

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

Victor Hugo de Oliveira Munhoz

Análise Estrutural e Topológica de
Peptídeos Bioativos em Meios Biomiméticos
de Membranas

Belo Horizonte, 2012

UFMG/ICEx/DQ - 889^a
T. 387^a

VICTOR HUGO DE OLIVEIRA MUNHOZ

**Análise Estrutural e Topológica de Peptídeos Bioativos
em Meios Biomiméticos de membranas**

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

Belo Horizonte

2012

M963a Munhoz, Victor Hugo de Oliveira
2012 Análise estrutural e topológica de peptídeos
T bioativos em meios biomiméticos de membranas / Victor
Hugo de Oliveira Munhoz. 2012.
vii, 160 f. : il.

Orientadora: Dorila Piló Veloso.

Coorientador: Antônio Flávio de Carvalho Alcântara.

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

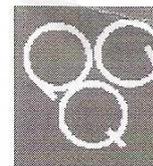
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Membranas (Biologia)
- Teses 3. Peptídeos bioativos - Teses 4. Ressonância
magnética nuclear - Teses I. Veloso, Dorila Piló,
Orientadora II. Alcântara, Antônio Flávio de Carvalho,
Coorientador. III. Título.

CDU 043



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

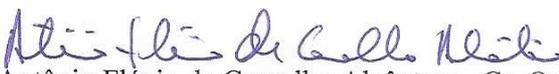


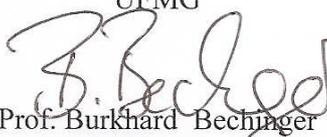
**"Análise Estrutural e Topológica de Peptídeos Bioativos em Meios
Biomiméticos de Membranas."**

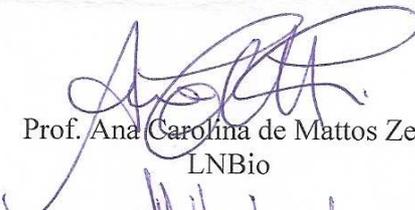
Victor Hugo de Oliveira Munhoz

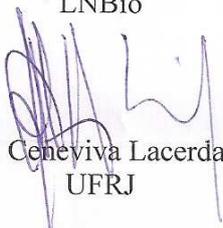
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

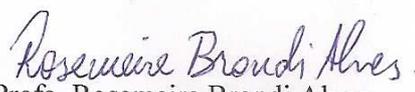

Prof. Dorila Pilo Veloso - Orientadora
UFMG

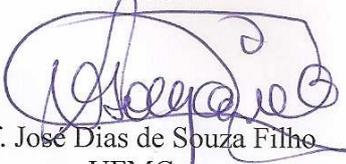

Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara - Co-Orientador
UFMG


Prof. Burkhard Bechinger
Université de Strasbourg


Prof. Ana Carolina de Mattos Zeri
LNBio


Prof. Fábio Ceneviva Lacerda Almeida
UFRJ


Prof. Rosemeire Brondi Alves
UFMG


Prof. José Dias de Souza Filho
UFMG

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2012.

Agradecimentos

Sou muito grato aos meus orientadores: professores Dorila Piló Veloso e Antônio Flávio de Carvalho Alcântara por me guiarem e me apoiarem desde os tempos de graduação, me ajudando a superar as dificuldades que eu porventura encontrava durante o caminho.

I am very thankful to Professor Burkhard Bechinger for accepting me in his lab during one year and for the advises and discussions during my work before, during and after my stay in Strasbourg and mostly guiding me into the Solid State NMR world.

Agradeço bastante ao professor Marcelo Porto Bemquerer pelas discussões científicas e sugestões valiosas dadas ao longo deste trabalho.

Agradeço ao professor Fábio Ceneviva Lacerda Almeida pelo enorme auxílio dado durante os experimentos de RMN presentes nesta tese e em outros trabalhos e pelas valiosas sugestões dadas.

Agradeço ao CNPq e CAPES pelas bolsas, e à UFMG e ao Departamento de Química.

Agradeço ao professor e amigo Jarbas Magalhães Resende por todo apoio, pelos ensinamentos em RMN e cálculos estruturais, sugestões e experiências compartilhadas ao longo de muitos anos.

Agradeço enormemente à Regina Adão pela imensa ajuda nos experimentos de ITC e pelas ótimas sugestões e palpites dados.

Sou bastante grato ao professor Rodrigo Moreira Verly por anos de amizade, apoio mútuo e por compartilharmos diversas histórias, como a viagem à Rússia, Portugal e por sempre se prontificar a me ajudar nos momentos mais desesperadores.

Agradeço bastante, também, a Mariana Torquato Quezado de Magalhães por sempre trocar idéias, experiências e diversos outros tópicos, sempre ensinando um pouco o mundo da bioquímica e me fazendo lembrar, que embora falemos línguas um pouco diferentes, cientificamente falando, nos referimos sempre à mesma coisa.

Agradeço ao professor Carlos Bloch, por me possibilitar o estudo dos peptídeos com os quais trabalho nessa tese.

Um grande obrigado ao Professor José Dias de Souza Filho, por me ajudar imensamente em minha formação acadêmica, me puxando cada vez mais para o mundo da Ressonância Magnética Nuclear, além das muitas experiências e histórias compartilhadas ao longo desses anos em congressos ao redor do Brasil e do mundo.

I am very grateful for Christopher Aisenbrey and Evgeniy Salnikov for the enormous help during my stay in Strasbourg, without which I wouldn't be able to perform a fraction of the experiments, and also for Jesus Raya, for patiently teaching me the know-hows of solid-state NMR and also for his high-quality tomatoes.

I am also very thankful to the ones I've worked in Strasbourg: Arnaud, for the help on CD experiments and NMR, Philippe Bertani for the aid on NMR experiments and discussion, I also thank to the lab mates Anna Itkin, Barbara Perrone, Élise Glattard, Omar Riffi, Matthias Michalek and Delphine Hatey for receiving me very well, for the friendship and also for helping me in the work and in many other matters!

Agradeço aos meus colegas de laboratório. Ao Samuel pela ajuda nas sínteses e purificações e ao Bruno, Naira e Danniell pela ajuda e pelas conversas nos tempos de folga, que me ajudaram bastante a manter a cabeça no lugar.

Agradeço aos meus amigos do Departamento de Química: Geone, Viviane, Tiago, Roberta, Laura e Giovanni pelas conversas, almoços e bons momentos no geral.

Agradeço aos meus grandes e velhos amigos e parceiros Caio, Daniel, Luiz "Max Steel", Bruno "Piruka", Alan Terra, Daniel Bowie, Jucas, Rodrigo e também à Márcia, Silvão, Nazareth e Marcos pelo apoio, conversas, noitadas, discussões, festas, pelo "Chicoteia, Jeová", que eu prometo escrever mais de dois textos por ano, pelas longas conversas musicais, e por tudo mais que não caberia em poucas páginas!

Agradeço aos novos e grandes amigos que tive o prazer de conhecer esse ano: aos amigos do Ram (Paim, Betto, Edu e Léo), por terem me trazido de volta à música, aos amigos do Espaço Fluxo (Ana, Phanho, Diego, Paulinha, Carou, Mari, Gabi, Camila, Amandita e Renato Negrão), pelo apoio, conversas, festas e tudo mais, à Fabíola, pelo apoio e por compreender meus sumiços pré-tese, às grandes amigas Miriam e Tita, pelas diversas conversas e saídas, á Ana Luiza, pelo grande suporte e preocupação, ao Marcus (por morar no centro da cidade e por me indicar vários ótimos livros), Valéria, Ana Queiróz e Luiz Ramos, pelas experiências musicais, de shows, saídas

Resumo

Este trabalho consiste no estudo de estrutura e interação com meios miméticos de membrana dos peptídeos antimicrobianos Distinctina, heterodímero composto de duas cadeias polipeptídicas (cadeia 1 e cadeia 2) ligadas covalentemente por meio de uma ligação de dissulfeto entre resíduos de cisteína, e isolada de secreções epiteliais de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta*, nativa da Mata Atlântica brasileira; Hilaseptina P2 (HSP2) e das fenilseptinas, constituídas pelo par de epímeros [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes), todas as três isoladas de glândulas epiteliais de anuros da espécie *Hypsiboas punctatus*, nativa da Floresta Amazônica. Todos esses peptídeos apresentam considerável atividade contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e, por isso, há interesse em se estudar o mecanismo pelo qual essas substâncias exercem essa atividade biológica. O modelo de mecanismo mais aceito para esse tipo de peptídeo, denominado modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Huang, 2000; Yang, 2000; Papo, 2005) leva em conta forte influência da estrutura dos peptídeos sobre suas atividades biológicas. Tendo isso em vista, surge a necessidade de se estudar as estruturas dessas biomoléculas para se elucidar o mecanismo de suas atividades antimicrobianas.

Os peptídeos em questão foram estudados a nível estrutural utilizando-se técnicas de Dicroísmo Circular (CD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução. Resultados mostraram que todos eles apresentam estruturas terciária ordenadas, ricas em α -hélice e de caráter altamente anfipático. O modelo estrutural do peptídeo distinctina, embora tenha apresentado ordenação considerável levando-se em conta cada cadeia monomérica separadamente, não apresenta orientação relativa entre as duas cadeias muito bem definida. Resultados de CD, no entanto, indicam forte estruturação α -helicoidal, tanto do heterodímero quanto de suas cadeias monoméricas individuais, apesar de sugerir que a interação peptídeo fosfolípídeo se dá por meio de um equilíbrio envolvendo mais de dois estados. Para a HSP2, resultados de CD em vesículas unilamelares e RMN em 2,2,2-trifluoetanol (TFE) mostraram alto conteúdo de α -hélice e os modelos obtidos a partir da RMN apresentam ainda alto grau de anfipaticidade. Estudos de RMN em DPC das fenilseptinas levaram a modelos também ricos em α -hélice, sendo que a D-Phes mostrou grau de estruturação ligeiramente maior que a L-Phes.

Os experimentos de RMN em fase sólida foram realizados para a HSP2 e as fenilseptinas, com amostras mecanicamente orientadas contendo bicamadas do fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) e os respectivos peptídeos seletivamente marcados com ^{15}N e ^2H . A partir da medição de propriedades anisotrópicas como deslocamento químico de ^{15}N e desdobramento quadrupolar de ^2H , foi possível determinar as possíveis orientações das estruturas calculadas com base nos dados de RMN em solução e inferir a respeito da maneira pela qual a interação peptídeo-membrana ocorre. Para a HSP2, a análise conjunta dos resultados de RMN em solução e em fase sólida mostrou que o peptídeo interage fortemente com a bicamada, de forma que sua face hidrofóbica está em contato direto com o interior alifático da estrutura fosfolipídica e orientado quase totalmente paralelo à superfície da bicamada. Os epímeros L-Phes e D-Phes, embora tenham estruturas terciárias próximas, mostraram orientações bastante diferentes entre si, evidenciando que os peptídeos interagem com membrana de formas distintas.

Uma outra parte do trabalho diz respeito aos estudos termodinâmicos da interação peptídeo-lipossoma da HSP2 por meio da técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Esses estudos mostraram que a interação em questão é fortemente dependente da concentração do peptídeo no meio e que, apesar de possuir um caráter mais eletrostático em um momento inicial, que envolve a aproximação do peptídeo com a membrana, ela é mantida principalmente por interações do tipo hidrofóbicas entre os resíduos de cadeia lateral apolares e o interior alifático da bicamada fosfolipídicas. A análise conjunta de todos os resultados obtidos por diferentes metodologias permitiu construir um modelo mais detalhado para a interação entre o peptídeo e a membrana bacteriana.

Abstract

This work consists of studies on the structure and interactions with membrane-mimetic media of the antimicrobial peptides distinctin, an heterodimer composed of two peptide chains (chain 1 and chain 2) covalently bonded through a disulfide bond and isolated from the skin of *Phyllomedusa distincta* anurans, native from the Brazilian Atlantic Forest; Hylaseptin P2 (HSP2) and the phenylseptins [L-Phe²]-Phenylseptin (L-Phes) and [D-Phe²]-Phenylseptin (D-Phes), all three isolated from *Hypsiboas punctatus* anurans, found on the Amazon tropical forest. All these peptides show considerable activity against both *Gram*-positive and *Gram*-negative bacteria, reason why there is growing interest in better understanding the mechanistic pathway these molecules follow on exerting their biological activities. The most widely accepted model for such mechanism is the Shai-Matsuzaki-Huang model (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Huang, 2000; Yang, 2000; Papo, 2005), which takes into account a strong influence of the peptides' structures on their biological activities. Hence the need to study these peptides on a structural level in order to propose a consistent model.

The aforementioned peptides had their structures studied and determined by means of Circular Dichroism (CD) and solution Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The results showed that all peptides presented well-ordered tertiary structures, all of them also quite rich on α -helical secondary structure and with a sharp amphipathic character. Distinctin's structural model, albeit showing considerable ordering when taking into account each monomeric chain separately, did not present a very well-defined overall orientation of one chain in relation to the other. The CD results, however, indicated stark α -helical structuration for both the chains as well as for the heterodimer, although it suggests that the interaction between the peptide and the phospholipid is better described as an equilibrium with more than two states. For the HSP2, the results of the CD experiments on small unilamellar vesicles and the NMR experiments in 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) showed a high content of α -helix and the models derived from the NMR data also showed a sheer amphipathic character. For the phenylseptins, the NMR experiments in DPC also led to α -helix-rich structures, being that D-Phes showed a slightly higher structuration degree than L-Phes.

The solid-state NMR experiments were performed for HSP2 and the two phenylseptins, with mechanically-oriented samples containing 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC)

bilayers and the peptides selectively-labeled with ^{15}N and ^2H . From the measurements of anisotropic properties such as ^{15}N chemical shifts, and ^2H quadrupolar splitting, it was possible to calculate the possible orientations for the structure determined from the solution NMR data. For HSP2, the concomitant analysis of both solid-state and solution NMR results showed that the peptide interacts strongly with the bilayer, in way such that its hydrophobic side is in direct contact with the phospholipids' aliphatic chains and in a *quasi*-parallel orientation in relation to the bilayer's surface. The epimers L-Phes and D-Phes, albeit showing very similar tertiary structures, their calculated orientations are significantly different, which suggests that these peptides interact with the bilayer in distinct manners when comparing one to the other.

Another part of this work comprises the study of the HSP2 peptide-lyposome interaction's thermodynamics through Isothermal Titration Calorimetry (ITC). These studies showed that the interaction in question is strongly dependent on the concentration of the peptide on the media and that, in spite of having a sharp electrostatic character at an initial moment which consist on the approximation of the peptide to the membrane, it is mostly maintained by hydrophobic interactions between the non-polar sidechains and the membrane's hydrophobic core. The analysis of these results together with the NMR ones, allowed us to build a more complete and detailed model for the interaction between the peptide and the bacterial membrane.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	1
Tabela de Aminoácidos.....	3
Apresentação.....	4
1.Introdução.....	5
1.1. Estrutura peptídica.....	5
1.2. Peptídeos Antimicrobianos.....	10
1.2.1. Relação estrutura-atividade de peptídeos antimicrobianos.....	14
1.3. Síntese em fase sólida de peptídeos pela estratégia Fmoc.....	15
1.4. Características angulares de estruturas de proteínas e peptídeos.....	18
1.5. Determinação de estruturas de proteínas e peptídeos.....	21
1.5.1. Dicroísmo Circular.....	21
1.5.2. Ressonância Magnética Nuclear em solução.....	22
1.5.3. Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido.....	40
1.5.4 Caracterização termodinâmica do processo de interação peptídeo/membrana por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	43
2. Materiais e Métodos.....	45
2.1. Materiais.....	45
2.2 Métodos.....	47
2.2.1. Procedimento Geral.....	47
2.2.2. Síntese das fenilseptinas e da Hilaseptina P2.....	51
2.2.3. Reação de Formação da Distinctina.....	52
2.2.4. Preparação de Vesículas para Experimentos de Dicroísmo Circular (CD).....	53

2.2.5. Experimentos de Dicroísmo Circular	53
2.2.6. Processamento e Análise de Experimentos de RMN em Solução.....	54
2.2.7. Preparação das amostras para RMN no estado sólido.....	55
2.2.8. Experimentos de RMN no estado sólido	56
2.2.9. Simulação de parâmetros da RMN em fase sólida e determinação da orientação dos peptídeos em bicamadas lipídicas.....	57
2.2.10 Preparação de Lipossomas para Experimentos de Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC).....	58
2.2.11. Calorimetria de Titulação Isotérmica	60
3. Resultados e Discussão.....	63
3.1. Síntese em Fase Sólida dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes	63
3.1.1. Síntese da Distinctina	63
3.1.2. Síntese e Purificação da Hilaseptina P2 (HSP2).....	69
3.1.3. Síntese da [L-Phe ²]-Fenilseptina (L-Phes).....	73
3.2. Estudos por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes	75
3.2.1. Estudos por CD da Distinctina	75
3.2.2. Estudos por CD da Hilaseptina P2 (HSP2).....	79
3.3. Determinações Estruturais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em Solução dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes.....	80
3.3.1. Determinação Estrutural da Distinctina por RMN em Solução.....	81
3.3.2. Determinação Estrutural da Hilasptina P2 (HSP2).....	101
3.3.3. Determinação Estrutural da [L-Phe ²]-Fenilseptina (L-Phes) e da [D-Phe ²]-Fenilseptina (D-Phes) por RMN em Solução.....	109

3.3.4. Cálculo e Validação Estrutural a partir dos Dados de RMN em Solução	116
3.3.5. Estudos Topológicos da Interação Peptídeo-Bicamada Fosfolípida por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em Fase Sólida	124
3.4. Caracterização Termodinâmica do Processo de Interação Peptídeo/Membrana por Calorimetria de Titulação Isotérmica	134
3.4.1 Determinação da entalpia de interação peptídeo-membrana	134
4. Conclusão	144
4.1. Distíntina e Cadeias 1 e 2	144
4.2. Hilseptina P2 (HSP2).....	146
4.3. [L-Phe ²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe ²]-Fenilseptina (D-Phes)	147
4.4. Considerações Finais	148
5. Referências Bibliográficas.....	150

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ACN	Acetonitrila
APD	Banco de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
CD	Dicroísmo Circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação, do inglês <i>Correlation Spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
D-Phe	[D- ² Phe]-Fenilseptina
DPC	dodecilfosfocolina, do inglês <i>dodecylphosphocholine</i>
DQF-COSY	espectroscopia de correlação com filtro de duplo quantum, do inglês <i>Double-Quantum Filtered COSY</i>
DSS	4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato de sódio
E. COSY	COSY editado
EM	Espectrometria de massas
FID	decaimento livre da indução, do inglês <i>Free Induction Decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
HOBt	1 - hidroxibenzotriazol
HSP2	Hilaseptina P2
HSQC	coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence</i>
ITC	calorimetria de titulação isotérmica do inglês <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
<i>K_p</i>	Coefficiente de partição
L-Phe	[L- ² Phe]-Fenilseptina
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>
MLVs	Vesículas multilamelares do inglês <i>Multi Lamellar Vesicles</i>
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear

PDB	Overhauser, do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> banco de dados de proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
P:L	Razão peptídeo:lipídeos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
Q_{dil}	calor de diluição relativa à interação peptídeo-lipídeo
Q_{inj}	calor total relativo à interação peptídeo-lipídeo
Q_{int}	quantidade de calor relativa à interação peptídeo-lipídeo
QUEEN	validação quantitativa de restrições experimentais de RMN, do inglês <i>Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints</i>
RDC	acoplamentos dipolares residuais, do inglês <i>Residual Dipolar Coupling</i>
RMSD	raiz quadrada dos desvios médios quadrados, do inglês <i>Root Mean Square Deviation</i> ,
SA	arrefecimento simulado do inglês <i>simulated annealing</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SUVs	vesículas unilamelares pequenas, do inglês <i>Small Unimolecular Vesicles</i>
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
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>
tr	tempo de retenção
Tris	tris-hidroxiaminometilmetano

Tabela 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

Apresentação

Esta tese teve como objetivo estudar a estrutura e a interação com meios miméticos de membrana de quatro peptídeos antimicrobianos: Distinctina, heterodímero composto de duas cadeias polipeptídicas (Cadeia 1 e Cadeia 2) ligadas covalentemente por meio de uma ligação de dissulfeto entre resíduos de cisteína; Hilaseptina P2 (HSP2) e das fenilseptinas, constituídas pelo par de epímeros [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes). Todos esses peptídeos apresentam considerável atividade contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e, por isso, há interesse em se estudar o mecanismo pelo qual exercem essa atividade biológica. O modelo de mecanismo mais aceito para esse tipo de peptídeo, denominado modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Huang, 2000; Yang, 2000; Papo, 2005) leva em conta forte influência da estrutura dos peptídeos sobre suas atividades biológicas. Tendo isso em vista, surge a necessidade de se estudar as estruturas dessas biomoléculas para se elucidar o mecanismo de suas atividades antimicrobianas.

