 2,30	H γ - 2,49	58,39	28,49	118,21
Leu 22	8,25	4,18	1,64; 1,89	H γ - 1,64, H δ - 0,94	55,04	41,68	119,64
Ala 23	8,01	4,17	1,55	-	57,40	18,19	120,75
Lys 24	7,65	4,22	2,01	H γ - 1,55, H γ - 1,67, H δ - 1,78, H ϵ - 3,04	57,52	32,22	116,00
Leu 25	7,80	4,28	1,68; 1,92	H γ - 1,68, H δ_{11} - 0,99, H δ_{21} - 0,93	55,78	42,50	119,81

3.3.4.1 Cálculos de dinâmica molecular

Previamente ao cálculo de dinâmica molecular, as restrições de distâncias e de ângulos diedros foram analisadas pelo programa *Queen* (Nabuurs *et al.*, 2003) para verificar a contribuição de cada uma na estrutura final de LyeTx I. A Tabela 3.27 mostra o número total de restrições (R(T)) e o tipo de cada restrição, (restrições intra-residuais - R(IR), sequenciais - R(SQ), de média distância - R(MR), de longa distância - R(LR) e de ângulos diedros - R(AD)) utilizadas para determinação estrutural por dinâmica molecular e que foram avaliadas usando o programa *Queen*.

Tabela 3.27 - Número de restrições totais R(T), restrições intra-residuais R(IR), sequenciais R(SQ), de média distância R(MR), de longa distância R(LR) e de ângulos diedros R(AD) obtidos por RMN

Peptídeo/Meio	Nº de R(T)	Nº de R(IR)	Nº de R(SQ)	Nº de R(MR)	Nº de R(LR)	Nº de R(AD)
LyeTx I/DPC	415	218	91	76	0	30

Os valores de unicidade (I_{uni}) e informação média (I_{med}) de cada restrição obtidos desta análise podem ser observados na Figura 3.70 (p. 163). Dentre todas as restrições, somente a restrição de distância entre 22H α -25HN apresentou um alto valor de I_{uni} ($I_{uni} = 2,41$) (Figura 3.70A). Este alto valor de I_{uni} está relacionado com interferências de DPC- d_{38} no mapa de contornos NOESY que não permitiram a atribuição da correlação Leu-22H α -Leu-25H $_N$ em ambos os lados da diagonal. Entretanto, esta mesma restrição apresentou um baixo valor de I_{med} , indicando que esta não tem forte impacto sobre as estruturas calculadas (Figura 3.70B), pois é suportada por outras correlações próximas a região de Leu-22 e Leu-25, como visto anteriormente nos mapas de contornos parciais de NOESY (Figura 3.65, p. 157).

A análise das restrições mostrou uma boa qualidade dos dados de RMN. Dessa forma, todas as 415 restrições foram empregadas para determinação de estruturas 3D de LyeTx I em micelas de DPC por cálculo de dinâmica molecular. A Figura 3.71A (p. 164) mostra as 20 estruturas mais estáveis sobrepostas de LyeTx I na presença de micelas de DPC- d_{38} , onde em azul estão representadas as cadeia laterais hidrofílicas e, em verde, as cadeias laterais hidrofóbicas. As estruturas apresentam uma dobra sutil na α -hélice. Algumas correlações observadas do tipo $d_{N,N}(i, i+2)$ envolvendo resíduos de Phe-8 Gly-10, Asn-12 e Gly-14 foram evidências experimentais desta dobra.