Este trabalho consta da Introdução, que apresenta uma breve explanação dos fundamentos teóricos das diversas técnicas utilizadas, constituindo o Capítulo 1; da Parte Experimental, que é relatada no Capítulo 2; de um terceiro capítulo, abrangendo Resultados e Discussão, de uma Conclusão e, por fim, das Referências Bibliográficas.

1.Introdução

1.1. Estrutura peptídica

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos (Quadro 1.1, p. 6) ligados covalentemente, através de ligações peptídicas entre um grupo carboxila de um aminoácido e um grupo amino de outro por meio de uma reação de condensação. Como resultado dessa reação, a cadeia peptídica possui duas terminações diferentes: uma extremidade amino (grupamento alfa-amino), denominada de extremidade *N*-terminal e uma extremidade carboxi (grupamento alfa-carboxila), também denominada extremidade de *C*-terminal. Por convenção, a extremidade *N*-terminal é considerada como o início de uma cadeia peptídica e a extremidade *C*-terminal, o seu final. Uma cadeia peptídica é constituída por um conjunto formado pela repetição regular dos quatro átomos que compõem a ligação peptídica (C, O, N, H) por toda a sua extensão, que é denominado cadeia principal, e de uma parte variável, dependente do resíduo de aminoácido presente, que corresponde às distintas cadeias laterais, representadas como *R* na Figura 1.1 (Nelson & Cox, 2002).

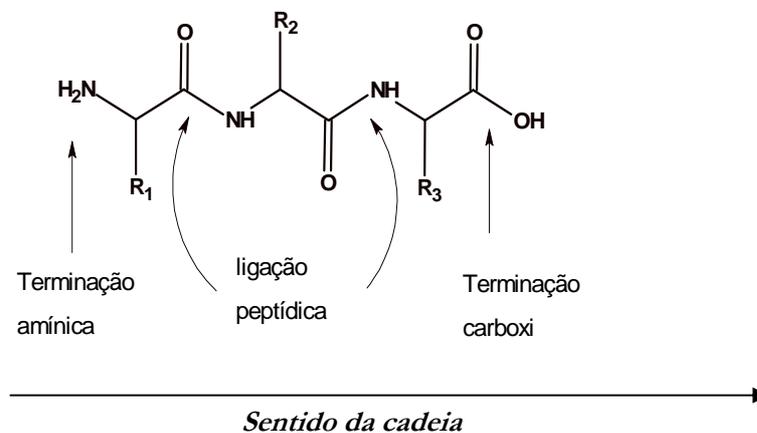
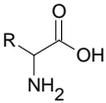
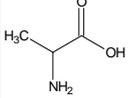
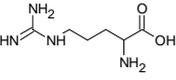
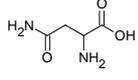
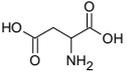
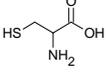
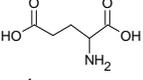
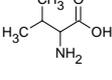
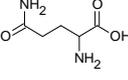
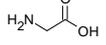
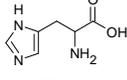
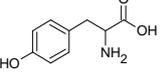
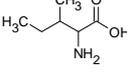
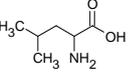
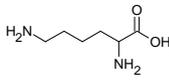
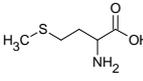
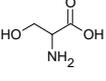
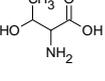
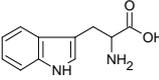
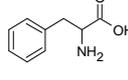


Figura 1.1. Representação esquemática de uma sequência peptídica de um tripeptídeo, com as cadeias laterais representadas como *R*.

 <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

Quadro 1.1. Estrutura e nomenclaturas dos aminoácidos comumente encontrados em proteínas e peptídeos.

Os peptídeos são classificados de acordo com quatro níveis estruturais: estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. Denomina-se estrutura primária apenas a sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo, em geral representada do grupo *N*-terminal para o *C*-terminal (Berg *et al.*, 2006).

A estrutura secundária indica conformação local de alguma porção de um polipeptídeo., constituindo formas ou padrões mais recorrentes, sendo que os mais importantes são a α -hélice e a folha- β . A adoção dessas diferentes formas ocorre devido à variação dos ângulos diedros φ e ψ (Figura 1.2, p. 7) que, por sua vez, é bastante influenciada tanto pelo meio em que se encontra a proteína quanto pela sua estrutura primária.

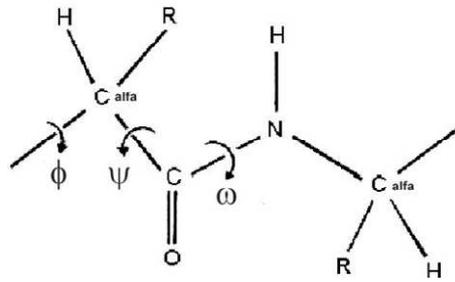


Figura 1.2. Representação dos ângulos de torção dos resíduos de aminoácido.

A estrutura α -hélice (Figura 1.3) é formada por ligações hidrogênio, através da interação intramolecular entre o oxigênio da carbonila e o hidrogênio do grupo amino das ligações peptídicas. A ligação de hidrogênio proporciona uma hélice em torno de um eixo imaginário, tendo entre cada volta da hélice, uma distância de cerca de 5,4 Å, ou, aproximadamente, 3,6 resíduos de aminoácidos (Berg *et al.*, 2006).

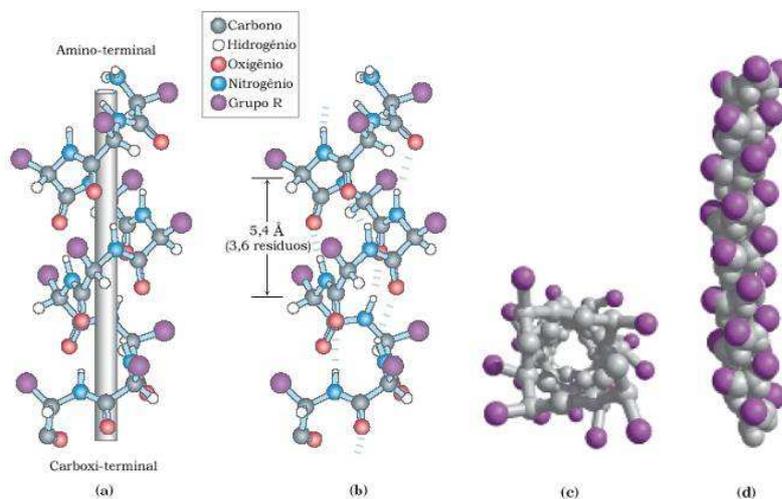


Figura 1.3. Quatro modelos de α -hélice, mostrando diferentes aspectos de sua estrutura. **(a)** formação de α -hélice em torno de um eixo; **(b)** modelo bola e vareta, explicitando as ligações hidrogênio intracadeias; **(c)** α -hélice vista de uma de suas terminações, olhando-se para baixo através do eixo longitudinal; **(d)** visão lateral da α -hélice pelo modelo espaço preenchido (Nelson & Cox, 2002, p. 127).

A existência de forma helicoidal em proteínas depende das cadeias laterais, desempenhando um papel importante na estabilização ou desestabilização da α -hélice. Resíduos de aminoácidos com cadeias laterais com a mesma carga (positiva ou negativa) que estejam

muito próximos entre si podem desestabilizar a forma devido a interações repulsivas. Resíduos de prolina e glicina apresentam normalmente impedimento para a ocorrência de formas helicoidais. No caso do resíduo de prolina, o átomo de nitrogênio faz parte de um anel rígido, impedindo a rotação em torno da ligação $N - C_{\alpha}$ e, conseqüentemente, a ocorrência de forma helicoidal. Além disso, a ausência de hidrogênio ligado ao nitrogênio do resíduo de prolina não proporciona estabilização de formas helicoidais por ligações hidrogênio. No caso da glicina, a flexibilidade conformacional desfavorece a forma helicoidal, proporcionando frequentemente a ocorrência de formas globulares ou, simplesmente, a ausência de uma forma preferencial em seqüências polipeptídicas que a contenham (Nelson & Cox, 2002).

A ocorrência de forma helicoidal pode ser influenciada também pelos dipolos oriundos das carbonilas. Assim, dipolos elétricos presentes nas ligações peptídicas e nas cadeias laterais resultam em interações eletrostáticas com as extremidades da cadeia polipeptídicas, desestruturando formas helicoidais (Nelson & Cox, 2002).

Na estrutura secundária do tipo folha- β , as cadeias polipeptídicas apresentam uma disposição em zigue-zague. Essas cadeias podem ser dispostas lado-a-lado, formando estruturas que se assemelham a folhas. Nesse caso, as ligações de hidrogênio são formadas entre resíduos das cadeias polipeptídicas adjacentes. As ligações hidrogênio ocorrem entre resíduos distantes entre si na cadeia, podendo ocorrer também entre cadeias diferentes. O emparelhamento de resíduos resultante desse tipo de interações pode resultar em dois padrões diferentes de disposição das fitas- β : a forma antiparalela e a forma paralela, ambas mostradas na Figura 1.4 (p. 9). Na forma antiparalela, as fitas- β encontram-se em sentidos contrários, enquanto que, na paralela, essas cadeias peptídicas encontram-se dispostas de forma alinhada quanto ao sentido (*i.e.* N para C). Esse tipo de estrutura secundária, no entanto, não costuma ser muito comum em peptídeos constituídos por poucos resíduos de aminoácido, sendo mais recorrentes em proteínas de altas massas moleculares (Nelson & Cox, 2002).

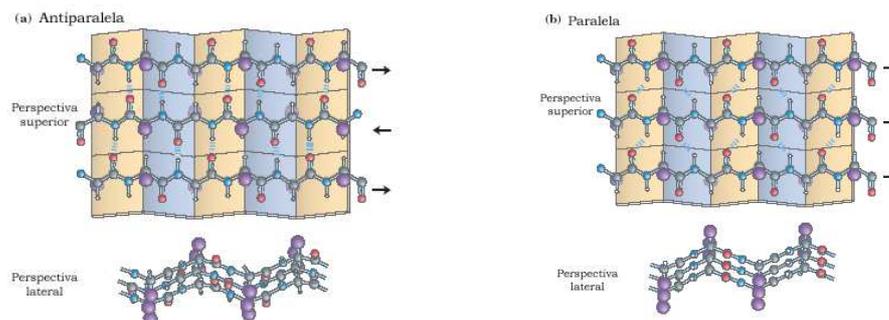


Figura 1.4. Estruturas β de cadeias polipeptídicas, mostrando em (a) a conformação β -antiparalela, em que os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio do esqueleto peptídico não se encontram alinhados (como pode ser visto pela perspectiva lateral) e em (b) a conformação β paralela. (Nelson & Cox, 2002, p. 129).

Outro padrão de estrutura secundária é denominado de dobra β (Figura 1.5), sendo um elemento de conexão entre fragmentos de resíduos apresentando conformações β -antiparalelas. A estrutura apresenta um dobramento de 180° , envolvendo geralmente quatro resíduos de aminoácido. O oxigênio da carbonila entre o primeiro e o segundo resíduo forma uma ligação hidrogênio com o hidrogênio do grupo amino localizado a três ou quatro resíduos de distância. Os demais grupos presentes na sequência não participam da formação dessa estrutura secundária (Figura 1.5a). Outro tipo de dobra pode ser formado também pela adoção da conformação *cis* de resíduos de prolina, conforme mostrado na Figura 1.5b (Nelson e Cox, 2002).

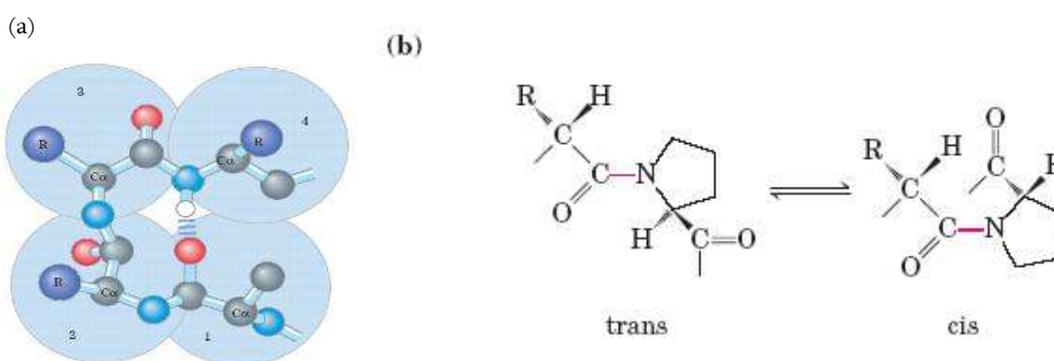


Figura 1.5. (a) Estrutura geral de uma dobra β , indicando os quatro resíduos de aminoácidos (representados envoltos nos círculos azuis) que a constituem. (b) formas em que os resíduos de prolina podem se encontrar (*cis e trans*). (Nelson e Cox, 2002, p. 130).

Denomina-se de estrutura terciária ao arranjo tridimensional de todos os átomos em uma proteína. A estrutura terciária indica o arranjo espacial relativo entre os motivos estruturais definidos como estruturas secundárias, bem como o arranjo tridimensional de regiões entre tais motivos.

Peptídeos contendo duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas entre si adotam arranjos com subunidades em complexos tridimensionais. Esse nível mais elevado de organização é denominado estrutura quaternária (Nelson & Cox, 2002).

1.2. Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos são componentes de sistemas de imunodefesa inatos a diversos organismos multicelulares. Sua ampla distribuição em diversas espécies, tanto do reino animal quanto do reino vegetal sugere o importante papel que essas substâncias têm na evolução de organismos multicelulares complexos. Apesar de estarem presentes nesses organismos há muitas eras, essas substâncias têm mantido eficientemente seus papéis imuno-defensivos.

Existe uma diversidade enorme de peptídeos antimicrobianos. O banco de dados de peptídeos antimicrobianos (APD – *Antimicrobial Peptide Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) registra atualmente 1518 peptídeos, sendo que 98 apresentam propriedades antivirais, 442 propriedades antifúngicas, 1168 antibacterianas e 98 mostram atividade anticâncer. Os peptídeos antimicrobianos podem se diversificar principalmente pela composição e estrutura. Tais características refletem a adaptação das espécies ao microambiente em que vivem. Uma classe importante destas substâncias é os peptídeos anfipáticos lineares ou diméricos encontrados em muitas espécies, inclusive plantas, anfíbios, insetos ou humanos (Bevins & Zasloff, 1990).

Os anfíbios apresentam uma enorme diversidade desses peptídeos (Csordas & Michl, 1970; Hoffmann *et al.*, 1983). Na pele de anuros encontram-se muitos peptídeos biologicamente ativos, sendo os peptídeos antimicrobianos considerados como os mais avançados participantes do sistema imunológico desses animais (Boman, 1995; Zasloff, 2002). Em 1999, foi descrito o isolamento de diversos peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anuros da espécie *Phyllomedusa distincta* (Batista *et al.*, 1999), dentre eles a distinctina (Batista *et al.*, 2001), peptídeo heterodimérico, com ambas as cadeias amidadas na extremidade C-terminal, cuja estrutura primária encontra-se representada na Figura 1.6 (p. 11).



Figura 1.6. Sequência peptídica da distinctina, com a representação da ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína.

Considerando os resultados de testes de atividade biológica, verificou-se que a distinctina possui atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactéria, *Gram*-positivas ou *Gram*-negativas (Batista *et al.*, 2001). Além disso, vários outros estudos foram feitos, como dicroísmo circular (CD) e espectroscopia na região do infravermelho (IV), que indicaram grande presença de estruturas secundárias do tipo folha- β , além da ocorrência em menor escala da estrutura secundária α -hélice (Batista *et al.*, 2001). O estudo por ressonância magnética nuclear (RMN) em meio aquoso forneceu estruturas tridimensionais do peptídeo, indicando a predominância de estruturas α -hélice nas cadeias, porém com uma interação entre as moléculas da distinctina, duas a duas, sugerindo a presença do peptídeo na forma tetramérica (Raimondo *et al.*, 2005), conforme mostrado na Figura 1.7.