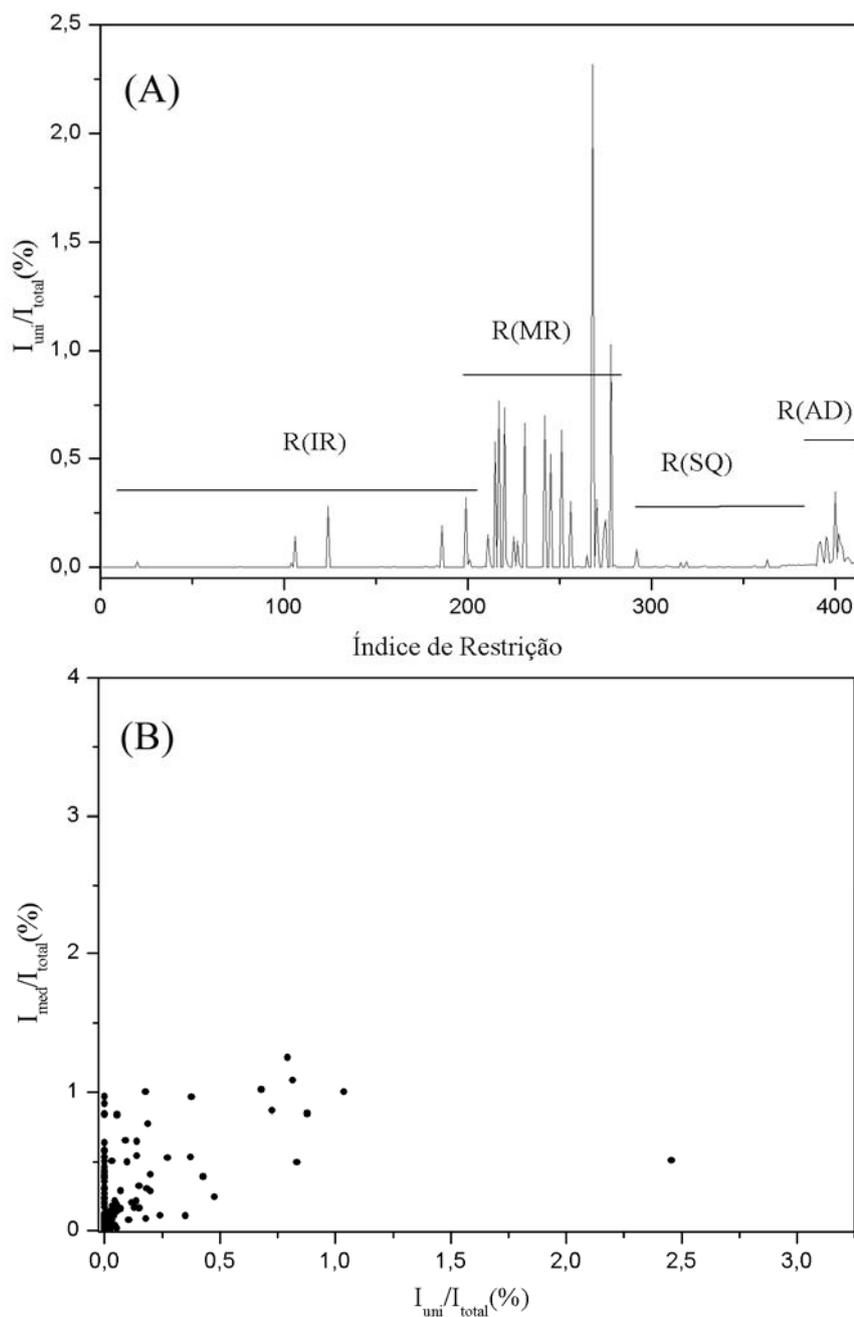


Figura 3.70 - Análise das restrições de distâncias e ângulos diedros obtidas por RMN de LyeTx I em solução micelar 400 mmol.L^{-1} DPC- d_{38} . (A) Gráfico de unicidade (I_{uni}) pelo índice de cada restrição e (B) gráfico de informação única (I_{uni}) por informação média (I_{med}). R(IR) - restrições intra-residuais; R(SQ) - restrições sequenciais; R(MR) – restrições de média distância; R(AD) - restrições de ângulos diedros.

Outras correlações inter-residuais observadas envolvendo Ile-1, Trp-2 e Leu-3 indicaram que a extremidade *N*-terminal exibe uma estrutura ordenada, embora em menor extensão do que a extremidade *C*-terminal, como pode ser visto na Figura 3.71A (p. 164). Estes resultados estruturais de RMN do peptídeo LyeTx I apresentam-se similares àqueles encontrados para o peptídeo antimicrobiano DD K (Figura 3.17,

p. 84), com uma menor estruturação na extremidade *N*-terminal seguido por um segmento helicoidal (Leu-6 até *C*-terminal, para LyeTx I) que se estende até a extremidade *C*-terminal, incluindo a amidação desta região. Alguns estudos apontam uma preferência de interação de resíduos de triptofano com a interface da membrana fosfolipídica, apresentando certo grau de inserção na bicamada (Ulmschneider e Sansom, 2001). Assim, a localização do resíduo de Trp (Trp-2) próximo à extremidade *N*-terminal de LyeTx I pode ter um papel fundamental de “ancorar” o peptídeo no meio fosfolipídico (Figuras 3.71B e 3.71C).

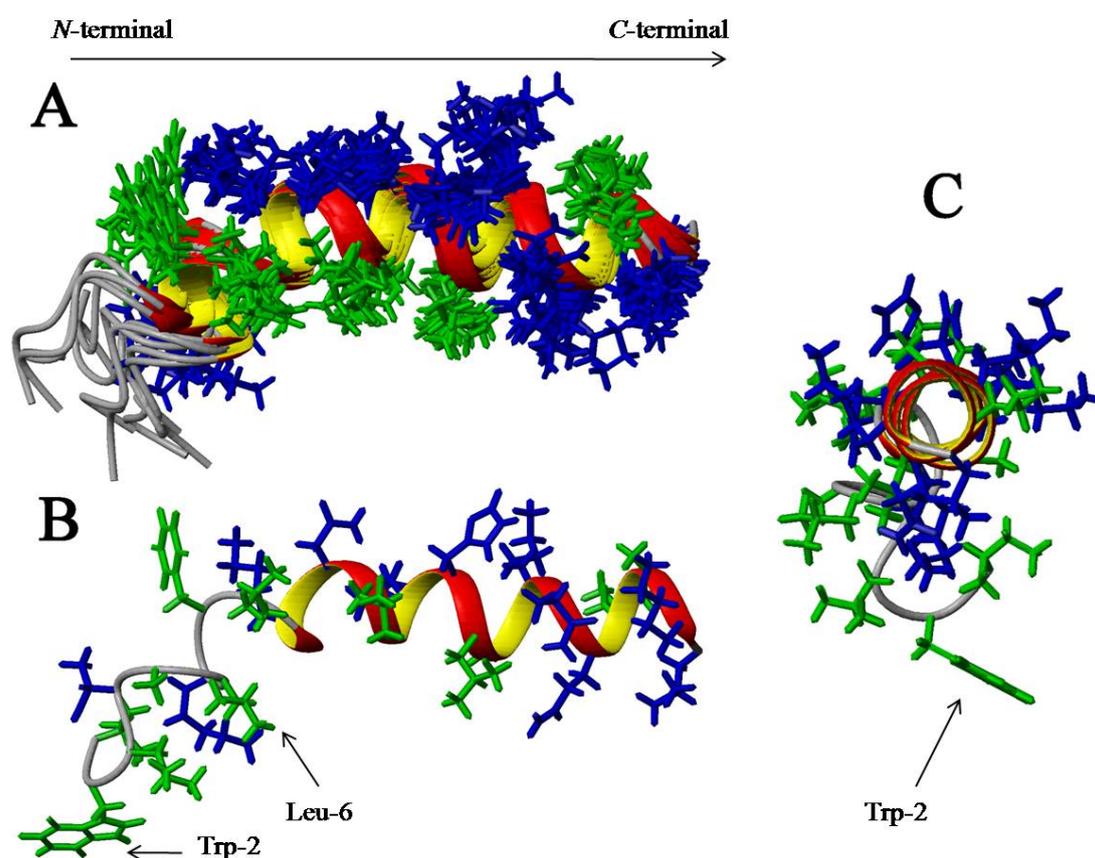


Figura 3.71 - Estruturas obtidas por RMN em solução de 2 mM de LyeTx I em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ DPC-*d*₃₈ em água. (A) Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis em cada meio. (B e C) Estrutura mais estável vista lateralmente e ao longo do eixo da hélice, respectivamente. As cadeias laterais hidrofóbicas estão representadas em verde e as hidrofílicas em azul.

A qualidade das estruturas foi verificada pelo programa PROCHECK através de análise estatística das estruturas mais estáveis de LyeTx I e os resultados estão resumidos na Tabela 3.28 (p. 165). O baixo valor de RMSD (0,58 Å) obtido para o segmento helicoidal (Leu-6 a Leu-25) do peptídeo mostra uma considerável rigidez nesta região, porém o valor maior de RMSD (1,18 Å) calculado ao se considerar todos os resíduos indica que se tem uma relativa flexibilidade para a molécula como um todo.