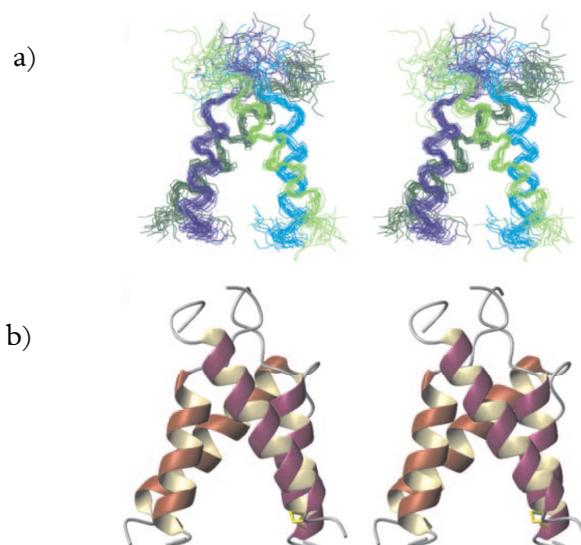


Figura 1.7. Estruturas obtidas por RMN do heterodímero distinctina em água. Em **(a)** é representado o conjunto de estruturas sobrepostas, visualizando-se somente a cadeia principal das estruturas, com a formação do tetrâmero envolvendo duas moléculas da distinctina. A Cadeia 1 está representada em azul-escuro e verde escuro, e a Cadeia 2, em ciano e verde-claro, de acordo com a subunidade de distinctina em que se encontram. Em **(b)** é mostrada a estrutura tetramérica mais representativa, com a Cadeia 1 em roxo e a Cadeia 2 em vermelho (Raimondo *et al.*, 2005).

Recentemente, parte do mecanismo de interação com membranas fosfolipídicas foi elucidada por meio de estudos de RMN em estado sólido, onde pôde-se identificar uma conformação distinta da obtida por RMN em solução (Resende *et al.*, 2009). Esse estudo indica que a distinctina altera significativamente sua conformação quando interage com a bicamada fosfolipídica, interagindo em sua forma monomérica (diferentemente da forma tetramérica descrita em ambiente aquoso), com as cadeias orientadas paralelamente uma em relação à outra, de forma que as N-terminações encontram-se em posições opostas entre si conforme mostrado na Figura 1.8.

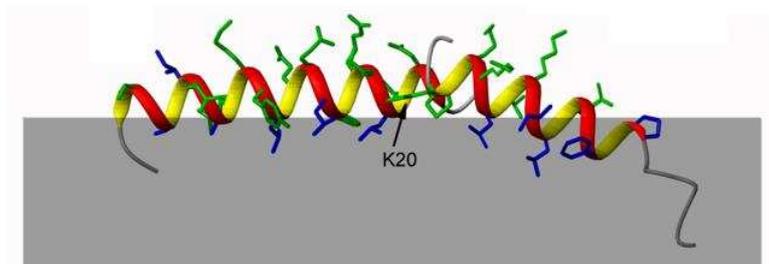


Figura 1.8. Representação do peptídeo distinctina (cadeias laterais polares em verde e apolares em azul) interagindo com bicamada lipídica (representada em cinza) (Resende *et al.*, 2009).

Outra classe de peptídeos antimicrobianos isolados de pele de anuros é a das fenilseptinas. Esses peptídeos foram isolados de anuros da espécie *Hypsiboas punctatus*, nativas da Floresta Amazônica. Dois peptídeos compõem essa recém-descoberta classe: [L-²Phe]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-²Phe]-Fenilseptina (D-Phes). Esses dois peptídeos, também amidados na extremidade C-terminal e cujas estruturas primárias estão representadas na Tabela 1.1, constituem um par de epímeros, e diferenciam-se pela configuração do segundo resíduo de fenilalanina (F2, ou ²Phe, conforme a nomenclatura utilizada para esses peptídeos). Na L-Phes, encontra-se presente o estereoisômero L da fenilalanina e na D-Phes, o estereoisômero D. A característica que define esta nova classe de peptídeos é o alto conteúdo de resíduos de fenilalanina, presente na extremidade N-terminal, constituindo um motivo estrutural conservado cuja sequência é Phe-Phe-Phe. Ambos os peptídeos são encontrados na secreção epitelial dessa espécie de anuro.

Tabela 1.1. Sequência de aminoácidos dos peptídeos L-Phes e D-Phes, com as numerações dos resíduos de aminoácido seguindo a ordem convencional da extremidade N-terminal à C-terminal, com a amidação desta última representada pelo grupo –NH₂ à direita da representação do último resíduo

Peptídeo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L-Phes	F	(L-)F	F	D	T	L	K	N	L	A	G	K	V	I	G	A	L	T-NH ₂
D-Phes	F	(D-)F	F	D	T	L	K	N	L	A	G	K	V	I	G	A	L	T-NH ₂

O isolamento desses peptídeos está descrito em (de Magalhães *et al.*, 2012) e foram estudadas, também, no mesmo trabalho, as propriedades gustativas, bem como as atividades antimicrobianas dessas substâncias. Em relação às propriedades gustativas, muitos dos peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anuros apresentam o sabor amargo quando experimentado por humanos e este sabor é normalmente associado com resíduos de cadeias laterais hidrofóbicas, em especial resíduos de fenilalanina (Ishibashi, 1988; Kim, 2006; Maehashi, 2009). Além da influência do caráter hidrofóbico dos resíduos de aminoácido, foi observado que a localização desses resíduos na cadeia polipeptídica também é determinante para o sabor amargo (Lelj, 1980; Otagiri, 1985). Essa propriedade gustativa evidencia o possível papel dessas substâncias no mecanismo de defesa contra certos predadores, uma vez que o sabor amargo propiciado por esses peptídeos tornaria o sabor de indivíduos dessa espécie repulsivo para certos predadores. Dessa maneira, o papel biológico desses peptídeos não seria apenas relativo à defesa desses animais contra agentes patogênicos, mas contra potenciais predadores.

De fato, tais propriedades aversivas devido ao sabor amargo foram observadas para ambos os peptídeos quando testados em camundongos geneticamente modificados que não possuem o canal não-seletivo *Trpm5*, que teria papel importante na percepção do amargor em mamíferos (Rossler, 1998; Perez, 2002) e comparando os resultados com os observados em camundongos que possuem tal canal. Apesar da diferença estrutural no motivo que teria influência sobre o sabor amargo (Phe-Phe-Phe), não foram observadas diferenças entre o potencial aversivo das duas substâncias (de Magalhães *et al.*, 2012).

Por outro lado, os resultados de atividade antimicrobiana mostraram considerável diferença entre os dois epímeros. D-Phes apresentou atividade duas vezes maior contra bactérias *S. aureus* (concentração inibitória mínima (CIM) de 32,5 μM para D-Phes e de 65,5 μM para a L-Phes) e oito vezes maior para *X. axonopodis* que a L-Phes (de Magalhães *et al.*, 2012). Esses resultados indicam que a diferença na configuração do carbono alfa do resíduo de F2 tem considerável eficácia nas atividades bactericidas das fenilseptinas, uma vez que se percebe forte influência da estruturação de peptídeos antimicrobianos em geral no momento da interação com os agentes patogênicos sobre suas respectivas atividades biológicas, conforme será discutido no item 1.2.1 (p. 14).

Também isolado de anuros da espécie *Hypsiboas punctatus*, o peptídeo Hilaseptina P2 (HSP2, cuja sequência é mostrada na Tabela 1.2, p. 14) apresenta considerável atividade

antimicrobiana contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas (Bloch Jr., 2011). Trata-se de um peptídeo ainda inédito na literatura, que apresenta grande homologia em sua estrutura primária, com outros peptídeos encontrados na pele de anuros como a Dermadistinctina K (Verly *et al.*, 2009) e as próprias fenilseptinas. Além disso, a representação da sua molécula na projeção de Edmundson (Figura 1.9) mostra que este peptídeo, na forma α -helicoidal, apresenta estrutura altamente anfipática, sendo, portanto, coerente com as propriedades normalmente observadas em peptídeos antimicrobianos de peles de anuros.

Tabela 1.2. Sequência de aminoácidos dos peptídeos HSP2, com a numeração dos resíduos de aminoácido seguindo a ordem convencional da extremidade *N*-terminal à *C*-terminal, com a amidação desta última representada pelo grupo $-NH_2$ à direita da representação do último resíduo

Peptídeo	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
HSP-2	G	I	G	D	I	L	K	N	L	A	K	A	A	G	K	A	A	L	H	A	V	G	E	S	L-NH ₂

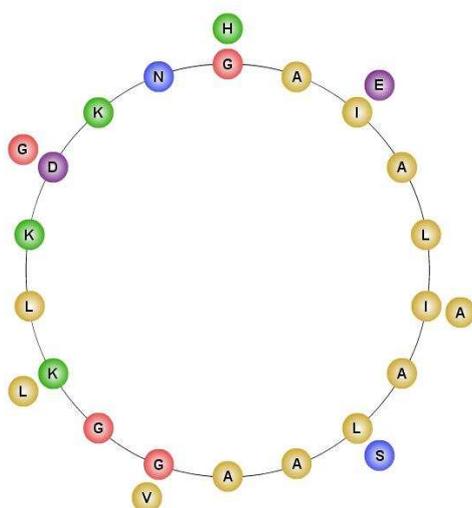


Figura 1.9. Representação do peptídeo HSP2 na projeção de Edmundson, com os resíduos apolares em amarelo, os positivamente carregados em verde, os negativamente carregados em roxo, os polares não-carregados em azul e os resíduos de glicina em rosa.

1.2.1. Relação estrutura-atividade de peptídeos antimicrobianos.

O motivo de se estudarem as preferências conformacionais de peptídeos reside no fato de a estrutura daqueles que são antimicrobianos estar intrinsecamente relacionada ao seu mecanismo de ação. Vários estudos dessa nova classe de substâncias biologicamente ativas mostraram que muitos desses peptídeos exercem sua atividade por meio de permeabilização de

membranas bacterianas (Bechinger, 1999; Vogt *et al.*, 1999). Grande parte desses peptídeos adota preferencialmente formas α -helicoidais em meios que mimetizam membranas (Wright, 1989; Wüthrich, 1989; Clore & Gronenborn, 1991). Acredita-se que a permeabilização da membrana é facilitada pela adoção dessa estrutura secundária (Westerhoff *et al.*, 1989).

O modelo de mecanismo que explica a atividade da maior parte dos peptídeos antimicrobianos é o modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000) que propõe a interação do peptídeo com a membrana, seguida por deslocização de lipídeos, alteração da estrutura da membrana e, em alguns casos, a entrada do peptídeo no interior da célula. Entretanto, não se sabe de forma detalhada o mecanismo, especialmente como se dá a interação entre peptídeo e membrana. Para explicar essa etapa, surgiram várias hipóteses, incluindo despolarização da membrana (Westerhoff, Juretic *et al.*, 1989), formação de poros (Bierbraum & Sahl, 1985; Yang, Weiss *et al.*, 2000), ativação de processos como a indução de hidrolases que degradam a parede celular (Bierbraum & Sahl, 1985), desordenamento da estrutura da bicamada lipídica (Matsuzaki, 1999) e destruição da célula por interiorização do peptídeo (Kragol *et al.*, 2001).

Tendo em vista a necessidade de se elucidar, de forma completa, os mecanismos de ação desses peptídeos, é necessária a determinação de suas estruturas tridimensionais em condições que mimetizem meios fisiológicos.

1.3. Síntese em fase sólida de peptídeos pela estratégia Fmoc.

A síntese em fase sólida baseia-se na construção de uma cadeia peptídica, resíduo a resíduo, sobre um suporte sólido insolúvel. Esse método tem algumas vantagens claras: possibilita separar as cadeias peptídicas intermediárias somente pela retirada de solventes ou por filtração e utiliza um menor volume de solventes, em comparação com as sínteses em solução. Esse método consiste em acoplamentos de aminoácidos, lavagens da resina e desproteções dos grupos *N*-terminais sucessivos, sendo possível automatizar todo o procedimento. Pelo fato de sempre se utilizar reagentes em excesso, os rendimentos dessa modalidade de síntese são, em geral, consideravelmente altos. Contudo, existem algumas desvantagens, tais como a perda sucessiva de rendimento quando um determinado acoplamento for incompleto e o acúmulo de impurezas na resina, que pode ocasionar reações secundárias com o produto, e especialmente a formação de produtos com deleção de resíduos de aminoácidos (Chan & White, 2000).

Em geral, para se certificar do sucesso das reações, utilizam-se testes qualitativos simples e de fácil execução de forma a poderem ser utilizados a cada acoplamento ou desproteção. O teste mais utilizado para esse fim é o Teste de Kaiser (Troll & Cannan, 1953), que identifica aminas primárias na estrutura por meio de uma variação da coloração da resina.

Toda síntese em fase sólida, independentemente da estratégia empregada, tem o mesmo fundamento. Primeiramente, todas as resinas empregadas têm uma base polimérica insolúvel e ligada a ela, vários grupos reativos, denominados ligantes, que irão reagir com os aminoácidos e prendê-los ao suporte insolúvel. Todos os aminoácidos utilizados têm seus grupos reativos (amino ou carboxila e alguns grupos de cadeias laterais) protegidos para não ocorrerem muitas reações secundárias. Os grupos protetores da extremidade responsável pelo acoplamento (extremidade amino ou carboxi) devem ser lábeis em um meio que não cause a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, de forma que estes últimos devem permanecer ligados aos resíduos de aminoácidos até o final da síntese, sendo denominados protetores permanentes. Cada derivado de aminoácido da sequência é adicionado à cadeia pelo grupo não protegido, sendo que, ao final do acoplamento, tem-se a outra extremidade ainda protegida. É feita, então, a desproteção dessa extremidade e o subsequente acoplamento do próximo resíduo. Ao final da síntese, é feita a clivagem do peptídeo, separando-o da resina, e, concomitantemente, a desproteção de todos os grupos protetores das cadeias laterais. A Figura 1.10 mostra uma representação esquemática da síntese de peptídeos em fase sólida, com a ligação do grupo à resina, que é a mais amplamente utilizada.

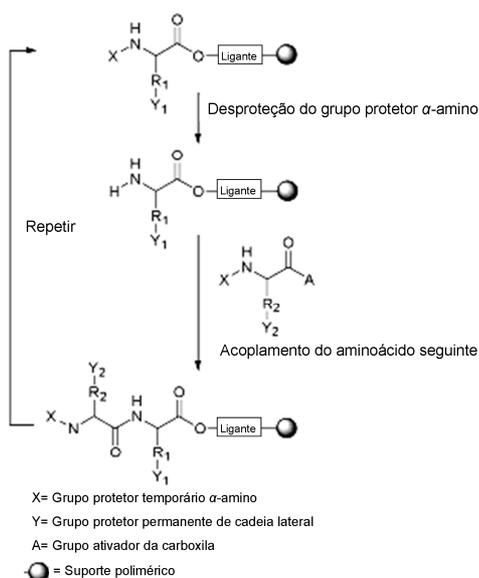


Figura 1.10. Representação esquemática do início da síntese de peptídeos em fase sólida. Modificado de <http://www.cem.com>.

A estratégia Fmoc é uma metodologia que envolve o uso do 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc, Figura 1.11) como protetor do grupo α -amino. Esse grupo é removido facilmente em meio básico, enquanto que os grupos protetores das cadeias laterais devem ser lábeis em meio ácido. Em geral, utiliza-se para a desproteção uma solução de piperidina e, para a clivagem final, emprega-se ácido trifluoroacético (TFA), que provoca a quebra da ligação entre o peptídeo e a resina e retira os grupos protetores das cadeias laterais, além de ser uma substância extremamente volátil, podendo ser retirada do meio por evaporação simples. Juntamente com os derivados de aminoácidos são utilizados compostos denominados ativadores, que ativa o componente carboxílico que irá reagir com a extremidade *N*-terminal desprotegida. Comumente, utilizam-se compostos como carbodiimidas, sais de fosfônio ou urônio e hidroxibenzotriazol como ativadores. Os principais ativadores utilizados nessa estratégia de síntese são mostrados na Figura 1.12 (p. 18).

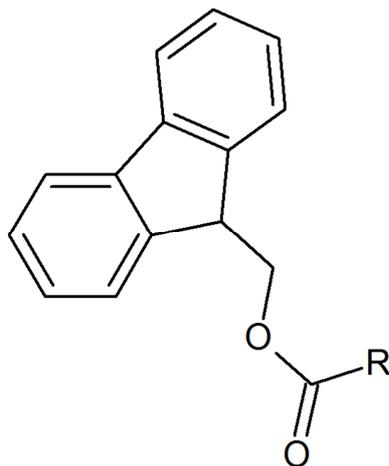


Figura 1.11. Grupo protetor 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) de terminação α -amino.

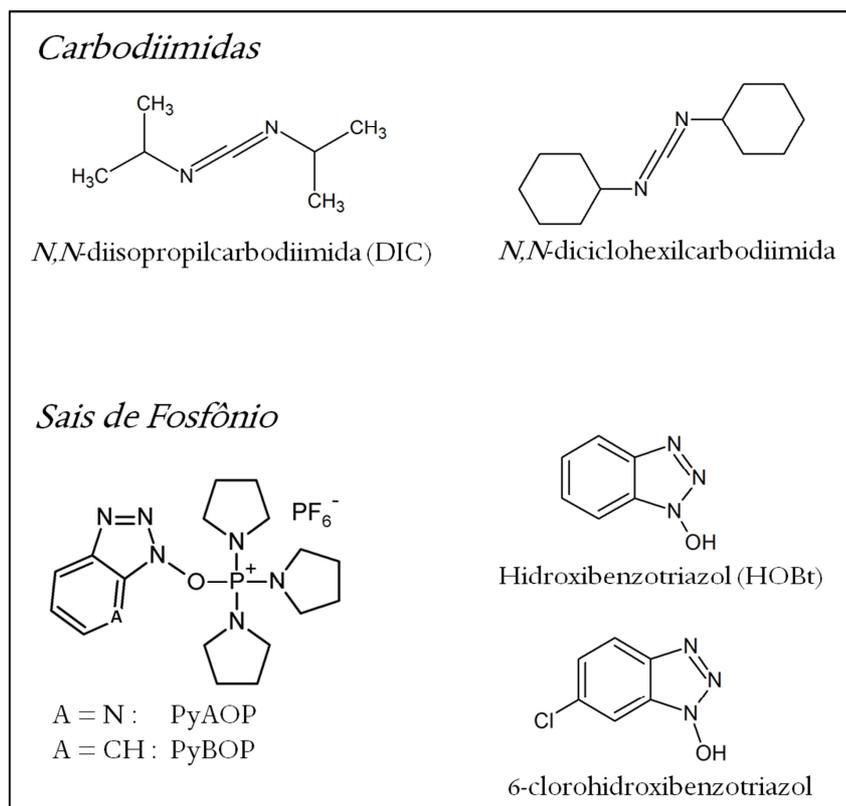


Figura 1.12. Reagentes ativadores da carbonila mais utilizados na síntese em fase sólida de peptídeos, na estratégia Fmoc.