Tabela 3.28 - Resumos dos dados de cálculos estruturais de LyeTx I em DPC- d_{38}

RMSD – Todos os resíduos ^a		
Cadeia principal		1,18 Å
Cadeia principal e átomos pesados		1,87 Å
RMSD – Seguimento helicoidal ^{a, b}		
Cadeia principal		0,58 Å
Cadeia principal e átomos pesados		1,05 Å
Análise gráfica por Ramachandran		
Resíduos em região favorecidas		86,4%
Resíduos em regiões permitidas		13,4%
Resíduos em regiões menos permitidas		0,0%
Resíduos em regiões não permitidas		0,2%

a - Dados do programa MOLMOL; b- Dados de Leu-6 a Leu-25

O gráfico de Ramachandran (Figura 3.72) revela que a maioria dos ângulos de torção encontra-se em regiões mais favoráveis (86,4%) ou regiões permitidas (13,4%) do gráfico, indicando uma boa qualidade das estruturas. O único resíduo encontrado em regiões não permitidas (0,2%) foi Trp-2, decorrente de uma estrutura pouco convencional do peptídeo na extremidade *N*-terminal, incluindo a orientação do resíduo de Trp-2 (Figura 3.71C, p. 164).

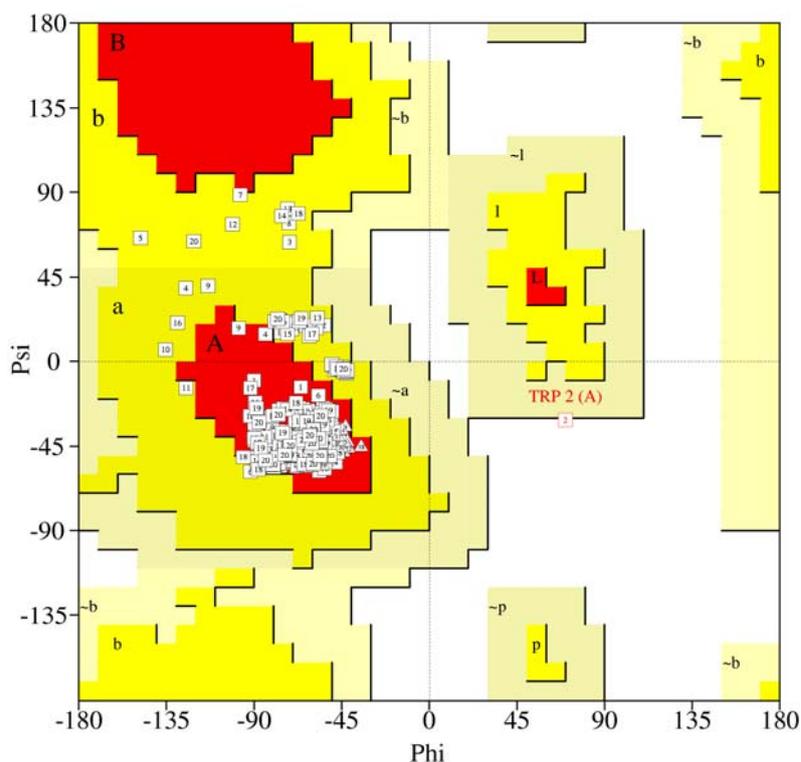


Figura 3.72 - Gráfico de Ramachandran para as 20 estruturas mais estáveis de LyeTx I em solução micelar de 400 mmol.L⁻¹ de DPC- d_{38} . Regiões favorecidas [A,B,L], regiões permitidas [a, b, l, p] e regiões menos permitidas [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p]. As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico e são denominadas de regiões favorecidas; as regiões em amarelo escuro indicam conformações menos estáveis, com aproximação de átomos; e a região em amarelo claro indica estruturas pouco flexíveis.

Conclusões e perspectivas

O presente trabalho teve como objetivo obter informações estruturais e termodinâmicas para o entendimento do modo de ação de peptídeos antimicrobianos em membranas bacterianas. De fato, os resultados obtidos a partir das diferentes técnicas empregadas para sua realização apresentaram excelente concordância, permitindo a compreensão do comportamento dos peptídeos estudados em ambientes que mimetizaram as condições de membranas biológicas, sendo possível determinar fatores que influenciam na interação peptídeo-membrana.

No caso do peptídeo antimicrobiano DD K foi possível determinar dados físico-químicos indicando que sua interação com as membranas miméticas de 1-palmitol-2-oleil-fosfatidilcolina é afetada pela presença de colesterol. Os estudos de ITC mostraram que o colesterol reduz a constante de interação aparente de DD K/PC e altera a estequiometria do complexo. Além disso, a extensão do extravasamento de CF incorporado em PC-LUVs apresentou também uma redução significativa após a adição do colesterol e, por fim, os estudos de DLS revelaram que DD K é capaz de incorporar-se em PC-LUVs, levando a um aumento significativo do tamanho da vesícula, porém não em LUVs com alta concentração de colesterol. Tais dados contribuíram para explicar a baixa atividade hemolítica do peptídeo, que em grande parte, se deve à presença do colesterol em células eucariotas.

Os dados de RMN em micelas de DPC mostraram que DD K apresenta uma hélice anfipática do resíduo Lys-7 até a extremidade C-terminal, com o resíduo de triptofano direcionado para a região hidrofóbica das micelas. Esses arranjos estruturais colaboraram para explicar a alta contribuição do componente entrópico encontrado na interação DD K/PC-LUVs. Isto porque a anfipaticidade de DD K favorece a interação com a bicamada e, conseqüentemente, a dessolvatação da face hidrofóbica, permitindo sua inserção na bicamada. Esta dessolvatação resulta em um aumento nos graus de liberdade de moléculas de água, sendo uma razão importante para uma contribuição entrópica elevada. Soma-se a isto um provável aumento da fluidez da bicamada lipídica resultante de sua desorganização devido à interação com o peptídeo.

Em relação à homotarsinina (HMT-2), verificou-se que esta apresenta um comportamento distinto daquele apresentado por seu monômero (HMT-1), inclusive quando o estudo é realizado em um mesmo ambiente. Os resultados estruturais de CD e RMN contribuíram para explicar como o fator estrutural pode influenciar a velocidade de dimerização. Enquanto HMT-1 apresenta estrutura α -helicoidal em solução de SDS,

em solução tampão Tris-HCl o peptídeo encontra-se desestruturado. Tal comportamento conformacional de HMT-1 em SDS facilita a aproximação das moléculas do peptídeo, favorecendo a dimerização. Os resultados estruturais mostraram também mudanças conformacionais dos peptídeos HMT-1 e HMT-2 ao entrarem em contato com a superfície da membrana. Entretanto, estudos de CD apontaram para uma menor tendência à formação de estrutura α -helicoidal do peptídeo HMT-1 em todos os meios comparando-se com HMT-2. Este comportamento indicou uma menor interação com bicamadas fosfolipídicas por parte de HMT-1, o que foi confirmado pelos estudos termodinâmicos conduzidos por ITC e DLS. Tais estudos mostraram diferenças consideráveis nas interações de ambos os peptídeos com LUVs de mesma composição, havendo sempre uma maior interação de HMT-2. Não obstante, estes resultados termodinâmicos comprovaram que o peptídeo HMT-2 possui maior interação com LUVs carregadas negativamente, expondo sua seletividade por membranas bacterianas. Estes estudos revelaram também o papel fundamental do caráter catiônico de HMT-2 na interação com a superfície da membrana. A presença de tampão fosfato na formulação das LUVs diminuiu significativamente a interação peptídeo-membrana, sugerindo que os íons H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} podem neutralizar as cargas positivas de HMT-2, o que resulta em uma menor atração eletrostática entre o peptídeo e a superfície negativamente carregada da membrana.

Estudos mais detalhados da estrutura tridimensional de HMT-2 revelaram um comportamento diferenciado do peptídeo. Em solução micelar de DPC, o HMT-2 apresenta uma conformação com ambas as cadeias em estrutura secundária helicoidal contínua. Em contrapartida, em solução aquosa o peptídeo adota uma estrutura terciária de “super-hélice”, que é estabilizada por interações hidrofóbicas entre as cadeias do dímero. Este tipo de estrutura mostrou-se altamente anfipática, com os resíduos hidrofóbicos situados no interior da estrutura, o que pode resultar na sua resistência à ação de peptidases, permitindo o alcance à superfície da membrana sem sofrer danos em sua estrutura. Além disso, a estrutura em super-hélice de HMT-2 expõe ainda mais os resíduos hidrofílicos carregados positivamente e intensifica a interação do peptídeo com a membrana bacteriana. Entretanto, alguns estudos são ainda necessários para descrever de forma mais acurada o modo de interação da homotarsinina com a membrana bacteriana. Dados de restrições conformacionais como acoplamento dipolar residual (RDC) ou acoplamento dipolar total podem fornecer informações sobre a orientação das cadeias monoméricas de HMT-2 em ambientes de membrana, como bicelas ou bicamadas fosfolipídicas.

Os ensaios biológicos realizados para LyeTx I revelaram que este peptídeo possui grande atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, mostrando-se mais ativo para bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) do que para as Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

Os estudos de LyeTx I por CD mostraram propensão baixa para formação de estrutura em α -hélice em vesículas de POPC contendo colesterol, mesmo em concentrações elevadas do peptídeo. Isto pode explicar sua fraca atividade hemolítica. A espectroscopia de RMN mostrou que LyeTx I apresenta estrutura helicoidal em micelas de DPC compatível com as condições necessárias para o peptídeo iniciar sua ação antimicrobiana na membrana.

Como apresentado para cada peptídeo acima citado, foram verificadas algumas peculiaridades estruturais abrangendo anfipaticidade, carga e hidrofobicidade, indicando uma diferença no modo de sua respectiva interação na membrana.

Entretanto, este trabalho revelou um comportamento similar para DD K, HMT-2 e LyeTx I, em três aspectos. Primeiramente, todos os os peptídeos adquiriram estrutura α -helicoidal em grande extensão da cadeia peptídica ao entrarem em contato com os meios que mimetizam as membranas bacterianas. Um segundo aspecto está relacionado ao fato de tratar-se de peptídeos amidados no resíduo C-terminal: assim sendo, em todos os casos as respectivas estruturas em α -hélices tiveram o seu dipolo estabilizado, estenderam-se até esta região e apresentaram-se muito estabilizadas. Por fim, nestas estruturas foi possível distinguir dobras em regiões centrais das hélices que podem estar relacionadas à maior inserção dos peptídeos nas bicamadas fosfolipídicas. Estas características estruturais mostraram-se fundamentais para uma interação forte desses peptídeos com os ambientes miméticos de membranas bacterianas.

Considerando que todos os peptídeos estudados nesta tese apresentaram atividade antibacteriana significativa (nas faixas de concentração analisadas) e ainda que a estruturação é um fator importante para esta atividade, os resultados estruturais obtidos neste trabalho reforçam este princípio.

Finalmente, estes estudos mostraram ainda que mudanças nas composições lipídicas das membranas celulares podem alterar a estrutura de peptídeos, modificando seus modos de interação e, conseqüentemente, suas atividades biológicas. Portanto, a diversidade de fosfolipídios presentes em diferentes microrganismos pode explicar as diferenças das atividades de um mesmo peptídeo frente a estas espécies. Assim, torna-se necessário o estudo adicional das interações entre peptídeos antimicrobianos com vesículas de composições diversas de fosfolipídeos para propor um mecanismo preciso da atividade destas moléculas.

Referências Bibliográficas

Abrunhosa, F.; Faria, S.; Gomes, P.; Tomaz, I.; Pessoa, J. C.; Andreu, D. e Bastos, M. (2005). "Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition". *Journal of Physical Chemistry B-Condensed Phase*, v.109, n.36, p.17311-17319.

Ali, M. F.; Soto, A. M.; Knoop, F. C. e Conlon, J. M. (2001). "Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae)". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, v.1550, n.1, p.81-89.

Alvarez, C.; Casallanovo, F.; Shida, C. S.; Nogueira, L. V.; Martinez, D.; Tejuca, M.; Pazos, I. F.; Lanio, M. E.; Menestrina, G. e Lissi, E. (2003). "Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces—Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction". *Chemistry and Physics of Lipids*, v.122, n.1-2, p.97-105.

Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J. e Subra, G. (2006). "Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis". *Molecular Biotechnology*, v.33, n.3, p.239-254.

Annis, I.; Hargittai, B. e Barany, G. (1997). "Disulfide bond formation in peptides". *Methods in Enzymology*, v.289, p.198-221.

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

Atkins, P. W. "Physical Chemistry". (6th). Oxford University Press; Oxford, Melbourne, Tokyo, 1998.