1.4. Características angulares de estruturas de proteínas e peptídeos

Apesar de essas biomacromoléculas possuírem uma gama enorme de possibilidades conformacionais, normalmente apenas uma pequena fração das possibilidades de estruturação é possível, devido a diversos fatores estruturais, como repulsões estéricas, aromaticidade, interações eletrostáticas, de Van der Waals e ligações hidrogênio, dos tipos intra e intermoleculares. Em seu estado nativo, ou seja, à temperatura ambiente, em solução e sem interações com outra proteína, para a maior parte desses compostos, as distribuições dos ângulos diedros da cadeia principal (φ , ψ e ω) são restritas a apenas alguns valores.

O ângulo ω é o ângulo relativo à ligação peptídica, envolvendo os átomos $C_{\alpha}(i) - C'(i) - N(i + 1) - C_{\alpha}(i + 1)$ (Figura 1.2, p. 7), e é dependente do tipo de resíduo de aminoácido. Devido

ao fato de ser uma ligação amídica e apresentar efeitos de ressonância, a ligação peptídica possui um caráter parcial de ligação dupla. Isso significa que sua rotação livre não é possível, o que resulta em uma geometria da ligação peptídica sempre perto da planaridade. Normalmente, o ângulo ω tem o valor de 180° , caracterizando uma conformação *trans*. Entretanto, conformações *cis* ($\omega = 0^\circ$) também são encontradas, e são consideradas como parte importante na função da proteína. Resíduos de prolina, em especial, têm uma tendência maior a adotar essa conformação, principalmente em seu lado *N*-terminal, conforme mostrado na Figura 1.5 (p. 9). De fato, estudos que se basearam em considerações termodinâmicas, estimam que, em peptídeos acíclicos, aproximadamente 30% das ligações entre um resíduo de prolina e um outro resíduo de aminoácido qualquer podem estar na forma *cis*, enquanto que apenas 1,5% de ligações peptídicas entre dois resíduos que não sejam prolinas apresentam esse tipo de conformação (Weiss *et al.*, 1998).

Outra característica interessante do ângulo diedro da ligação peptídica é que, na realidade, existe uma distribuição de valores de ω ao redor de seu valor ideal. Análises de diversas estruturas protéicas resolvidas por difração de raios-X mostraram que o desvio-padrão desse ângulo de torção é de $\sim 5,6^\circ$, o que resulta em desvios de planaridade de até 12° (Morris *et al.*, 1992; MacArthur & Thornton, 1996; Wilson *et al.*, 1998).

Os ângulos φ e ψ , por sua vez, representam variáveis mais importantes nas estruturas dessas biomacromoléculas. Suas combinações caracterizam principalmente a estrutura secundária de peptídeos e proteínas e, até mesmo, estruturas terciárias. Com base em considerações estéricas, Ramachandran e colaboradores (Ramachandran *et al.*, 1963) mostraram que combinações de φ e ψ dos resíduos de aminoácido das cadeias polipeptídicas são restritas a certas faixas de valores, que podem ser visualizadas no chamado diagrama de Ramachandran (Figura 1.13, p. 20).

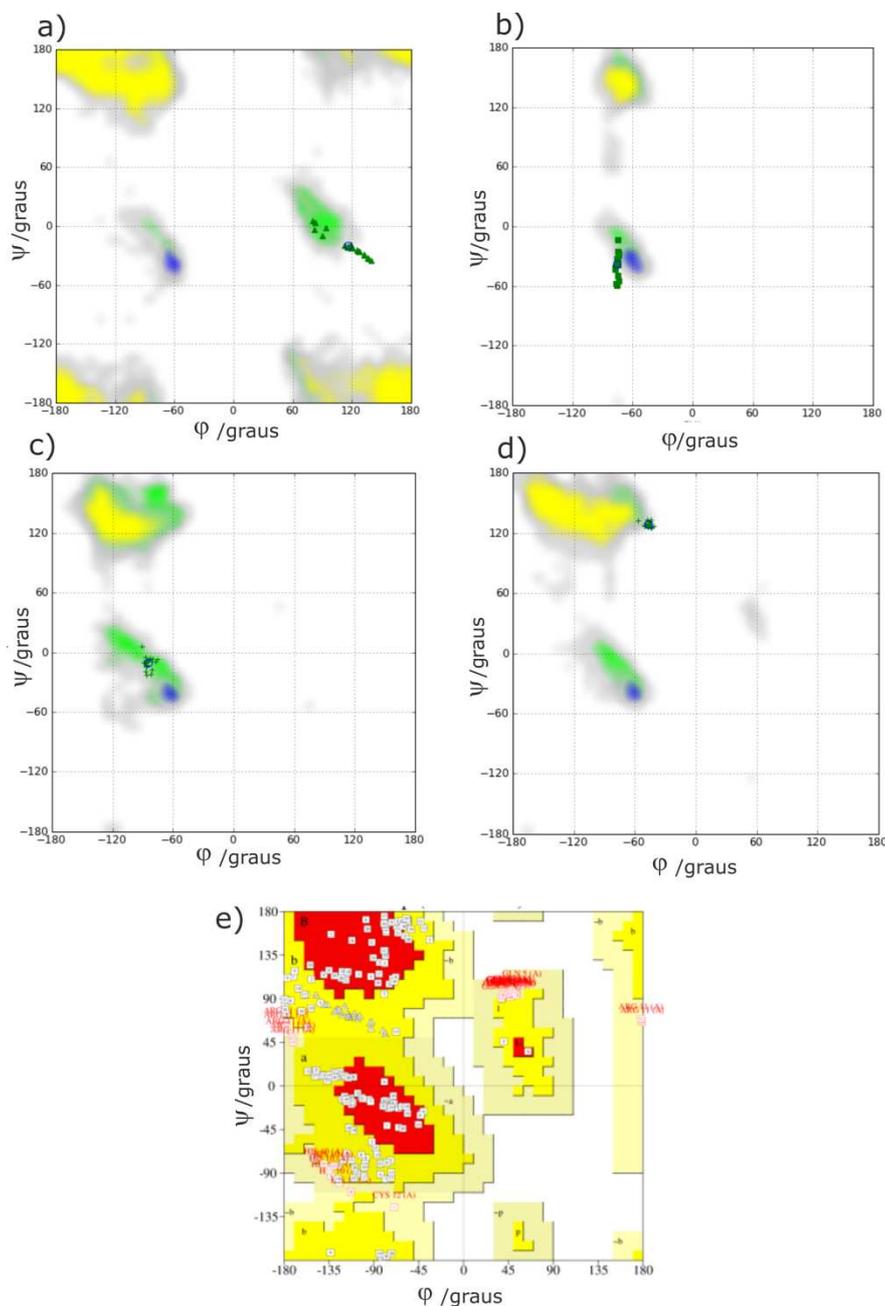


Figura 1.13. Diagramas de Ramachandran específicos para os resíduos (a) Gly, b) Pro, c) Val, d) Ala e (e) diagrama de Ramachandran generalizado. De (a) a (d), as cores azul e amarela representam as regiões mais favorecidas do digrama, a cor verde, as regiões adicionalmente permitidas, a cor cinza as regiões generosamente permitidas e a cor branca, a região proibida. Em (e) as cores vermelha, amarela, marrom-claro e branca representam as regiões mais favorecidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas. Figuras (a) a (d) obtidas pelo *iCing* para a estrutura de código PDB 1A24 e figura (e) obtida pelo programa PROCHECK, para a estrutura de código PDB 1A1P.

Além das restrições estéricas, os ângulos ψ e ϕ exibem preferências de combinações entre si que dependem do tipo de resíduo envolvido e dos elementos de estrutura secundária, resultando em uma distribuição mais específica desses ângulos diedros. Como será discutido

posteriormente, o diagrama de Ramachandran tem extrema importância na análise estrutural de modelos experimentais e puramente teóricos de peptídeos e proteínas.

1.5. Determinação de estruturas de proteínas e peptídeos

Com o objetivo de se obter um melhor entendimento das funções biológicas e mecanismos de ação de peptídeos e proteínas, tornou-se imprescindível a determinação de estruturas tridimensionais em diversas condições. Muitas são as técnicas que são capazes de fornecer tais informações, porém a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) vem-se consolidando cada vez mais como uma poderosa ferramenta para obtenção de dados estruturais de peptídeos e proteínas em variados meios. Porém, previamente ao estudo estrutural por RMN, são realizados rotineiramente experimentos de Dicroísmo Circular (CD) com o objetivo de obter informações a respeito de sua estrutura secundária e equilíbrio entre diferentes estados conformacionais de peptídeos e proteínas em um dado ambiente a ser empregado no experimento de RMN.

1.5.1. Dicroísmo Circular

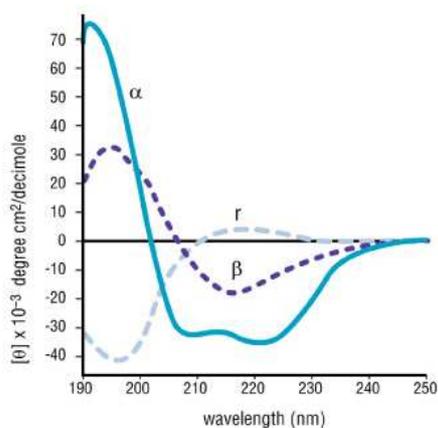
A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) baseia-se na absorção preferencial de uma das componentes circulares da luz plano-polarizada por grupos cromóforos de uma amostra opticamente ativa. Entrando em contato com a amostra, essa luz passa a apresentar certa diferença de fase entre as amplitudes de suas componentes circulares (Brahms & Brahms, 1980; Cantor & Timasheff, 1982). Essa diferença é denominada elipticidade, θ , podendo assumir valores positivos ou negativos, dependendo da componente preferencialmente absorvida.

A espectroscopia CD é muito utilizada no estudo estrutural de peptídeos. Nesta classe de substâncias, o grupo cromóforo de maior importância é o grupo amida ($R_1 - (C = O) - NH - R_2$), correspondente à ligação peptídica. Apesar de existir influência de grupos aromáticos pertencentes às cadeias laterais de determinados resíduos de aminoácido, é a análise das absorvâncias das ligações peptídicas que fornece informações valiosas a respeito da estrutura secundária dos peptídeos.

A intensidade e energia referentes às absorções desses cromóforos dependem dos valores adotados pelos ângulos diedros φ e ψ (Figura 1.2, p. 7). Isso ocorre porque esses ângulos diedros definem as condições de coplanaridade dos orbitais envolvidos na ligação peptídica. Como os

valores desses ângulos dependem das interações intramoleculares, do estado de agregação e das interações que o peptídeo pode fazer com o solvente, as absorções são dependentes das conformações adotadas.

Através do estudo por CD, pode-se inferir sobre a predominância das estruturas secundárias α -hélice e folha- β ou a ausência de um padrão estrutural recorrente (denominado estrutura randômica). Cada estrutura secundária (ou ausência dela) corresponde a determinadas transições eletrônicas que implicam em absorbâncias, de sinal positivo ou negativo em determinado comprimento de onda (λ). A determinação da estrutura secundária predominante ou estrutura secundária média é realizada por comparação com espectros padrões de CD de outras amostras cujas estruturas secundárias são conhecidas e bem definidas. Essa comparação é realizada por meio de cálculos de desconvolução (Cantor, 1982; Sreerama, 2000), em que se considera que o espectro CD é uma combinação linear de diferentes características espectrais induzidas pela estrutura secundária de um peptídeo. Esses espectros de CD padrões e suas respectivas absorções e transições são mostrados na Figura 1.14.



Estrutura	Transição	λ /nm
Randômico	$n \rightarrow \pi^*$	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 1.14. Espectros padrão de dicroísmo circular, em que α se refere à α -hélice; r, a estruturas randômicas e β , a estruturas folha- β .

1.5.2. Ressonância Magnética Nuclear em solução

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que tem sido usada de forma crescente para a elucidação estrutural de biomacromoléculas como peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Cavanagh *et al.*, 2006), especialmente devido a sua versatilidade em proporcionar a obtenção de dados nos mais diversos meios, além de fornecer informações a respeito de aspectos mais dinâmicos da estrutura, bem como estados de agregação e reatividade de sítios. A RMN tem

sido uma ferramenta poderosa para determinar a estrutura de peptídeos e proteínas ativos em membranas, sendo empregada nas fases líquida e sólida.

Apenas oito anos após a primeira descrição do efeito do spin nuclear por Isidor Rabi em 1939 (Gil, 1987), estudos de elucidação estrutural de substâncias orgânicas foram realizados com amostras sólidas e líquidas (Güntert, 1998). Em 1954, Jacobson e colaboradores utilizaram pela primeira vez a RMN em solução para estudar uma biomacromolécula, investigando o efeito do solvente nas propriedades do DNA (Jacobson *et al.*, 1954). Nesse estudo empregando RMN de ^1H , verificou-se que a alta viscosidade presente em soluções de DNA deve-se à formação de camadas de hidratação com uma ordenação superior à da água pura. Em 1957 foi obtido o primeiro espectro de RMN de ^1H de uma proteína, a ribonuclease (Saunders *et al.*, 1957). Até 1965 foram publicados 30 trabalhos descrevendo aplicações da RMN a biomacromoléculas. No início da década de 1970 havia 200 publicações e, em 1980, esse número se aproximava a 4.000 publicações, utilizando informações dos espectros de RMN em uma dimensão (RMN 1D) para investigar propriedades específicas dessas estruturas (Güntert, 1998).

Os primeiros trabalhos que utilizaram a RMN para a obtenção de estruturas tridimensionais de biomacromoléculas datam do início da década de 1980. A determinação estrutural do glucagon (Braun *et al.*, 1981) e o estudo conformacional de uma toxina de escorpião em solução aquosa (Arseniev *et al.*, 1984) foram realizados aplicando-se RMN a metodologias de restrições conformacionais. Um trabalho de maior complexidade foi realizado por Zuiderweg e colaboradores, que analisaram a influência do *lac repressor* na estrutura de três cadeias na forma α -helicoidal (Zuiderweg *et al.*, 1984). Posteriormente, foram realizadas a elucidação estrutural da α I-purotionina, com resultados similares à obtida por difração de raios-X (Cloure *et al.*, 1986) e a determinação do inibidor protease 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 da 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. Esses métodos computacionais tiveram maior aceitação após a determinação estrutural do tendamistato por RMN (Kline *et al.*, 1986), com resultados similares aos obtidos por raios-X (Pflugrath *et al.*, 1986). Nessa mesma época, Wüthrich introduziu a metodologia de atribuição sequencial, baseada na identificação de sequências únicas de resíduos em cadeias polipeptídicas e de ácidos nucleicos

(Wüthrich, 1986). Através dessa 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 nos estudos de biomacromoléculas desenvolveram-se consideravelmente, obtendo-se espectros em aparelhos de altas resoluções e mapas de contornos multidimensionais sem sobreposição de sinais.

Uma diversificação crescente de técnicas de RMN combinadas a métodos computacionais tem sido verificada para determinação estrutural de biomacromoléculas, justificando uma revisão dos seus usos em análises configuracional e conformacional. Assim sendo, a seguir são descritas as principais metodologias da RMN na determinação estrutural de peptídeos, abordando as restrições conformacionais a partir de dados de RMN, as informações estruturais contidas em mapas de contornos de RMN 2D, a análise sistemática de conformações locais, as consistências dos dados para atribuições estereoespecíficas não determinadas diretamente pelos dados de RMN, a conversão dos parâmetros obtidos experimentalmente em informações tridimensionais, cálculos teóricos de otimização de geometria das estruturas resultantes e as metodologias de análise para validar ou não o modelo final.

1.5.2.1 Atribuição Sequencial

O método de atribuição sequencial foi proposto por Kurt Wüthrich em 1986 (Wüthrich, 1986) e, utilizando da combinação de espectros bidimensionais, permite a obtenção de informações sobre as conectividades intra e inter-residuais de átomos de hidrogênio. Os espectros COSY ou TOCSY permitem obter conectividades intrarresiduais, através das ligações (acoplamento escalar J), permitindo, dessa forma, a identificação do sistema de *spins* de cada resíduo na sequência peptídica. No mapa de contornos NOESY, as conectividades obtidas se dão através do espaço (devidas à relaxação cruzada via dipolo-dipolo), podendo ser tanto do tipo intrarresidual quanto inter-residual ($d_{NN,r}$ Figura 1.15b, p. 25). Nessa etapa, são identificadas as correlações NOE do tipo sequencial ($d_{NN}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$), que permitem identificar quais resíduos de aminoácido estão ligados entre si. Além disso, são utilizados concomitantemente mapas de contorno de experimentos heteronucleares como $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC e $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC, por exemplo. Esses experimentos ajudam a resolver problemas de ambiguidade de atribuição que podem ser resultantes de sobreposições dos sinais.

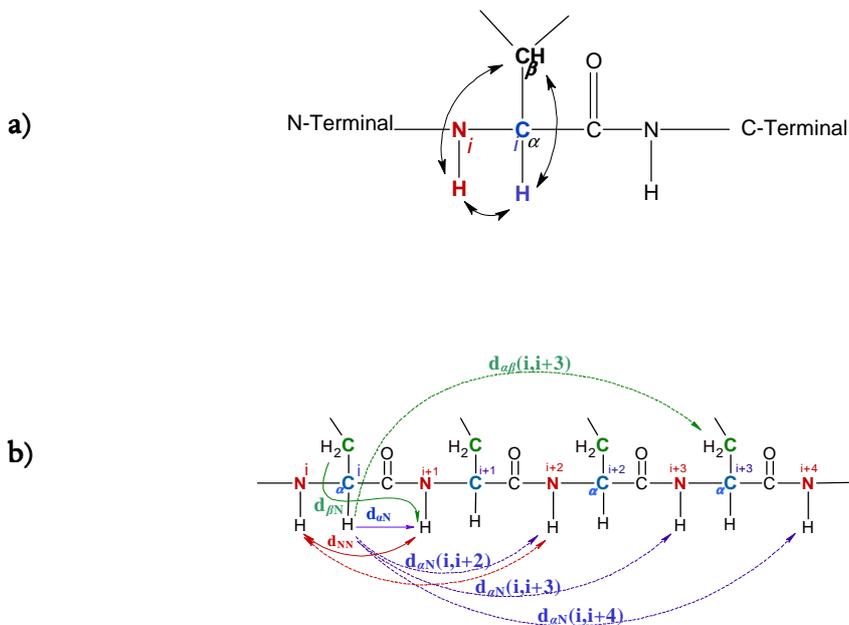


Figura 1.15. Representação de possíveis interações entre átomos de hidrogênio intraresiduais (a). Esquema da representação de NOEs típicos de estrutura secundária α -hélice (b).