Aue, W. P.; Bartholdi, E. e Ernst, R. R. (1976). "Two dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance". *The Journal of Chemical Physics*, v.64, n.5, p.2229-2247.

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

Bachere, E.; Gueguen, Y.; Gonzalez, M.; De Lorgeril, J.; Garnier, J. e Romestand, B. (2004). "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*". *Immunological reviews*, v.198, n.1, p.149-168.

Bastian, A. e Schäfer, H. (2001). "Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro". *Regulatory peptides*, v.101, n.1-3, p.157-161.

Batista, C. V.; Da Silva, L. R.; Sebben, A.; Scaloni, A.; Ferrara, L.; Paiva, G. R.; Olamendi-Portugal, T.; Possani, L. D. e Bloch Jr, C. (1999). "Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*". *Peptides*, v.20, n.6, p.679-686.

Batista, C. V. F.; Scaloni, A.; Rigden, D. J.; Silva, L. R.; Rodrigues Romero, A.; Dukor, R.; Sebben, A.; Talamo, F. e Bloch, C. (2001). "A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*". *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.494, n.1-2, p.85-89.

Bechinger, B. (1999). "The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1462, n.1-2, p.157-183.

Bechinger, B. (2004). "Structure and function of membrane-lytic peptides". *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.23, n.3, p.271-292.

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

Boman, H. G.; Agerberth, B. e Boman, A. (1993). "Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine". *Infection and immunity*, v.61, n.7, p.2978-2984.

Boman, H. G. (2003). "Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts". *Journal of Internal Medicine*, v.254, n.3, p.197-215.

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

Braff, M. H. e Gallo, R. L. (2006). "Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier". *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.306, p.91-110.

Braun, S.; Kalinowski, H. O. e Berger, S. "One Hundred and Fifty and More Basic NMR Experiments. A Practical Course". Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1998.

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

Braun, W. e Go, N. (1985). "Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints* 1: A new efficient algorithm". *Journal of Molecular Biology*, v.186, n.3, p.611-626.

Brockhaus, M.; Ganz, P.; Huber, W.; Bohrmann, B.; Loetscher, H. e Seelig, J. (2007). "Thermodynamic studies on the interaction of antibodies with beta-amyloid peptide". *Journal of Physical Chemistry B*, v.111, n.5, p.1238-1243.

Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?". *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.3, p.238-250.

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

Brünger, A. T.; Krukowski, A. e Erickson, J. W. (1990). "Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing". *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, v.46, n.7, p.585-593.

Bulaj, G. (2005). "Formation of disulfide bonds in proteins and peptides". *Biotechnology Advances*, v.23, n.1, p.87-92.

Bulet, P.; Cociancich, S.; Dimarcq, J. L.; Lambert, J.; Reichhart, J. M.; Hoffmann, D.; Hetru, C. e Hoffmann, J. A. (1991). "Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family". *Journal of Biological Chemistry*, v.266, n.36, p.24520-24525.

Carpino, L. A. e Han, G. Y. (1972). "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group". *The Journal of Organic Chemistry*, v.37, n.22, p.3404-3409.

Cavanagh, J. "Protein NMR spectroscopy: principles and practice". Academic Press; California, 1996.

Cavanagh, J. "Protein NMR spectroscopy: principles and practice". Elsevier Academic Press; Oxford, 2006.

Chan, W. C. e White, P. D. "Fmoc solid phase peptide synthesis". Oxford University Press; New York, 2000.

Claridge, T. D. W. "High-resolution NMR techniques in organic chemistry". Elsevier Science Ltd.; Oxford, 1999.

Clore, G. M.; Nilges, M.; Sukumaran, D. K.; Brünger, A. T.; Karplus, M. e Gronenborn, A. M. (1986). "The three-dimensional structure of 1-purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics". *The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, v.5, n.10, p.2729-2735.

Clore, G. M.; Starich, M. R.; Bewley, C. A.; Cai, M. e Kuszewski, J. (1999). "Impact of residual dipolar couplings on the accuracy of NMR structures determined from a minimal number of NOE restraints". *Journal of the American Chemical Society*, v.121, n.27, p.6513-6514.

Cornilescu, G.; Delaglio, F. e Bax, A. (1999). "Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology". *Journal of Biomolecular NMR*, v.13, n.3, p.289-302.

Crabbé, P. "Optical rotatory dispersion and circular dichroism in organic chemistry". Holden-Day; New York, 1965.

Crabbé, P. "ORD and CD in chemistry and biochemistry: an introduction". Academic Press; New York, 1972.

Creighton, T. E. "Protein structure: a practical approach". (2nd). Oxford University Press; Oxford, 1997.

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

Deber, C. M.; Liu, L. P.; Wang, C.; Goto, N. K.; Reithmeier, R. A. F.; Simon, S. A. e McIntosh, T. J. "Peptide-Lipid Interactions (Current Topics in Membranes)". Academic Press; San Diego, 2002.

Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J. e Bax, A. D. (1995)."NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes". *Journal of Biomolecular NMR*, v.6, n.3, p.277-293.

Delaglio, F.; Wu, Z. e Bax, A. (2001)."Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra". *Journal of Magnetic Resonance*, v.149, n.2, p.276-281.

Dennison, S. R.; Wallace, J.; Harris, F. e Phoenix, D. A. (2005)."Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships". *Protein and Peptide Letters*, v.12, n.1, p.31-39.

Edelhoch, H. (1967)."Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins*". *Biochemistry*, v.6, n.7, p.1948-1954.

Everett, D. H. "Basic principles of colloid science". Royal Society of Chemistry; London, 1988.

Fendler, J. H. (1980)."Surfactant vesicles as membrane mimetic agents: characterization and utilization". *Accounts of Chemical Research*, v.13, n.1, p.7-13.

Fitton, J. E. (1981)."Physicochemical Studies on Delta Haemolysin, a Staphylococcal Cytolytic Polypeptide". *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v.130, n.2, p.257-260.

García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M. e Rodríguez-Palenzuela, P. (1998)."Plant defense peptides". *Biopolymers*, v.47, n.6, p.479-491.

Gesell, J.; Zasloff, M. e Opella, S. J. (1997)."Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution". *Journal of Biomolecular NMR*, v.9, n.2, p.127-135.

Giacometti, A.; Cirioni, O.; Barchiesi, F.; Del Prete, M. S. e Scalise, G. (1999)."Antimicrobial activity of polycationic peptides". *Peptides*, v.20, n.11, p.1265-1273.