Tendo sido determinada a estrutura primária da proteína ou peptídeo, tem-se início à atribuição de correlações NOE características de cada estrutura secundária. Como neste trabalho, estudou-se somente peptídeos com estruturas secundárias do tipo α -hélice, a Figura 1.15 mostra apenas os NOEs típicos dessa estrutura secundária.

Por fim, tendo sido atribuídos os sinais relativos à estrutura secundária, passa-se à atribuição de NOEs referentes a estruturas terciária e quaternária. Devido ao fato de esses níveis estruturais não apresentarem padrões recorrentes como as estruturas secundárias, a atribuição de sinais nessa etapa, bem como o tratamento posterior dos dados, é bem mais trabalhoso, como será discutido nos estudos realizados para este trabalho.

1.5.2.2 Conversão de dados de RMN para informações estruturais tridimensionais

Ao contrário das técnicas de difração, grande parte dos resultados espectroscópicos da RMN não é usada diretamente na determinação das estruturas secundária e terciária de peptídeos e proteínas. Para tal, restrições geométricas conformacionais são calculadas a partir desses dados e, subsequentemente, usadas para o cálculo das estruturas (Wüthrich, 1986; Cavanagh *et al.*, 2006)

Existem atualmente três principais classes de restrições estruturais que podem ser distinguidas: restrições de distância, restrições de ângulos diedros (ou ângulos de torção) e restrições orientacionais.

1.5.2.2.1 Restrições de distância

As restrições de distância podem ser divididas em duas classes principais: restrições derivadas de NOEs e restrições de ligação hidrogênio, diferenciando-se entre si tanto pela metodologia utilizada na aquisição dos dados de RMN quanto pelo seu efeito no cálculo final das estruturas.

Como comentado na seção anterior, as restrições derivadas de NOEs têm como princípio o fato de, no efeito nuclear Overhauser, a transferência de magnetização ocorre pelo espaço, o que propicia dois núcleos interagirem entre si, mesmo que eles estejam distantes entre si na estrutura primária do peptídeo. Além disso, 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 moleculares, conforme representado pela Equação 1.1.

$$V = \langle r^{-6} \rangle f(\tau_c) \quad (\text{Eq. 1.1})$$

Embora seja possível calcular diretamente os volumes dos sinais de NOE pela Equação 1.1, é muito mais comum classificar os NOEs de acordo com sua intensidade: fortes, médios e fracos (Markley *et al.*, 1998), correspondendo, respectivamente, a limites superiores de distância de 2,80, 3,40 e 5,00 Å. Embora, à primeira vista, essa metodologia possa parecer menos precisa que a conversão pela Equação 1.1, a classificação semiquantitativa dos NOEs reflete melhor as incertezas experimentais advindas de efeitos como difusão de *spin* e dinâmicas locais, bem como erros de integração dos sinais e sobreposições nos espectros (Nabuurs *et al.*, 2004). É importante notar que vários tratamentos são utilizados para uma conversão mais efetiva dos sinais, levando em conta diversos fatores, como por exemplo degenerescências espectrais de grupos metila e anéis aromáticos em resíduos de aminoácido (Fletcher *et al.*, 1996; Guntert, 1998).

As restrições de ligação hidrogênio também levam em conta valores máximos e mínimos de distância, porém, ao contrário das restrições de distância derivadas de correlações NOE, um conjunto de duas restrições é considerado conjuntamente, conforme mostrado na Figura 1.16 (p. 27). Esses limites máximos e mínimos de distância são estipulados de forma que os átomos que participam desse tipo de interação (átomo doador de elétrons e hidrogênio aceptor de elétrons)

tenham entre si distâncias consideradas ótimas para que ocorra a ligação de hidrogênio (entre 1,8 e 2,0 Å). Em estruturas α -hélice, este tipo de restrição é de grande utilidade, uma vez que são observadas comumente ligações de hidrogênio inter-residuais na cadeia principal dos tipos i , $i + 3$; $i, i + 4$ e $i, i + 5$, entre átomos de hidrogênios amídicos e oxigênios carbonílicos, conforme mostrado na Figura 1.17.

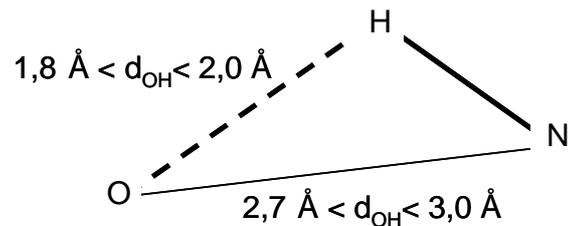


Figura 1.16. Limites de valores de distância para as restrições de ligação de hidrogênio em ligações peptídicas.

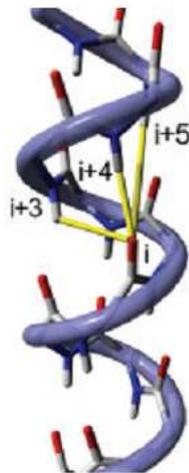


Figura 1.17. Estrutura α -hélice determinada univocamente, com representação, em tubo amarelo, das três restrições de ligação de hidrogênio possíveis de ocorrer. Figura retirada de (Nabuurs, Spronk et al., 2004).

Os átomos que participam da ligação hidrogênio podem ser determinados por experimentos que permitam identificar átomos de hidrogênio que não sofrem troca com deutério (ou que troquem mais lentamente) em solventes próticos deuterados (Wagner & Wuthrich, 1982; Konrat *et al.*, 1999), por valores de deslocamento químico (Wishart *et al.*, 1992), ou constantes de acoplamento do tipo $^2hJ(C'-HN)$ e $^3hJ(C'-N)$ (Cordier & Grzesiek, 1999; Cordier *et al.*, 1999).

1.5.2.2.2. Restrições de ângulos diedros

Assim como as distâncias interatômicas, 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 (Karplus, 1959), descrita na Equação 1.2:

$${}^3J(\theta) = A \cos^2\theta + B \cos\theta + C \quad (\text{Eq. 1.2})$$

em que θ corresponde ao ângulo de torção entre os quatro átomos envolvidos e os três parâmetros A , B e C são empiricamente determinados, 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 acoplados e, quando há resolução espectral suficiente, técnicas como DQF-COSY, TQF-COSY e E.COSY (Griesinger *et al.*, 1985; Mujeeb *et al.*, 1999) e *Phase Sensitive* COSY (Delaglio *et al.*, 2001) são empregadas. Entretanto, experimentos de RMN de ${}^1\text{H}$ unidimensionais são muitas vezes inviáveis, devido à grande sobreposição de sinais e os experimentos DQF-COSY, TQF-COSY e E.COSY não costumam fornecer resultados satisfatórios, em especial quando se trabalha com macromoléculas em abundância natural, em que, muitas vezes, as correlações cruzadas não exibem estrutura fina e a maior parte das diagonais dos multipletos se sobrepõem (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 que realizem esse tipo de conversão. No caso do *Phase Sensitive* COSY, 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 em estudo. Os programas que realizam essa conversão são 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 (Vranken & Rieping, 2009). Assim sendo, combinações dos ângulos diedros φ e ψ contribuem significativamente para os valores de deslocamento químicos dos átomos que

compõem a cadeia principal da biomolécula. Esses programas fazem uso de uma base de dados de deslocamentos químicos de átomos de proteínas cujas estruturas foram elucidadas com alta resolução, utilizando diversos cálculos e tratamentos estatísticos e determinam com precisão as restrições angulares.

1.5.2.2.3. Restrições orientacionais

Todas as restrições geométricas descritas anteriormente são de curto alcance. Embora elas muitas vezes sejam suficientes para a determinação estrutural de proteínas globulosas e peptídeos de massas moleculares baixas, o mesmo não pode ser dito para biomoléculas com geometria mais linear. Nesses casos, faz-se necessária a obtenção de informações geométricas de longo alcance envolvendo especialmente suas extremidades (Clare *et al.*, 1999). Uma grandeza medida por RMN que permite a obtenção de informações dessa natureza é o acoplamento dipolar entre núcleos. Acoplamentos dipolares dependem tanto da distância entre dipolos magnéticos quanto de suas orientações em relação ao campo magnético externo \mathbf{B}_0 . Entretanto, em soluções isotrópicas, a dependência do valor do acoplamento dipolar em relação a \mathbf{B}_0 é nula, devido ao fato de as amostras solubilizadas não adquirirem ordenação em razão da rotação das suas moléculas e do movimento browniano (Lipsitz & Tjandra, 2004).

Na forma cristalina, porém, devido às significativas restrições de movimento das biomoléculas, bem como ao total alinhamento de vetores dipolo magnético em relação a \mathbf{B}_0 , os acoplamentos dipolares resultantes são demasiadamente grandes, a ponto de interferirem na análise de RMN. Dessa maneira, a medida dessas grandezas em amostras na forma cristalina é bastante difícil e impraticável na maioria dos casos. No entanto, é possível ordenar amostras em meios líquidos fracamente orientados como cristais líquidos e bicelas, o que faz com que os acoplamentos dipolares sejam pequenos e mensuráveis, sendo assim denominados de acoplamentos dipolares residuais (RDC). Esse acoplamento relaciona-se diretamente às colisões entre moléculas da amostra e do solvente, resultando em uma ordenação mínima e acoplamento dipolar mensurável (Tjandra & Bax, 1997). Os RDCs podem ser medidos pelos mapas de contornos $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC ou $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC sem desacoplamento na dimensão do carbono ou nitrogênio, respectivamente (Figura 1.18, p. 30).

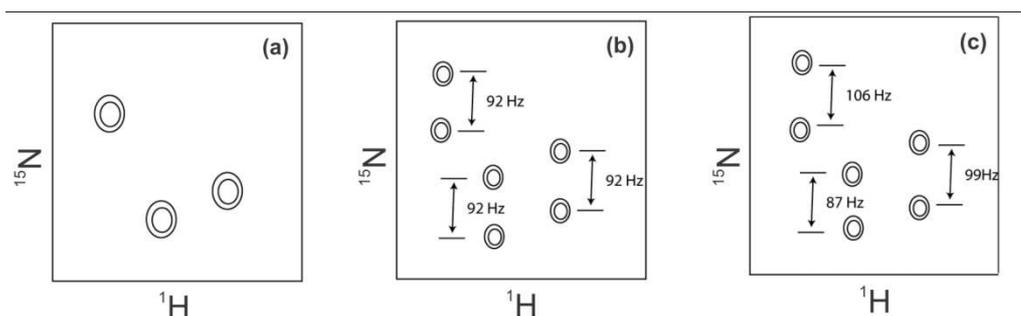


Figura 1.18. Mapas de contornos ^1H , ^{15}N -HSQC: (a) desacoplado em ambas as dimensões, com desdobramentos ^{15}N - ^1H não observados; (b) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , em solução isotrópica, com desdobramentos ^{15}N - ^1H iguais ao acoplamento escalar ^{15}N - ^1H (~ 92 Hz); (c) sem desacoplamento na dimensão ^{15}N , meio parcialmente orientador, desdobramentos ^{15}N - ^1H somados aos RDCs.

1.5.2.2.4. Construção dos modelos estruturais a partir dos dados de restrição conformacional: Arrefecimento Simulado

Após se obterem as restrições conformacionais, elas são utilizadas para o cálculo dos modelos estruturais. Diversas metodologias de cálculo foram utilizadas desde os primeiros trabalhos de determinação estrutural por RMN, sendo que os protocolos mais largamente empregados são o cálculo em geometria de distâncias (Braun *et al.*, 1981; Havel & Wüthrich, 1984) o cálculo por funções-alvo variáveis (Braun & Go, 1985) e o arrefecimento simulado, também conhecido pela expressão em inglês *simulated annealing* (Nilges *et al.*, 1988; Brunger *et al.*, 1997). A metodologia mais largamente utilizada, no entanto é o arrefecimento simulado.

O arrefecimento simulado é um procedimento de minimização de energia baseado em dinâmica molecular. O nome desse método deriva de uma técnica comum em metalurgia para preparo de estruturas metálicas mais resistentes e estáveis por meio de aquecimentos rápidos alternados com resfriamentos lentos e controlados. Durante o cálculo dos modelos, essa variação de temperatura é simulada teoricamente, mostrando-se bastante eficiente para a obtenção de estruturas estáveis (Brunger *et al.*, 1990). A Figura 1.19 (p. 31) mostra um exemplo das mudanças de conformação sofridas durante uma simulação de SA. Como resultado são obtidas geometrias com energias próximas ao mínimo global da estruturas estudadas (Nilges *et al.*, 1988).

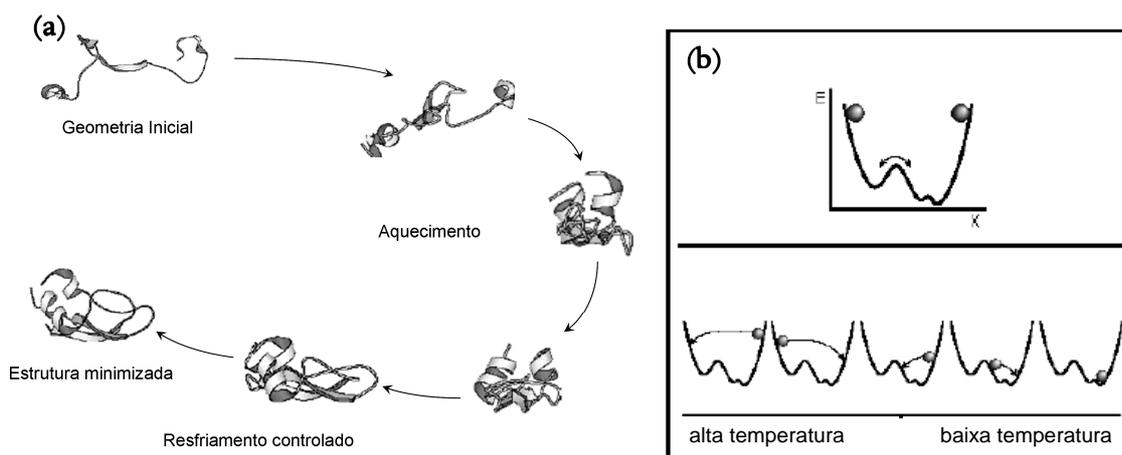


Figura 1.19. Representação das mudanças sofridas por uma molécula durante o processo de cálculo por recozimento simulado: **(a)** na conformação e **(b)** na energia (Nilges, 2001).

Apesar de o arrefecimento simulado ser bastante eficiente e rápido na busca de mínimos locais de baixa energia, todo o cálculo estrutural é feito sem considerar efeito algum do solvente ou de qualquer outra molécula. Uma consequência disso pode ser a geração de estruturas de baixas energias, mas que não condizem com o sistema real, uma vez que o solvente tem efeito considerável sobre a estruturação dessas biomoléculas. Para contornar isso, é recomendável analisar detalhadamente os parâmetros de qualidade estrutural e realizar refinamentos em solvente explícito, conforme será descrito na próxima seção.

1.5.2.2.5. Análise, Validação e Qualidade Estrutural.

A conversão de informações de RMN de proteínas em estruturas tridimensionais tem se mostrado dependente de metodologias computacionais, bem como os subsequentes refinamentos e análises. Se essas informações não forem suficientes para se obterem estruturas definidas ou se as geometrias resultantes forem inconsistentes com essas restrições, então se deve determinar novamente o conjunto de dados de entrada até que se obtenha uma geometria satisfatória. Logo após se obter esse conjunto de estruturas, estas são submetidas à etapa posterior de análise, para determinar o grau de dispersão entre os conformeros calculados, para inferir a qualidade do conjunto resultante de estruturas e, por fim, validar ou não o método.

1.3.2.2.6. Violações de Restrições

Uma violação de restrição significa que o algoritmo utilizado não satisfaz as condições conformacionais impostas pelas restrições. A maior parte dos erros inerentes aos cálculos pode

levar a dois tipos de violação. A violação randômica é verificada normalmente ao final dos cálculos, ocorrendo em regiões diferentes de apenas algumas conformações obtidas. Quando o desvio dos valores finais das variáveis geométricas não difere consideravelmente das restrições, essas violações randômicas não comprometem a análise conformacional. Contudo, a discrepância muito grande entre as geometrias finais e as restrições conformacionais correspondentes pode surgir de erros em etapas anteriores ou do fato de que os dados utilizados não foram suficientes para gerar um grupo definido de conformações similares.

As violações consistentes são assim consideradas caso ocorram em aproximadamente 75% das conformações do conjunto final calculado, indicando falhas mais graves em regiões definidas, principalmente na atribuição nos mapas de contornos de RMN. Esse tipo de violação pode advir de inconsistências nos dados de entrada, erros de atribuição, problemas de calibração das intensidades de sinais NOE, ou a presença de diversos monômeros no meio em que foram adquiridos os dados. O número e magnitude das violações de restrição de um conjunto de conformações podem indicar o grau de concordância entre os dados experimentais e os modelos teóricos empregados. Entretanto, a interpretação desse número de violações pode ser dificultada pelos critérios de seleção das conformações baseada em energia.

Os programas computacionais de identificação de violações utilizam um parâmetro denominado valor de corte. As distâncias ou ângulos abaixo do valor de corte não são considerados violações, porém, aqueles valores acima são tratados como violações. Isto permite avaliar se, no conjunto final de geometrias de uma estrutura, há violações de restrições. No entanto, a utilização de um valor de corte demasiado grande pode encobrir restrições oriundas de violações consistentes, resultando em análises estruturais incorretas. Assim sendo, torna-se apropriada também a verificação de ocorrência de violações de restrição a valores de corte mais baixos.

As geometrias geradas a partir das informações dos dados de RMN podem apresentar violações estruturais, resultando em imprecisões de algumas regiões específicas do conjunto de geometrias geradas ou, até mesmo, em estruturas terciárias totalmente incorretas. Desta forma, a validação das geometrias obtidas pelas informações dos dados de RMN torna-se muito importante para que a análise conformacional tenha um grau satisfatório de qualidade.

Os programas utilizados no cálculo estrutural possuem uma gama de algoritmos que medem a qualidade dos resultados da análise. Este não é um procedimento trivial, pois envolve aspectos como a qualidade da teoria ou modelo, amostragem e convergência dos resultados, bem

como a exatidão do campo de força, a eficiência e adequação do *software* utilizado nos cálculos (Spronk *et al.*, 2004). A validação pode resultar em uma concordância entre o experimento e o modelo. Isso pode indicar que a simulação reflete realmente o sistema experimental, a técnica de simulação utilizada é insensível à propriedade estudada ou houve compensação de erros. Por sua vez, a não concordância entre os resultados teóricos e experimentais pode ser devida ao modelo estar incorreto, a um campo de força inadequado, à não convergência da simulação, a problemas e a usos incorretos do *software*, a dados incorretos, ou até mesmo uma estrutura pouco comum (Van Gunsteren, 1998).

1.5.2.7. Conteúdo de Informação como Parâmetro de Qualidade

Devido ao fato de a determinação estrutural de peptídeos e proteínas por RMN depender de uma densa rede de restrições geométricas de vários tipos, existe uma tendência em considerar que quanto maior for o número de restrições utilizadas, melhor é a qualidade do modelo construído. Nem sempre isso é verdade. 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 intrarresidual, uma porcentagem próxima à das restrições à longa distância (restrição entre átomos de hidrogênio separados entre si por mais de quatro resíduos na sequência polipeptídica). Entretanto, enquanto o conjunto de restrições à longa distância for responsável por cerca de 30% das informações estruturais, o conjunto das intrarresiduais conteria no máximo 0,4% dessa informação. Interessantemente, o conjunto de restrições de ligação de hidrogênio, que constituía, no máximo, 7,5% de todas as restrições, for responsável por cerca de 30% da informação estrutural do modelo.

Essa diferença entre o impacto de diferentes tipos de restrição sobre o 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 ótimos já definidos. Portanto, grande parte das informações estruturais a curta distância está definida antes mesmo de o cálculo ter início. A essas restrições que contêm pouca informação estrutural, dá-se o nome de restrições redundantes.

Assim como existem restrições que contêm pouca ou nenhuma informação a respeito da estrutura, existem aquelas que, sozinhas, 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 resultantes de uma atribuição

incorreta, ou podem simplesmente ser a única restrição encontrada para certa característica geométrica presente na estrutura.

A determinação do conteúdo de informação em um conjunto de restrições é realizada pelo programa QUEEN (Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints) (Nabuurs, Spronk et al., 2003). O cálculo da informação em si é feito tendo como base a Teoria da Informação desenvolvida por Claude E. Shannon (Shannon, 1948) e desenvolvido em espaço de distância, em vez do espaço cartesiano.

O desenvolvimento completo da metodologia utilizada para a determinação do grau de informação das restrições está fora do escopo deste trabalho, mas, de forma simplificada, a técnica empregada consiste na utilização da incerteza H da Teoria da Informação e subsequente definição de uma medida de incerteza para cada átomo (H_n), que pode ser expandida para uma incerteza da estrutura ($H_{estrutura}$), ao se considerar que as incertezas atômicas são grandezas independentes entre si (para mais detalhes, consultar Nabuurs *et al.*, 2003). Por fim, a informação total (I_{total} , Eq.1.3) contida em um conjunto de R restrições experimentais é dada pela equação 1.3:

$$I_{total} = H_{estrutura|0} - H_{estrutura|R} \quad (\text{Eq 1.3})$$

em que $H_{estrutura|0}$ é a incerteza da estrutura sem nenhuma restrição experimental e $H_{estrutura|R}$ é a incerteza da estrutura com R restrições experimentais.

Similarmente, a informação (I_r , Eq.1.4) de uma única restrição experimental r pode ser definida da seguinte maneira:

$$I_r = H_{estrutura} - H_{estrutura|r} \quad (\text{Eq 1.4})$$

em que $H_{estrutura|r}$ é a incerteza da estrutura, dada uma restrição r e $H_{estrutura}$, a incerteza da estrutura antes da adição da restrição r .

Podem ainda ser desenvolvidos dois conceitos mais úteis na prática: a unicidade de informação ($I_{uni,r}$, Eq.1.5) e a informação média ($I_{med,r}$, Eq.1.6). A unicidade, ou informação única, referente a uma restrição r é definida como a informação adicionada por essa restrição, tendo-se conhecimento das demais restrições ($R - r$) no conjunto de dados:

$$I_{uni,r} = H_{estrutura|R-r} - H_{estrutura|R} \quad (\text{Eq 1.5})$$

A importância de uma restrição, considerando-se a totalidade do conjunto de restrições, é obtida calculando-se o conteúdo médio de informações amostrado pelo conjunto de dados completo (I_{med}). A informação média da restrição pode ser calculada para um conjunto de R restrições pela média do conteúdo de informação em cada permutação possível da lista de restrições:

$$I_{med,r} = \langle H_{estrutura} - H_{estrutura|r} \rangle \quad (\text{Eq. 1.6})$$

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 houver, por exemplo, duas restrições que contêm alto grau de informação, mas que são mutuamente coerentes, o cálculo de unicidade não será capaz de identificá-las como restrições de alta informação (*e.g.* duas restrições do tipo $\alpha N(i, i + 4)$ e $N\alpha(i, i - 4)$, mesmo que sejam as únicas restrições características de α -hélice em uma determinada estrutura e que, por isso, contêm alto grau de informação, não serão identificadas como tal pelo cálculo de unicidade, por serem mutuamente coerentes). O parâmetro informação média, no entanto, 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.

1.5.2.2.8. Parâmetros estatísticos utilizados na análise da qualidade estrutural

A maioria dos métodos que analisa a qualidade estrutural de peptídeos utiliza grandezas estatísticas para quantificar a distribuição dos dados geométricos dos modelos, bem como sua normalidade em relação a estruturas consolidadas e determinadas em alta resolução. Este tópico explica sucintamente alguns desses parâmetros utilizados na análise estrutural e que foram empregados neste trabalho.

1.5.2.2.8.1. Z-score

O *Z-score* é um dos principais parâmetros utilizados pelo programa WHATIF, possibilitando julgar quando determinada propriedade de uma estrutura pode ser considerada boa, ruim ou anormal (Hooft *et al.*, 1997; Linge *et al.*, 2003). O *Z-score* relaciona um valor x de

um parâmetro a uma distribuição gaussiana de um banco de dados (Equação 1.7). Nesta equação, $\langle x_{bd} \rangle$ e $\sigma(x_{bd})$ são respectivamente a média e o desvio padrão desse valor. Pelos valores de *Z-score* calculados sabe-se quais dados são valores isolados (*outliers*), ou seja, quais são improváveis de ocorrer.

$$Z = \frac{x - \langle x_{bd} \rangle}{\sigma(x_{bd})} \quad (\text{Eq. 1.7})$$

O RMS *Z-score* permite a análise da qualidade dos dados e do *Z-score*, verificando se a distribuição de valores tem mais ou menos valores isolados que o esperado e é dado pela Equação 1.8. O parâmetro Z_j é o *Z-score* definido pela Equação 1.7 para a observação j , sendo que N é o número total de observações.

$$RMSZ = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad (\text{Eq. 1.8})$$

1.5.2.2.8.2. Desvio Quadrático Médio (RMSD – Root Mean Square Deviation)

O desvio quadrático médio (RMSD) é uma grandeza utilizada geralmente para quantificar as diferenças entre as geometrias de um conjunto de estruturas teóricas. Os cálculos do RMSD dependem da forma da função restrigente. A função potencial bi-harmônica inclui todos os desvios em relação a uma distância definida. No caso da função do tipo “potencial de poço quadrado”, são considerados somente os desvios que se encontrarem fora dos limites superior e inferior (Brunger, Adams et al., 1997), resultando a Equação 1.9. O parâmetro d_{kl} é a distância calculada para a restrição k no modelo l , r_k^{sup} o limite superior da restrição k e r_k^{inf} é o limite inferior da restrição k . A soma é calculada para todas as N_r restrições de distância e para todos os N_m modelos. Como resultado, tem-se a medida média da diferença das posições entre os átomos nas estruturas.

$$RMS_{NOE} = \sqrt{\frac{1}{N_r N_m} \sum_{k=1}^{N_r} \sum_{l=1}^{N_m} (\Delta_{kl})^2} \quad \text{com} \quad \begin{cases} d_{kl} > r_k^{sup} & \Delta_{kl} = (d_{kl} - r_k^{sup}) \\ r_k^{inf} < d \leq r_k^{sup} & \Delta_{kl} = 0 \\ r_k < r_k^{inf} & \Delta_{kl} = (r_k^{inf} - d_{kl}) \end{cases} \quad (\text{Eq. 1.9})$$

O valor de RMS não fornece informações sobre a consistência dos dados experimentais, tampouco corresponde necessariamente ao espaço conformacional permitido pelas restrições conformacionais. Além disso, a amostragem das geometrias pelo algoritmo de cálculo pode estar

viciada, com restrições de geometria em acordo com os dados, mas que diferem significativamente das resultantes do cálculo estrutural. Isso pode ocorrer quando são empregadas poucas geometrias para o tratamento estatístico. De modo geral, a qualidade/confiabilidade dos resultados desse método está relacionada à menor dispersão das geometrias e, conseqüentemente, a valores menores de RMS. Normalmente, um valor de RMS até 3 Å sugere forte similaridade entre as geometrias (Tsai, 2002). Entretanto, é importante salientar que um valor baixo de RMSD não necessariamente é sinônimo de um conjunto estrutural de alta qualidade. Se o conjunto de restrições utilizado no cálculo contiver restrições erradas, essas incorreções se propagarão igualmente por todas as estruturas que compõem o conjunto final do modelo, fazendo com que ele possua um RMSD baixo, mas com geometria incorreta. É ainda mais importante notar que um valor de RMSD muito baixo, em muitos casos, não é desejável. Vale a pena lembrar que grande parte das estruturas resolvidas por RMN foi determinada em solução e, portanto, espera-se que o modelo que representa o sistema que foi medido reflita características de moléculas em solução. Dessa maneira, espera-se que essas moléculas possuam certo grau de mobilidade estrutural. Em outras palavras, valores baixos de RMSD significam que o modelo pode estar superestimando a precisão da técnica experimental, ou a estruturação da macromolécula. De fato, já foi proposto que, em prol de uma qualidade estrutural maior e também de modelos mais realistas, o RMSD seja maximizado, mas ao mesmo tempo, mantendo a conformidade com os dados derivados dos experimentos (Spronk *et al.*, 2003).

1.5.2.2.8.3. Distribuição de Ângulos Diedros

Combinações dos ângulos diedros φ e ψ são indicadores importantes da qualidade da conformação de regiões definidas de cadeias peptídicas. Conforme visto anteriormente, as possíveis combinações desses dois ângulos estão restritas por fatores estéricos a certas regiões do diagrama de Ramachandran (Figura 1.13e, p. 20). A análise da qualidade dos modelos é feita geralmente com base nas classificações de combinações dos ângulos φ e ψ em quatro regiões do diagrama: as regiões mais favoráveis, as adicionalmente permitidas, as generosamente permitidas e a proibida. A região adicionalmente permitida indica conformações permitidas nos limites extremos para os contatos atômicos desfavoráveis. A região generosamente permitida reflete conformações que são permitidas somente se houver certa flexibilidade nos ângulos de ligação. Na região proibida, as conformações são quase totalmente impedidas por fatores estéricos.

Em geral, para quantificar a distribuição de pontos no diagrama de Ramachandran, utilizam-se *Z-scores* calculados tanto para cada resíduo quanto para a cadeia peptídica. Normalmente, utilizam-se valores de *Z-score* combinados à representação gráfica do diagrama de Ramachandran. A Figura 1.20 mostra um exemplo da relação entre a distribuição de ângulos em um diagrama de Ramachandran e o valor de *Z-score*.

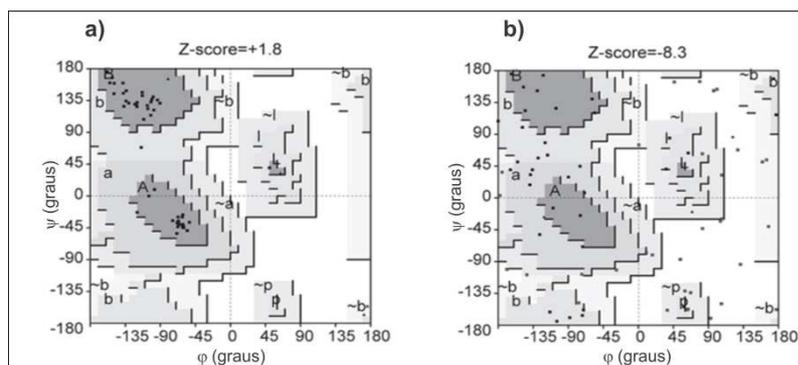


Figura 1.20. Relação entre o valor de *Z-score* e a distribuição de pontos no diagrama de Ramachandran. (a) Diagrama de Ramachandran com *Z-score* = 1,8 e (b) com *Z-score* = -8,3. As regiões favoráveis, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas e proibidas, estão representadas, respectivamente, por cinza-escuro, cinza-médio, cinza-claro e branco. Figura retirada de (Spronk, Nabuurs et al., 2004).

Os dados em regiões proibidas podem significar conformações anormais ou erros de cálculo, o que será verificado apenas pela análise dos dados de entrada. Os resíduos de D-aminoácidos são um exemplo de valores em regiões proibidas que não necessariamente constituem um erro. Todavia, resíduos em regiões permitidas do diagrama de Ramachandran não significam necessariamente ausência de erros. Em todos os casos, os *Z-scores* calculados, bem como a dispersão desses valores no diagrama, devem ser levados em consideração.

Uma validação pode ser baseada também nos ângulos ω . Conforme discutido anteriormente, esse ângulo pode assumir valores de 0° (forma *cis*) e 180° (forma *trans*) devido ao caráter parcial de ligação dupla entre o carbono e o nitrogênio da ligação peptídica, porém observa-se certo desvio de planaridade, de até 12° . Na verdade, a presença desse desvio é desejável em um conjunto de estruturas, o que quase nunca é observado em estruturas determinadas por RMN. Isso ocorre devido ao fato de as estruturas de entrada do cálculo serem parametrizadas, com os valores de ω definidos previamente. Além disso, o campo de força utilizado no cálculo não permite normalmente variações em torno desse ângulo. Outra

dificuldade presente nesse tipo de determinação de estruturas é que, a menos que especificado o contrário, todas as ligações peptídicas estão na forma *trans*.

1.5.2.2.8.4. Normalidade da Cadeia Principal

Outra grandeza considerada neste trabalho foi a normalidade da cadeia principal. Trata-se de um parâmetro de definição simples, mas de grande utilidade na análise das estruturas calculadas. Ela consiste basicamente na descrição da cadeia principal das estruturas calculadas, em relação a um banco de dados de estruturas de alta resolução. O cálculo desse parâmetro consiste em comparar as posições relativas dos C_α de cinco resíduos sequenciais, com todas as posições dos C_α de cinco resíduos sequenciais na base de dados de referência. A medida da normalidade da cadeia principal é medida geralmente pelo número de sequências de cinco resíduos similares na base de dados. Por convenção, todos os resultados são normalizados, sendo o valor máximo 80 e o valor mínimo zero.

1.5.2.2.9. Refinamento de estruturas

O refinamento de estruturas no cálculo a partir de dados de RMN consiste basicamente em submetê-las a outro procedimento de cálculo que possua um campo de força mais realista, ainda mantendo as restrições geométricas derivadas de dados experimentais. Essa etapa tem-se tornado essencial, uma vez que grande parte dos problemas encontrados em estruturas determinadas por RMN são originárias do campo de força aplicado durante o cálculo inicial. Uma das principais causas disso é que, a fim de diminuir o tempo computacional despendido na determinação estrutural, várias simplificações tiveram que ser feitas, resultando, por exemplo, em tratamentos pouco realistas de interações eletrostáticas e de Van der Waals, o que pode levar as estruturas de RMN a possuírem alto número de sobreposições estericamente desfavoráveis entre diversos grupos e padrões de ligação de hidrogênio longe da situação ótima.

O refinamento pode ser feito considerando tanto o solvente de forma explícita (Linge *et al.*, 2003) e considerando a molécula no vácuo, porém com métodos mais eficientes de minimização de energia e de variação de posições atômicas, além do campo de força mais realista mencionado anteriormente (Schwieters *et al.*, 2003; Schwieters *et al.*, 2006). Ambas as metodologias consistem, em termos gerais, de dinâmica molecular, com restrições de posição

determinadas pela lista de restrições geométricas, e com variações de temperatura, a fim de minimizar a energia das estruturas.

1.5.3. Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido

Neste tópico serão mostradas algumas das possíveis utilizações da RMN em fase sólida para o estudo de peptídeos reconstituídos em bicamadas fosfolipídicas orientadas em relação ao campo magnético externo. Embora esta seção trate apenas de uma das metodologias de estudo usando a RMN, outras são relatadas na literatura para amostras pulverizadas, na forma cristalina, ou em bicamadas não orientadas.

Para amostras contendo o peptídeo e a bicamada fosfolipídica e orientadas em relação ao campo magnético do espectrômetro, a RMN em fase sólida tem sido utilizada para estudar e deduzir a orientação e topologia de biomacromoléculas. Para tanto são usados peptídeos marcados com ^{15}N e ^2H , quando possível, associados a bicamadas lipídicas (Cross, 1997; Munster *et al.*, 2002; Aisenbrey *et al.*, 2010).

Combinando resultados advindos de experimentos de RMN de ^{15}N e de ^2H , é possível obter informações sobre a orientação de peptídeos helicoidais em relação às membranas miméticas, isto é, sobre a topologia da interação peptídeo-membrana. Essa combinação propicia, assim, uma investigação mais completa relacionando parâmetros estruturais e topológicos de peptídeos, bem como de peptídeos associados às membranas, com seus mecanismos de ação biológica.

1.5.3.1 Fundamentação Teórica

A espectroscopia de RMN em fase sólida pode ser utilizada para identificar a disposição espacial adotada por peptídeos em amostras orientadas com respeito à direção do campo magnético. Esta técnica fornece informações valiosas em relação à dinâmica, ao ambiente eletrônico local, à natureza das ligações intra- e intermoleculares e à estrutura molecular (Bechinger *et al.*, 1999). A característica mais pronunciada dos espectros de RMN em fase sólida é frequentemente devida às contribuições anisotrópicas do deslocamento químico e das interações dipolares e quadrupolares (Laws *et al.*, 2002).

Os espectros de RMN em fase sólida mostram geralmente linhas largas devidas principalmente às interações dipolo-dipolo e tendem a exibir um alto grau de sinais sobrepostos (Duer, 2004). Novos métodos e técnicas estão sendo desenvolvidos para melhorar a resolução

espectral, tais como a utilização de marcadores isotópicos, espectroscopia de RMN multidimensional, desacoplamento de núcleos e outros métodos que são utilizados para seleccionar interações entre *spins* nucleares (Ketchum *et al.*, 1994).