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

Gudmundsson, G. H.; Agerberth, B.; Odeberg, J.; Bergman, T.; Olsson, B. e Salcedo, R. (2004). "The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes". *European Journal of Biochemistry*, v.238, n.2, p.325-332.

Guentert, P. (1998). "Structure calculation of biological macromolecules from NMR data". *Quarterly Reviews of Biophysics*, v.31, n.02, p.145-237.

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

Havel, T. e Wüthrich, K. (1984). "A distance geometry program for determining the structures of small proteins and other macromolecules from nuclear magnetic resonance measurements of intramolecular ^1H - ^1H proximities in solution". *Bulletin of Mathematical Biology*, v.46, n.4, p.673-698.

Helmerhorst, E. J.; Breeuwer, P.; Van 't Hof, W.; Walgreen-Weterings, E.; Oomen, L.; Veerman, E. C. I.; Amerongen, A. V. e Abee, T. (1999). "The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion". *Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.11, p.7286-7291.

Herrero, A. A.; Gomez, R. F.; Snedecor, B.; Tolman, C. J. e Roberts, M. F. (1985). "Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids". *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.22, n.1, p.53-62.

Hiemenz, P. C. e Rajagopalan, R. "Principles of colloid and surface chemistry". CRC Press; New York, 1997.

Huang, H. W. (2006). "Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v.1758, n.9, p.1292-1302.

Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M. e Albericio, F. (2009). "Amino Acid-Protecting Groups". *American Chemical Society*, v.109, n.6, p.2455-2504.

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

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

Karplus, M. (1959). "Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments". *The Journal of Chemical Physics*, v.30, n.1, p.11-16.

Katayama, H.; Ohira, T.; Aida, K. e Nagasawa, H. (2002). "Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone". *Peptides*, v.23, n.9, p.1537-1547.

Kelly, S. M.; Jess, T. J. e Price, N. C. (2005). "How to study proteins by circular dichroism". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v.1751, n.2, p.119-139.

Kent, S. B. H. (1988). "Chemical synthesis of peptides and proteins". *Annual Review of Biochemistry*, v.57, n.1, p.957-989.

Kirby, C. e Gregoriadis, G. (1984). "Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes". *Nature Biotechnology*, v.2, n.11, p.979-984.

Kline, A. D.; Braun, W. e Wüthrich, K. (1986). "Studies by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the [alpha]-amylase inhibitor Tendamistat". *Journal of Molecular Biology*, v.189, n.2, p.377-382.

Koradi, R.; Billeter, M. e Wüthrich, K. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures". *Journal of Molecular Graphics*, v.14, n.1, p.51-55.

Krieger, E.; Vriend, G. e Spronk, C. YASARA–Yet Another Scientific Artificial Reality Application: YASARA Biosciences 2008.

Krishnakumar, S. S. e London, E. (2007). "Effect of sequence hydrophobicity and bilayer width upon the minimum length required for the formation of transmembrane helices in membranes". *Journal of Molecular Biology*, v.374, n.3, p.671-687.

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

Kumar, A.; Ernst, R. R. e Wüthrich, K. (1980). "A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.95, n.1, p.1-6.

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

Lipsitz, R. S. e Tjandra, N. (2004). "RESIDUAL DIPOLAR COUPLINGS IN NMR STRUCTURE ANALYSIS*1". *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.33, p.387-413.

Lohner, K. e Prenner, E. J. (1999). "Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with

membrane-mimetic systems". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v.1462, n.1-2, p.141-156.

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

Madden, T. D. e Cullis, P. R. (1982). "Stabilization of bilayer structure for unsaturated phosphatidylethanolamines by detergents". *Biochimica et Biophysica Acta*, v.684, p.149-153.

Markley, J. L.; Bax, A.; Arata, Y.; Hilbers, C. W.; Kaptein, R.; Sykes, B. D.; Wright, P. E. e Wüthrich, K. (1998). "Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids–IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy". *Journal of Biomolecular NMR*, v.12, n.1, p.1-23.

Melnyk, R. A.; Partridge, A. W.; Yip, J.; Wu, Y.; Goto, N. K. e Deber, C. M. (2003). "Polar residue tagging of transmembrane peptides". *Biopolymers*, v.71, n.6, p.675-685.

Mendoza-Espinosa, P.; Moreno, A.; Castillo, R. e Mas-Oliva, J. (2007). "Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.365, n.1, p.8-15.

Merrifield, R. B. (1963). "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide". *Journal of the American Chemical Society*, v.85, n.14, p.2149-2154.

Montalbetti, C. e Falque, V. (2005). "Amide bond formation and peptide coupling". *Tetrahedron*, v.61, n.46, p.10827-10852.

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

Nabuurs, S. B.; Krieger, E.; Spronk, C.; Nederveen, A. J.; Vriend, G. e Vuister, G. W. (2005). "Definition of a new information-based per-residue quality parameter". *Journal of Biomolecular NMR*, v.33, n.2, p.123-134.

Nabuurs, S. B.; Spronk, C.; Krieger, E.; Maassen, H.; Vriend, G. e Vuister, G. W. (2003). "Quantitative evaluation of experimental NMR restraints". *Journal of the American Chemical Society*, v.125, n.39, p.12026-12034.

Nabuurs, S. B.; Spronk, C.; Vriend, G. e Vuister, G. W. (2004). "Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation". *Concepts in Magnetic Resonance*, v.22, n.2, p.90-105.

Nascimento, A. C. C.; Fontes, W.; Sebben, A. e Castro, M. S. (2003). "Antimicrobial peptides from anurans skin secretions". *Protein and Peptide Letters*, v.10, n.3, p.227-238.

Nilges, M. "Applications of molecular modelling in NMR structure determination". Computational biochemistry and biophysics - Marcel Dekker; New York, 2001.

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

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

Ollivon, M.; Eidelman, O.; Blumenthal, R. e Walter, A. (1988). "Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octylglucoside". Biochemistry, v.27, n.5, p.1695-1703.

Ozdirekcan, S.; Etchebest, C.; Killian, J. A. e Fuchs, P. F. J. (2007). "On the Orientation of a Designed Transmembrane Peptide: Toward the Right Tilt Angle?". Journal of the American Chemical Society, v.129, n.49, p.15174-15181.

Papo, N. e Shai, Y. (2003). "Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?". Peptides, v.24, n.11, p.1693-1703.