O deslocamento químico em RMN no estado sólido é tratado matematicamente como um tensor, representado por um elipsóide como mostrado na Figura 1.21 a e b. O tensor é tratado em um sistema de eixos cartesianos de tal forma que ele possa ser descrito pelas três componentes (σ_{11} , σ_{22} e σ_{33}), conforme mostrado na Figura 1.21a, para o núcleo de ^{15}N relativamente ao eixo principal da estrutura helicoidal de um peptídeo. O deslocamento químico detectado pelo espectrômetro de RMN é denominado σ_{zz} , sendo definido como a projeção da componente tensorial σ_{33} no eixo do campo magnético externo \mathbf{B}_0 (Figura 1.21b). Definindo-se ângulos de Euler (Φ , Θ e Ψ) para descrever transformações do tensor deslocamento químico em outro sistema de coordenadas, pode-se chegar à relação angular de σ_{zz} com Φ e Θ , conforme mostrado na Equação 1.10.

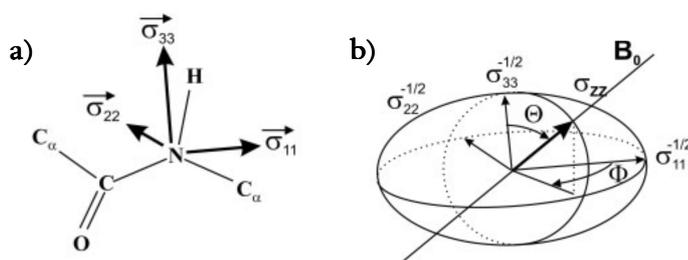


Figura 1.21. Representação do tensor de deslocamento químico de ^{15}N na cadeia peptídica (a) e na forma elipsoidal (b), mostrando os ângulos de Euler Φ e Θ entre as componentes tensoriais e o deslocamento químico detectado, σ_{zz} (Bechinger & Sizun, 2003).

$$\sigma_{zz} = \sigma_{11}\text{sen}^2\Theta\text{cos}^2\Phi + \sigma_{22}\text{sen}^2\Theta\text{sen}^2\Phi + \sigma_{33}\text{cos}^2\Theta \quad (\text{Eq 1.10})$$

Devido ao fato de a componente σ_{33} ser aproximadamente paralela ao eixo principal da hélice em estruturas α -helicoidais (REF), é possível, portanto, definir o ângulo Θ como sendo o ângulo formado entre o eixo principal da hélice e o campo magnético externo \mathbf{B}_0 . Para o caso de amostras em que a normal da bicamada fosfolipídica está alinhada paralelamente a \mathbf{B}_0 , pode-se afirmar, por extensão, que Θ refere-se ao ângulo entre o eixo principal da hélice e a normal da bicamada fosfolipídica presente na amostra. Devido a essa dependência entre a orientação do peptídeo e o deslocamento químico de ^{15}N , essa grandeza é um indicador sensível da orientação

do eixo da hélice com relação à bicamada lipídica, propiciando inferir informações de topologia da interação peptídeo-membrana (Bechinger & Seelig, 1991). Peptídeos α -helicoidais transmembrana exibem ressonância de ^{15}N com deslocamentos químicos maiores que 200 ppm (Fig. 1.22a), ao passo que peptídeos orientados paralelamente à superfície da bicamada fosfolipídica são caracterizados por deslocamentos químicos de 60 a 80 ppm (Figura 1.22b) (Aisenbrey & Bechinger, 2004).

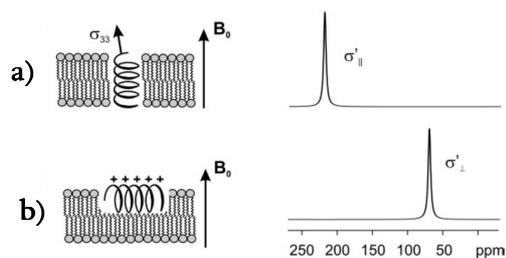


Figura 1.22. Representações do peptídeo α -helicoidal interagindo de forma transmembrana (a) e paralelamente à superfície da bicamada fosfolipídica (b) cuja normal coincide com o campo magnético externo B_0 . Para ambas as orientações do peptídeo são mostradas, à direita, os espectros de RMN de ^{15}N simulados (Bechinger & Sizun, 2003).

Enquanto resultados de anisotropia do deslocamento químico de ^{15}N fornecem informações a respeito da orientação do eixo principal da hélice em relação à bicamada fosfolipídica, a análise de espectros de RMN de ^2H relativos a amostras contendo o peptídeo com um resíduo de alanina, isotopicamente marcado com três átomos de deutério, na metila da cadeia lateral, permite a definição da orientação da ligação $C_{\alpha} - C_{\beta}$ da alanina em relação ao eixo principal da hélice. Isso é possível devido ao fato de o grupo metila possuir rápido movimento rotacional à temperatura ambiente, fazendo com que os núcleos de ^2H sejam quimicamente equivalentes e com que o tensor resultante seja coincidente com o vetor da ligação $C_{\alpha} - C_{\beta}$.

Em meios miméticos de membrana hidratados, o peptídeo helicoidal difunde em torno da normal da membrana, de forma que a ligação $C_{\alpha} - C_{\beta}$ mova-se descrevendo um cone de semi-ângulo φ relativamente a esta direção, sendo denominado ângulo polar de rotação interna. A grandeza medida em experimentos de RMN de ^2H para amostras com o peptídeo incorporado em bicamadas fosfolipídicas é o acoplamento quadrupolar de deutério ($\Delta\nu_Q$), que depende tanto do ângulo polar φ quanto do ângulo β que descreve a orientação da normal da bicamada em relação ao campo magnético B_0 , conforme mostrado na Equação 1.11,

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{(3 \cos^2 \varphi - 1)}{2} \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{2} \quad (\text{Eq. 1.11})$$

em que $e^2 q Q / h$ é a constante de acoplamento quadrupolar de deutério.

Os resultados obtidos por RMN de ^{15}N e ^2H são complementares entre si, sendo utilizados para descrever a orientação do peptídeo helicoidal em relação à bicamada fosfolipídica, através da determinação das variáveis Θ (Eq. 1.10, p. 41) e φ (Eq. 1.11). Uma descrição mais detalhada a respeito de como essa orientação é calculada é apresentada no item 2.2.8, p. 56.

1.5.4 Caracterização termodinâmica do processo de interação peptídeo/membrana por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) constitui-se em uma excelente técnica para caracterizar interações em solução, visto que é possível obter o perfil termodinâmico completo destas interações, mesmo sendo interações de afinidades baixas (Seelig, 1997; White *et al.*, 1998).

A análise do perfil das curvas calorimétricas e dos parâmetros termodinâmicos obtidos, combinada com as propriedades físico-químicas dos compostos e as características do processo de interação, permitem compreender como as espécies interagem.

Um passo importante na caracterização da interação peptídeo-membrana é conhecer a natureza e a magnitude das energias livres de interação, separá-las nas suas componentes entálpica (ΔH) e entrópica (ΔS), sendo possível também obter a espontaneidade destas interações (ΔG), o coeficiente estequiométrico da interação (n) e a constante de partição (K_p). Na calorimetria de titulação isotérmica, estes parâmetros termodinâmicos são obtidos a partir de dados experimentais combinados com modelos matemáticos.

Nos experimentos de titulação calorimétrica isotérmica, podem ser efetuados dois tipos de titulação, com razões molares peptídeo:lipídeo (P:L) distintas. No primeiro tipo, o lipossoma, com concentração elevada, é colocado na célula de titulação, sendo adicionadas quantidades fixas de peptídeo: A razão P:L permanece muito baixa, de modo a não ocorrer saturação da membrana pelo peptídeo. O peptídeo adicionado distribui-se entre a fase aquosa e lipídica de maneira semelhante no decorrer da titulação. O calor liberado ou absorvido em cada injeção é praticamente constante, visto que há excesso de lipídeo. Para obter a quantidade de calor (Q_{int})

relativa à interação peptídeo-lipídeo, deve-se subtrair o calor de diluição (Q_{dil}) do peptídeo e do lipídeo, obtidos em experiências independentes, do calor total Q_{inj} , conforme Equação 1.12 abaixo:

$$Q_{int} = Q_{inj} - Q_{dil} \quad (\text{Eq. 1.12})$$

A variação da entalpia experimental ou de interação ($\Delta_{exp}H$) do processo é a razão entre o calor Q_{int} da interação e o número de mols de peptídeo (n_{pep}) em cada injeção, conforme a Equação 1.13:

$$\Delta_{exp}H = \frac{Q_{int}}{n_{pep}} \quad (\text{Eq. 1.13})$$

No segundo tipo de titulação o peptídeo é colocado na célula e titulado com volumes fixos da suspensão de lipossomas. Verifica-se ao longo da titulação que a quantidade de calor envolvida se torna cada vez menor, dado que se relaciona com a quantidade de peptídeo ainda livre na célula após cada injeção de suspensão de lipossoma. A quantidade de peptídeo que interage com a membrana diminui a cada injeção e a diminuição da área dos picos da curva de titulação está relacionada com o processo de interação e inserção do peptídeo na membrana. No final da titulação verifica-se, por vezes, uma inversão no sinal do calor envolvido, indicando que todo o peptídeo interagiu com a membrana e que há um excesso de lipídeo. Assim, os últimos picos representam o calor de diluição da suspensão de lipossomas, nas condições finais do ensaio de titulação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Todas as pesagens para as sínteses foram feitas em balança analítica Metler (Barueri, Brasil), modelo AE166, com precisão de 0,0001.

Em todas as sínteses, foi utilizada a resina Rink-amide, da marca Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemanha) com grau de substituição de 0,63 mmol/g.

Os derivados de aminoácidos tendo Fmoc como grupo protetor da extremidade *N*-terminal foram adquiridos das marcas Iris Biotech GmbH, Novabiochem-Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

A lavagem da resina antes e depois das etapas de desproteção foi feita com dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM) e 2-propanol (IPA) alternadamente.

O DMF utilizado foi da marca SYNTH, sendo previamente purificado por destilação a pressão reduzida.

O DCM utilizado foi das marcas SYNTH (São Paulo, Brasil) e MERCK (Darmstadt, Alemanha).

O IPA utilizado foi da marca SYNTH.

Nas etapas de acoplamento, utilizaram-se como reagentes ativadores o 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), da marca Novabiochem-Merck, e a *N,N*-dimetilcarbodiimida (DIC), da marca Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para a solubilização desses reagentes foram DMF e DCM, respectivamente.

Para a desproteção dos grupos *N*-terminais antes de cada acoplamento, utilizou-se uma solução 20% v/v de 4-metil-piperidina (da marca Merck) em DMF.

Para uma avaliação qualitativa das reações de acoplamento e desproteção, foi utilizado o teste de Kaiser (Kaiser *et al.*, 1970), que emprega três soluções: KCN 0,01 M em piridina, fenol 0,8 M em etanol e ninhidrina 3 mM em piridina, adicionadas em pequenos volumes, na proporção

1:2:1, respectivamente, e, em seguida, aquecia-se o sistema a cerca de 100°C por aproximadamente 4 min.

Para a clivagem dos peptídeos da resina e remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, utilizou-se como reagente o triisopropilsilano (TIS), da marca Iris Biotech solubilizado em uma solução composta por ácido trifluoroacético (TFA) e água, na proporção de aproximadamente 19:1 (v:v).

A purificação dos produtos de síntese foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método de identificação de substâncias utilizado foi detecção por ultravioleta na faixa 210-215 nm. A purificação foi realizada em escala semipreparativa, enquanto que a escala analítica foi utilizada para se obter perfis iniciais da amostra.

Para a cromatografia líquida, utilizou-se um cromatógrafo Varian (Santa Clara, Estados Unidos), modelo ProStar 210, com detector na região do ultravioleta do modelo ProStar 330 e uma válvula de injeção da marca IDEX-Rheodyne (Oak Harbour, Estados Unidos)

A coluna analítica utilizada foi uma Microsorb 100-5 C18 250×4,6 mm e a coluna semipreparativa utilizada foi uma Dynamax 100-5 C18 250×10 mm, acompanhadas, respectivamente, de *loops* de 5 μ L e 250 μ L.

Para as fases móveis da CLAE foram utilizadas soluções de 0,1% v/v de TFA, em água MILLI-Q, e de 0,08% v/v de TFA, em acetonitrila, para compor os gradientes utilizados.

A água em nível de pureza Milli-Q foi obtida em aparelho QPAK, da marca Millipore-Merck (Billerica, Estados Unidos).

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos em um aparelho JASCO modelo J-810 (Easton, Estados Unidos), com um sistema de controle acoplado de temperatura da marca Peltier Jasco modelo PFD-425S.

Os fosfolípidos utilizados nos experimentos de calorimetria (ITC) e de dicroísmo circular, com grau de pureza de 99%, foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Estados Unidos). Para a preparação dos lipossomas foram utilizados 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicina (POPG) e uma mistura 3:1 (mol:mol) destes fosfolípidos.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN), no Centro de Ciências da Saúde da UFRJ em um equipamento Bruker modelo *AVANCE III*, operando a uma frequência de 800,13 MHz para hidrogênio. Como solvente, foram utilizadas soluções de 2,2,2-trifluoretol- d_2 (TFE) em água Milli-Q, sem a presença de tampão e soluções aquosas com a presença de micelas de dodecilsulfocolina (DPC) na concentração de 10 mM. Para a aquisição dos espectros, utilizou-se uma solução de 4 mM de cada peptídeo e o volume utilizado dessa solução foi de aproximadamente 0,5 mL. O padrão utilizado para referência interna foi o 2,2-dimetil-2-isopentano-5-sulfonato de sódio (DSS) (Aldrich) para os espectros de ^1H e de ^{13}C .

Para os peptídeos estudados, foram realizados experimentos de TOCSY, utilizando-se a sequência de pulsos MLEV, NOESY e $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC editado, apenas para a distinctina e fenilseptinas.

O tempo de mistura para a aquisição do mapa de contornos 2D $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY foi de 120 ms. O experimento de TOCSY teve um tempo de mistura de 80 ms.

Os espectros de RMN em fase sólida foram obtidos na Universidade de Strasbourg, no Laboratório de RMN e Biofísica de Membranas, nos equipamentos Bruker *AVANCE 400 wide-bore* (para ^{31}P e ^{15}N) e Bruker *AVANCE 300 wide-bore* (para ^2H).

2.2 Métodos

2.2.1. Procedimento Geral

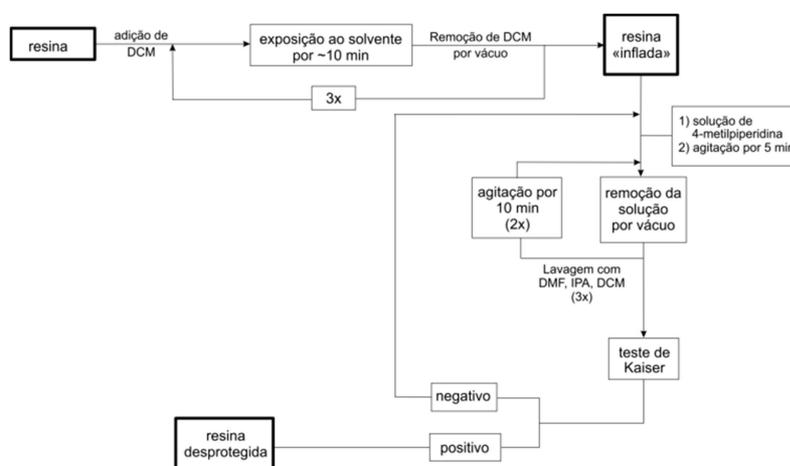
Todos os peptídeos estudados foram sintetizados em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc (Chan, 2000), iniciando-se do resíduo de aminoácido *C*-terminal em direção à extremidade *N*-terminal, de forma a serem obtidas cadeias com as extremidades *C*-terminais amidadas. As sínteses foram realizadas em seringas com filtro sinterizado acoplado à região interna próxima a sua ponta.

2.2.1.1. Preparação da Resina

O primeiro procedimento da síntese envolveu a preparação da resina. Isto foi feito primeiramente colocando-se a resina (Rink-amide, 0,63 mmol/g) seca no recipiente em que a reação ocorreu. Em seguida, verteu-se sobre a resina um pequeno volume de DCM, o suficiente para que ela fosse totalmente coberta pelo solvente. A resina ficou em contato com o DCM por cerca de 10 min. Ao fim desse período, removeu-se o solvente por sucção a vácuo e o processo foi repetido por mais três vezes. Essa etapa é importante, pois o DCM aumenta o volume de contato da resina, o que facilita o acoplamento dos aminoácidos.

2.2.1.2. Desproteção da Resina

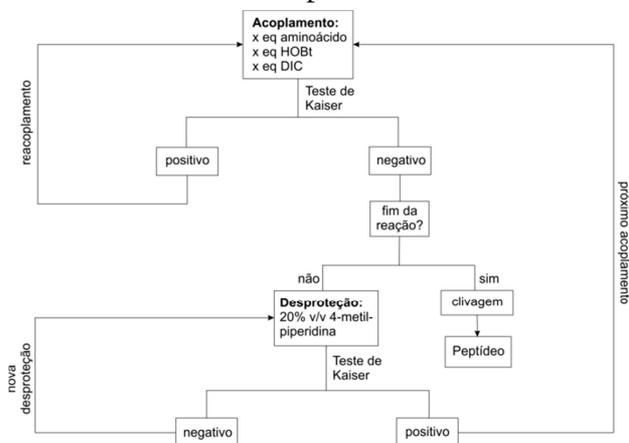
Após o preparo acima descrito, procedeu-se à desproteção da resina. Assim como os derivados de aminoácidos, resinas que originam peptídeos amidados na extremidade *C*-terminal encontram-se protegidas pelo grupo Fmoc. A remoção desse grupo foi feita utilizando-se uma solução de 4-metil-piperidina em *N,N*-dimetilformamida (DMF), na concentração 20% v/v. Esta solução para a desproteção foi adicionada ao recipiente de reação, a um volume suficiente para cobrir toda a resina. Submeteu-se a seringa à agitação moderada, duas vezes durante 15 min e, em seguida, removeu-se a solução de 4-metil-piperidina por sucção a vácuo. Este procedimento deve garantir a desproteção de toda a resina, para que não haja diminuição do rendimento final da reação. Em seguida, lavou-se a resina com DMF, 2-propanol (IPA) e DCM, nesta ordem e alternadamente, por três vezes. Por fim realizou-se o teste de Kaiser para averiguar a desproteção da resina. Nesse caso, o teste deve ser positivo, ou seja, os grãos da resina devem estar bem azuis. Esse procedimento de preparo da resina encontra-se resumido no Esquema 2.1.



Esquema 2.1. Preparação da resina amidada, com grupo protetor Fmoc, para a síntese de peptídeos.