Pecora, R. "Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy". Plenum Press; New York, 1985.

Pflugrath, J. W.; Wiegand, G.; Huber, R. e Vértesy, L. (1986). "Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the [alpha]-amylase inhibitor Hoe-467A". Journal of Molecular Biology, v.189, n.2, p.383-386.

Piotto, M.; Saudek, V. e Sklená, V. (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions". Journal of Biomolecular NMR, v.2, n.6, p.661-665.

Prates, M. V. Peptídeos Catiônicos de Phyllomedusa Tarsius (Amphibia): estrutura e atividade biológica. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Molecular, UNB, Brasília, 1999.

Pukala, T. L.; Bowie, J. H.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F. e Tyler, M. J. (2006). "Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity". Natural Product Reports, v.23, n.3, p.368-393.

Rahman, A. e Brown, C. W. (1983). "Effect of pH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate". Journal of Applied Polymer Science, v.28, n.4, p.1331-1334.

Raimondo, D.; Andreotti, G.; Saint, N.; Amodeo, P.; Renzone, G.; Sanseverino, M.; Zocchi, I.; Molle, G.; Motta, A. e Scaloni, A. (2005). "A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of

distinctin". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.102, n.18, p.6309-6314.

Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D. e Aranha, C. (2004)."Antimicrobial peptides: premises and promises". International Journal of Antimicrobial Agents, v.24, n.6, p.536-547.

Rekharsky, M.; Inoue, Y.; Tobey, S.; Metzger, A. e Anslyn, E. (2002)."Ion-pairing molecular recognition in water: aggregation at low concentrations that is entropy-driven". Journal of the American Chemical Society, v.124, n.50, p.14959-14967.

Resende, D. M.; Caetano, B. C.; Dutra, M. S.; Penido, M. L. O.; Abrantes, C. F.; Verly, R. M.; Resende, J. M.; Piló-Veloso, D.; Rezende, S. A. e Bruna-Romero, O. (2008)."Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- and cytolytic activity by CD8+ T cells". Vaccine, v.26, n.35, p.4585-4593.

Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Munhoz, V. H. O.; Aisenbrey, C.; Verly, R. M.; Bertani, P.; Cesar, A.; Piló-Veloso, D. e Bechinger, B. (2009)."Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy". Proceedings of the National Academy of Sciences, v.106, n.39, p.16639-16644.

Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Prates, M. V.; Cesar, A.; Almeida, F. C. L.; Mundim, N.; Valente, A. P.; Bemquerer, M. P.; Piló-Veloso, D. e Bechinger, B. (2008)."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". Peptides, v.29, n.10, p.1633-1644.

Rizo, J.; Blanco, F. J.; Kobe, B.; Bruch, M. D. e Gierasch, L. M. (1993)."Conformational behavior of *Escherichia coli* OmpA signal peptides in membrane mimetic environments". Biochemistry (Easton), v.32, n.18, p.4881-4894.

Rodriguez, R.; Chinae, G.; Lopez, N.; Pons, T. e Vriend, G. (1998)."Homology modeling, model and software evaluation: three related resources". Bioinformatics, v.14, n.6, p.523-528.

Rozek, A.; Friedrich, C. L. e Hancock, R. E. (2000)."Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles". Biochemistry, v.39, n.51, p.15765-15774.

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

Santos, D. M.; Verly, R. M.; Piló-Veloso, D.; De Maria, M.; De Carvalho, M. A. R.; Cisalpino, P. S.; Soares, B. M.; Diniz, C. G.; Farias, L. M. e Moreira, D. F. F. (2009)."LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*". Amino Acids, in press.

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

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

Seelig, J. (2004)."Thermodynamics of lipid–peptide interactions". Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v.1666, n.1-2, p.40-50.

Sforça M. L.; Oyama S. J.; Canduri F.; Lorenzi C. C.; Pertinhez T. A.; Konno K.; Souza B. M.; Palma M. S.; Ruggiero Neto J.; Azevedo W. F. J, Spisni A. (2004)."How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp". Biochemistry, v.43, n.19, p.5608-5017.

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

Sharma, D. e Rajarathnam, K. (2000)."13C NMR chemical shifts can predict disulfide bond formation". Journal of Biomolecular NMR, v.18, n.2, p.165-171.

Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G. e Bax, A. (2009)."TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts". Journal of Biomolecular NMR, v.44, n.4, p.213-223.

Silva, L. P.; Leite, J.; Brand, G. D.; Regis, W. B.; Tedesco, A. C.; Azevedo, R. B.; Freitas, S. M. e Bloch, C. (2008)."Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy". Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v.151, n.3, p.329-335.

Sreerama, N. e Woody, R. W. (2000)."Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set". Analytical Biochemistry, v.287, n.2, p.252-260.

Sreerama, N. e Woody, R. W. (2004)."On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra". Protein Science: A Publication of the Protein Society, v.13, n.1, p.100-112.

Stewart, J. C. M. (1980)."Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate". Analytical Biochemistry, v.104, n.1, p.10-14.

Stewart, J. M. (1976)."Solid phase peptide synthesis". Journal of Macromolecular Science, Part A, v.10, n.1, p.259-288.

Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W. e Zhang, J. W. (1991)."Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications". Journal of the American Chemical Society, v.113, n.17, p.6657-6662.

- Tanford, C. "Physical chemistry of macromolecules". Wiley; New York, 1961.
- Terwilliger, T. C. e Eisenberg, D. (1982)."The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement". Journal of Biological Chemistry, v.257, n.11, p.6010-6015.
- Tjandra, N. e Bax, A. (1997)."Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium". Science, v.278, n.5340, p.1111-1114.
- Troll, W. e Cannan, R. K. (1953)."A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids". Journal of Biological Chemistry, v.200, n.2, p.803-811.
- Turnbull, W. B. e Daranas, A. H. (2003)."On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry?". Journal of the American Chemical Society, v.125, n.48, p.14859-14866.
- Ulmschneider, M. B. e Sansom, M. S. P. (2001)."Amino acid distributions in integral membrane protein structures". Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v.1512, n.1, p.1-14.
- Verly, R. M. Síntese e Estudos por Calorimetria e Ressonância Magnética Nuclear do Peptídeo Antimicrobiano Dermadistinctina K. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2006.
- Verly, R. M.; Moraes, C. M.; Resende, J. M.; Aisenbrey, C.; Bemquerer, M. P.; Piló-Veloso, D.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L. e Bechinger, B. (2009)."Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by Multidimensional Solution and Oriented ¹⁵N and ³¹P Solid-State NMR Spectroscopy". Biophysical Journal, v.96, n.6, p.2194-2203.
- Verly, R. M.; Rodrigues, M. A.; Daghanli, K. R. P.; Denadai, A. M. L.; Cuccovia, I. M.; Bloch, C.; Frézard, F.; Santoro, M. M.; Piló-Veloso, D. e Bemquerer, M. P. (2007)."Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes". Peptides, v.29, n.1, p.15-24.
- Vogt, T. C. B. e Bechinger, B. (1999)."The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH". Journal of Biological Chemistry, v.274, n.41, p.29115-29121.
- Vranken, W. e Rieping, W. (2009)."Relationship between chemical shift value and accessible surface area for all amino acid atoms". BioMed Central Structural Biology, v.9, n.1, p.20-30.
- Vriend, G. (1990)."WHAT IF: a molecular modeling and drug design program". Journal of Molecular Graphics, v.8, n.1, p.52-56.
- Waltho, J. P.; Feher, V. A.; Merutka, G.; Dyson, H. J. e Wright, P. E. (1993)."Peptide models of protein folding initiation sites. 1. Secondary structure formation by peptides

corresponding to the G-and H-helices of myoglobin". Biochemistry, v.32, n.25, p.6337-6347.

Wang, G.; Li, X. e Wang, Z. (2008)."APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design". Nucleic Acids Research, v.37, n.4, p.933-937.

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

Waterhous, D. V. e Johnson Jr, W. C. (1994)."Importance of environment in determining secondary structure in proteins". Biochemistry, v.33, n.8, p.2121-2128.

Wedemeyer, W. J.; Welker, E.; Narayan, M. e Scheraga, H. A. (2000)."Disulfide bonds and protein folding". Biochemistry, v.39, n.15, p.4207-4216.

Wenk, M. R. e Seelig, J. (1998)."Magainin 2 Amide Interaction with Lipid Membranes: Calorimetric Detection of Peptide Binding and Pore Formation†". Biochemistry, v.37, n.11, p.3909-3916.

Wider, G. e Wüthrich, K. (1999)."NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution". Current Opinion in Structural Biology, v.9, n.5, p.594-601.

Wieprecht, T.; Beyermann, M. e Seelig, J. (1999)."Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: thermodynamics and structure". Biochemistry (Washington), v.38, n.32, p.10377-10387.

Wieprecht, T. e Seelig, J. "Isothermal titration calorimetry for studying interactions between peptides and lipid membranes". Peptide-Lipid Interactions. Academic Press; Oxford, 2002.

Williamson, M. P.; Havel, T. F. e Wüthrich, K. (1985)."Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry". Journal of Molecular Biology, v.182, n.2, p.295-315.

Willker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R. e Bermel, W. (1993)."Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy". Magnetic Resonance in Chemistry, v.31, p.287-287.

Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F. e Lin, L. N. (1989)."Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter". Analytical Biochemistry, v.179, n.1, p.131-137.

Wishart, D. S.; Sykes, B. D. e Richards, F. M. (1992)."The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy". Biochemistry, v.31, n.6, p.1647-1651.

Wu, M. e Hancock, R. E. W. (1999). "Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane". Journal of Biological Chemistry, v.274, n.1, p.29-35.

Wüthrich, K. "NMR of proteins and nucleic acids". Wiley; New York, 1986.

Yan, L. e Adams, M. E. (1998). "Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*". Journal of Biological Chemistry, v.273, n.4, p.2059-2066.

Yasin, B.; Pang, M.; Turner, J. S.; Cho, Y.; Dinh, N. N.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I. e Wagar, E. A. (2000). "Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides". European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v.19, n.3, p.187-194.

Yau, W. M.; Wimley, W. C.; Gawrisch, K. e White, S. H. (1998). "The preference of tryptophan for membrane interfaces". Biochemistry, v.37, n.42, p.14713-14718.

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

Zasloff, M. (2002a). "Antimicrobial peptides in health and disease". The New England Journal of Medicine, v.347, n.15, p.1199-1210.

Zasloff, M. (2002b). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms". Nature, v.415, n.6870, p.389-395.

Zetasizer, N. S. Zetasizer nano series user manual. England: Malvern Instruments Ltd 2003.

Anexo

LISTA DOS TRABALHOS PUBLICADOS

1- Verly, R. M., M. A. Rodrigues, K. R. P. Daghasanli, A. M. L. Denadai, I. M. Cuccovia, C. Bloch, F. Frézard, M. M. Santoro, D. Piló-Veloso e M. P. Bemquerer (2007). "Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes". Peptides, v.29, n.1, p.15-24.

2- Verly, R. M., C. M. Moraes, J. M. Resende, C. Aisenbrey, M. P. Bemquerer, D. Piló-Veloso, A. P. Valente, F. C. L. Almeida e B. Bechinger (2009). "Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by Multidimensional Solution and Oriented ¹⁵N and ³¹P Solid-State NMR Spectroscopy". Biophysical Journal, v.96, n.6, p.2194-2203.

3- Santos, D. M., R. M. Verly, D. Piló-Veloso, M. De Maria, M. A. R. De Carvalho, P. S. Cisalpino, B. M. Soares, C. G. Diniz, L. M. Farias e D. F. F. Moreira (2009). "LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*". Amino Acids, p.1-10.

4- Resende, J. M., C. M. Moraes, V. H. O. Munhoz, C. Aisenbrey, R. M. Verly, P. Bertani, A. Cesar, D. Piló-Veloso e B. Bechinger (2009). "Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy". Proceedings of the National Academy of Sciences, v.106, n.39, p.16639.

5- Magalhães, B. S., J. A. T. Melo, J. Leite, L. P. Silva, M. V. Prates, F. Vinecky, E. A. Barbosa, R. M. Verly, A. Mehta e J. R. Nicoli (2008). "Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*". Biochemical and Biophysical Research Communications, v.377, n.4, p.1057-1061.

6- Resende, D. M., B. C. Caetano, M. S. Dutra, M. L. O. Penido, C. F. Abrantes, R. M. Verly, J. M. Resende, D. Piló-Veloso, S. A. Rezende e O. Bruna-Romero (2008). "Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: Correlation with IFN- and cytolytic activity by CD8+ T cells". Vaccine, v.26, n.35, p.4585-4593.