2.2.1.3. Síntese dos peptídeos

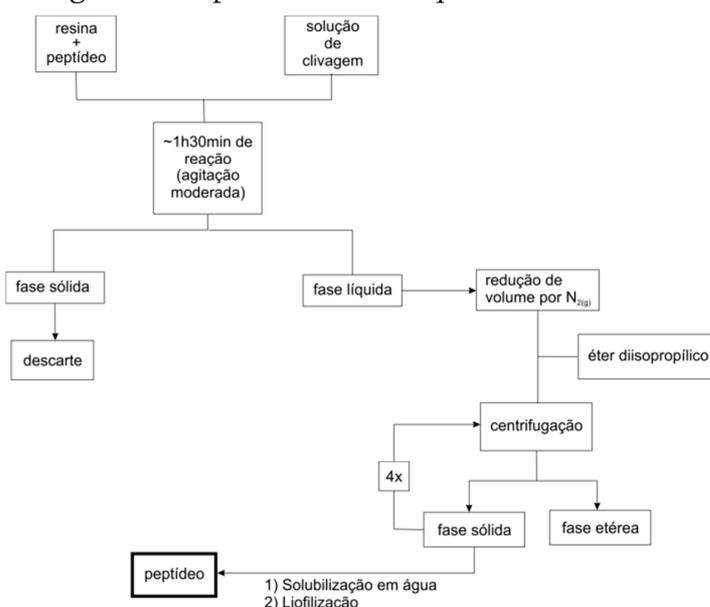
Feita a preparação da resina, deu-se início à síntese propriamente dita, que consiste em acoplamentos consecutivos dos derivados de aminoácido à resina. A cada acoplamento, verteu-se sobre a resina desprotegida uma solução contendo o derivado de aminoácido (Fmoc-aminoácido) e as substâncias ativadoras dissolvidos em DCM e DMF na proporção 1:1 (v:v). Para as duas cadeias, utilizaram-se como ativadores 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) e N,N' -diisopropilcarbodiimida (DIC), que foram misturados a cada derivado de aminoácido a ser acoplado nas mesmas quantidades de equivalente molar. O recipiente de síntese foi então submetido à agitação moderada durante todo o tempo de reação. Ao final, realizaram-se quatro lavagens com DMF, IPA e DCM intercaladas, tal qual a lavagem feita na etapa de preparação da resina e, em seguida, o teste de Kaiser que, após a reação de acoplamento, deve apresentar resultados negativos, ou seja, os grãos da resina devem ser claros, em suas cores originais. Se o resultado for negativo, submete-se o sistema à desproteção do grupo amino do último resíduo acoplado. Caso contrário, deve-se repetir a reação de acoplamento até que o teste seja negativo. A desproteção foi feita utilizando-se uma solução 20% v/v de 4-metilpiperidina adicionada sobre a resina, a um volume suficiente para cobri-la completamente. O sistema foi, em seguida, submetido à agitação moderada. Em geral, a desproteção é realizada em duas etapas de 12 min cada, sendo que a solução para a desproteção é retirada do frasco entre as duas etapas. Novamente, realizou-se o teste de Kaiser e, em seguida, acoplou-se o próximo derivado de aminoácido. As etapas desse procedimento repetiram-se até que todos os resíduos de aminoácido fossem acoplados. Ao fim da síntese, a resina (com a cadeia peptídica ligada a ela) é submetida à clivagem e desproteção dos grupos protetores permanentes, liberando, então, o peptídeo amidado na extremidade *C*-terminal. Este protocolo é ilustrado no Esquema 2.2.



Esquema 2.2. Organograma do protocolo utilizado nas sínteses dos peptídeos. Acopla-se um derivado de aminoácido e após o acoplamento tem-se um resíduo de aminoácido.

2.2.1.4. Clivagem dos peptídeos

Todos os peptídeos foram clivados com solução de 95,0% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de água deionizada (grau Milli-Q) e 2,5% de triisopropilsilano (TIS), seguindo-se o protocolo padrão de clivagem da estratégia de síntese *Fmoc* (Chan, 2000). Para se realizar a clivagem, utilizou-se um volume dessa solução de 10 a 25 mL/g de peptidil-resina. Adiciona-se esse volume ao frasco em que se encontrava a resina a ser clivada e manteve-se o frasco sob agitação moderada durante o tempo de reação, que é, em geral, de 1,5h a 3 h. Ao final, o peptídeo encontra-se solubilizado nessa solução de clivagem juntamente com os produtos de reação entre os grupos protetores das cadeias laterais e os nucleófilos sequestradores de carbocátions e não mais ligado à resina. Separou-se, então, a fase líquida da resina, transferindo-a para um tubo Falcon e submetendo-a a ação de nitrogênio gasoso para evaporar o TFA, de forma a restar, na fase líquida, basicamente água, o peptídeo e os demais produtos secundários. Considera-se que se chegou a esta condição quando o volume da solução de clivagem não mais se reduzir. Foi então adicionado ao tubo certo volume (aproximadamente 10 mL) de éter diisopropílico previamente resfriado em banho de gelo. O sistema é centrifugado e as fases sólida e líquida são separadas. Novamente, adicionou-se o éter diisopropílico ao sólido restante e, mais uma vez, centrifuga-se a amostra e separou-se o líquido do sólido, repetindo-se este passo por pelo menos mais três vezes. Quando o sólido estava bem compactado, ele foi dissolvido em água deionizada e a amostra foi, por fim, liofilizada, para o produto ser caracterizado e purificado. O procedimento de clivagem está representado no Esquema 2.3.



Esquema 2.3 Representação do protocolo da reação de clivagem dos peptídeos

2.2.2. Síntese das fenilseptinas e da Hilaseptina P2

As fenilseptinas (L-Phes e D-Phes) e Hilaseptina P2 (HSP2), cujas sequências encontram-se na Tabela 2.1, foram sintetizadas utilizando-se 143,6 mg de resina da marca Rink-amide, com grau de substituição 0,63 mmol/g, para obter cerca de 150 mg de peptídeo bruto ao final da síntese. Utilizou-se, para todos os reagentes envolvidos nas sínteses, uma quantidade de quatro equivalentes molares em relação à quantidade esperada do produto final. Como ativadores foram utilizados, para cada acoplamento, 55,4 mg de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) anidro e 57 μL de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC). Foram utilizados ainda derivados de aminoácidos com as cadeias laterais protegidas quando necessário. Para os experimentos de RMN no estado sólido, foram sintetizados peptídeos marcados isotopicamente em determinados sítios, sendo que, para L-Phes e D-Phes, os resíduos marcados foram L-9 (^{15}N) e A-10 ($^2\text{H}_3$) e, para HSP2, os resíduos A-16 ($\text{C-}^2\text{H}_3$) e L-18 (^{15}N), conforme mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Sequências dos peptídeos estudados, em que L-F e D-F representam, respectivamente, os resíduos de aminoácido fenilalanina com os estereoisômeros *L* e *D* do resíduo de fenilalanina, e o grupo $-\text{NH}_2$ ao final das sequências indicam a amidação da extremidade *C*-terminal. A letra H indica a extremidade amino-terminal não modificada. Os resíduos em negritos representam os aminoácidos marcados com ^{15}N e os sublinhados, os com o grupo metila deuterado

Nome	Sequência Peptídica
L-Phes	H-F(L-F)FDTLK N <u>L</u> AGKVIGALT-NH ₂
D-Phes	H-F(D-F)FDTLK N <u>L</u> AGKVIGALT-NH ₂
HSP2	H-GIGDILK N LAKAAGK <u>A</u> ALHAVGESL-NH ₂

As condições de reação foram as mesmas para todos os acoplamentos, variando-se somente o derivado de aminoácido utilizado em cada etapa. O tempo de reação para o primeiro acoplamento de cada síntese foi de 3,5 h e, para os demais acoplamentos, foi de cerca de 1,5 h. Após o término das sínteses, deu-se início à etapa de clivagem e desproteção dos grupos protetores permanentes. As clivagens foram realizadas utilizando-se a solução descrita anteriormente.

2.2.3. Reação de Formação da Distinctina

O peptídeo heterodimérico distinctina foi sintetizado por meio da reação de condensação por formação de ligação dissulfeto entre as Cadeias 1 e 2, previamente sintetizadas por meio de síntese em fase sólida, pela estratégia Fmoc. A dimerização deu-se por oxidação ao ar, incubando-se as cadeias, previamente purificadas, a uma concentração de 5 mg/mL cada, em uma solução aerada, tamponada por 10 mM de bicarbonato de amônio, a pH 8,3. A solução foi agitada por 24 h à temperatura ambiente e, em seguida, neutralizada com ácido acético diluído.

A formação do produto foi acompanhada por CLAE, injetando-se alíquotas do meio reagente no aparelho, durante certos intervalos de tempo. Para o acompanhamento da reação, utilizou-se o gradiente descrito na Tabela 2.2, em que as Cadeias 1 e 2 apresentam, respectivamente, tempos de retenção de 20,0 min e 20,7 min. Foi monitorado o aparecimento de um pico a 22,2 min (produto de dimerização) e o aumento de sua intensidade com o passar do tempo, acompanhado da diminuição de intensidade dos picos relativos às Cadeias 1 e 2.

A fração relativa a esse tempo de retenção foi coletada em uma coluna semipreparativa de fase reversa, do tipo C-18 (Grace Vydac® 218TP54). Essa fração foi liofilizada e analisada por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF UltraFlex III, Bruker Daltonics.

Tabela 2.2. Gradiente utilizado para o acompanhamento cinético da reação de dimerização da distinctina. O fluxo para este gradiente foi de 1,0 mL/min

<i>Tempo (min)</i>	<i>TFA, 0,1% em água (%)</i>	<i>TFA, 0,08% em água (%)</i>
0	100	0
15	60	40
55	40	60
60	0	100
65	0	100

2.2.4. Preparação de Vesículas para Experimentos de Dicroísmo Circular (CD)

As vesículas dos fosfolípidos 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicina (POPG) para os experimentos de CD foram preparadas dissolvendo-se a quantidade apropriada dessas substâncias em DCM, misturando-se as soluções resultantes até apresentarem aspecto homogêneo. O filme lipídico foi preparado durante a remoção do solvente à pressão reduzida. O solvente residual foi removido por sucção a vácuo por aproximadamente 1 h e os filmes foram, em seguida, hidratados com água.

Vesículas unilamelares grandes foram preparadas submetendo-se a suspensão a oito ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, seguidos por aquecimento em água a 27 °C. A suspensão resultante foi, então, submetida a um processo de extrusão, por 10 vezes, através de duas membranas de policarbonato de 100 nm.

2.2.5. Experimentos de Dicroísmo Circular

Os experimentos de CD foram adquiridos na presença de POPC:POPG 3:1 (mol:mol) e TFE para as Cadeias 1 e 2 da distinctina, em um espectropolarímetro Jasco-715, utilizando-se uma cubeta retangular de quartzo, de caminho ótico de 1,0 mm em água deionizada. Todos os espectros foram adquiridos na faixa de 260 a 190 nm, utilizando-se uma largura de banda de 5,0 nm para os experimentos com vesículas e 2,0 nm para os experimentos com TFE, com resolução de 0,2 nm, 100 nm/min de velocidade e 4 s de tempo de resposta. Medidas de linha de base foram realizadas em todos os dias de experimento para averiguar a estabilidade do instrumento. Todos os espectros obtidos constituem uma média de cinco leituras, com o branco (linha de base do aparelho e dos solventes e vesículas utilizados) subtraído.

Para os experimentos, prepararam-se soluções estoque de concentrações 480 μ M para as Cadeias 1 e 2 e 430 μ M para a distinctina, bem como para a mistura de vesículas de fosfolípidos (1 mM). As concentrações dos peptídeos foram de, aproximadamente, 30-40 μ M, com os valores exatos calculados por medidas de absorção em três diferentes comprimentos de onda (205, 209 e

220 nm). Vários espectros foram adquiridos pela adição em pequenos volumes, da solução de lipídeos à solução dos peptídeos.

A desconvolução tanto dos experimentos em TFE quanto dos experimentos em vesículas, foi conduzida pelo programa CDPro (Sreerama & Woody, 2004) a fim de estimar o percentual de estruturas secundárias em cada meio.

2.2.6. Processamento e Análise de Experimentos de RMN em Solução

A conversão e processamento dos dados de RMN foram feitos pelo programa NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995). A interpretação dos mapas de contorno foi efetuada no programa NMRView 5.0 (Johnson, 1994). Todos os programas e algoritmos utilizados nesta etapa foram criados para serem executados em plataforma Linux, e foram executados na distribuição Fedora, versões 9, 10 e 11.

As restrições de distância foram obtidas diretamente por meio dos sinais de NOE. Os volumes desses sinais foram determinados por integração, utilizando-se a metodologia de calibração proposta por Güntert e colaboradores (Güntert *et al.*, 1991). Essa etapa foi efetuada pelo programa NMRView 5.0, sendo que os sinais relativos a grupos metila tiveram suas intensidades divididas por três.

As restrições angulares foram obtidas pelo programa TALOS+ (Shen, Delaglio *et al.*, 2009), por meio da análise dos valores de deslocamento químico dos átomos da cadeia principal C_{α} , H_{α} , C_{β} , N, H_N e C' , em relação a um banco de dados de deslocamentos químicos desses átomos em estruturas de proteínas determinadas em alta resolução.

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.*, 2003) e o algoritmo de arrefecimento simulado (*simulated annealing*) em coordenadas cartesianas *sa_new.inp* para a distinctina, e o algoritmo de arrefecimento simulado em espaço de ângulos de torção *nmr_torsion.inp* (Rice & Brunger, 1994; Stein *et al.*, 1997). Utilizou-se uma estrutura de partida randômica gerada pelo algoritmo *generate_input* e com uma topologia *protein.top* e parametrizações *protein.par*, que levava em conta a terminação amidada da extremidade C-terminal de ambas as cadeias.

Os cálculos de arrefecimento simulado tiveram como parâmetros temperatura inicial de 1000 K, número total de etapas (*steps*) a altas temperaturas igual a 14.000, número total de etapas durante cada resfriamento igual a 6.000. O resfriamento simulado foi feito de 50 em 50 K até que se chegasse a uma temperatura de 100 K. O cálculo foi realizado em três etapas principais: uma levando em conta valores de limite de violação de restrições de distância e angulares de 0,5 Å e 5°, respectivamente, a etapa seguinte considerando um valor de 0,3 Å e 3° para esses limites e uma etapa final, considerando limites de violação de 0,1 Å e 1°. Considerou-se o cálculo concluído somente quando as vinte estruturas mais estáveis não apresentaram mais violações sistemáticas em nenhum dos limites estipulados.

Para análise dos conjuntos de restrições geométricas, utilizou-se o programa QUEEN (Nabuurs *et al.*, 2003), concomitantemente à inspeção visual das violações das restrições geométricas.

Todos os cálculos estruturais foram realizados para serem geradas 200 estruturas. Deste número, foram selecionadas as 20 estruturas de menor energia total e, por meio dos programas MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996), elas foram agrupadas de modo a se obter a melhor sobreposição das estruturas. Dessas estruturas sobrepostas, foi obtido o valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*, desvio quadrático médio) para parte da validação do cálculo.

A validação e análises estruturais foram feitas através da página *iCing* (<http://nmr.cmbi.ru.nl/icing/iCing.html#file>), utilizando-se as metodologias dos programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996) e WHAT IF (Vriend, 1990), bem como os critérios de classificação do programa *CING* (*Common Interface for NMR Structure Generation*).

2.2.7. Preparação das amostras para RMN no estado sólido

Para os estudos de RMN em estado sólido, foram utilizadas amostras dos peptídeos orientados em bicamada lipídica de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolipídica (POPC), cada amostra contendo diferentes proporções de peptídeo e fosfolipídeo, conforme mostrado na Tabela 2.3 (p. 56).

Tabela 2.3. Relação das massas de peptídeo e fosfolípídeo (POPC) utilizadas nas amostras de RMN no estado sólido, com suas respectivas porcentagens molares

Peptídeo	Massa de peptídeo	Massa de POPC	Porcentagem molar do peptídeo em POPC
L-Phes	12 mg	151 mg	3%
D-Phes	11 mg	138 mg	3%
HSP2	12 mg	122 mg	3%

Inicialmente, dissolveu-se o peptídeo em cerca de 2 mL de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e mediu-se o pH utilizando papéis indicadores. Para isso, distribuiu-se uma pequena quantidade da solução alcoólica resultante sobre o papel e, após a evaporação do solvente, o papel foi umedecido com água desionizada para determinar o pH do sistema em meios com alto grau de hidratação. O pH foi então ajustado a pH7 com volumes mínimos de soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 1 mol/L. Em seguida, na mesma solução, dissolveu-se a quantidade pesada de POPC e a solução resultante foi submetida a um fluxo brando de nitrogênio gasoso até que o sistema se tornasse ligeiramente viscoso. Em seguida, distribuíram-se volumes aproximadamente iguais da mistura de peptídeo e fosfolípídeo sobre 15 a 25 placas de vidro ultrafinas (8 × 22 mm², Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha) e submeteram-se as amostras a pressão reduzida por uma noite para retirar todo o TFE presente. As amostras foram então transferidas para uma câmara de hidratação com umidade relativa de 93% e deixadas a hidratar por cerca de sete dias. Por fim, as placas de vidros foram empilhadas e seladas com fita teflon e plástico.

2.2.8. Experimentos de RMN no estado sólido

Experimentos de RMN de ³¹P desacoplados de hidrogênio das amostras de bicamadas lipídicas orientadas foram realizados a 162 MHz em um espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore*, utilizando-se uma sonda comercial estática de ressonância dupla para RMN no estado sólido. Medidas foram efetuadas para a orientação da normal da membrana paralela ao campo magnético externo. Uma sequência de pulsos de eco de Hahn foi empregada. Os seguintes parâmetros foram utilizados: janela espectral de 75 kHz, tempo de aquisição de 13,6 ms, 2.048 pontos, pulsos de 90° com largura de 2,5 μs, intervalo de tempo de eco de 40 μs, intervalo de

tempo de espera de 5 s e 64 transientes. Uma solução de ácido fosfórico a 85% (em volume) foi utilizada como referência externa (0 ppm).

Experimentos de RMN de ^{15}N desacoplados de hidrogênio foram adquiridos a 40 MHz em um espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore*, utilizando-se uma sonda comercial *E-free* de ressonância dupla para RMN no estado sólido. Medidas foram conduzidas para orientação normal da membrana paralela ao campo magnético externo. Os seguintes parâmetros foram empregados: pulsos de 90° com largura de 8 μs , tempo de chaveamento de campo de 700 μs , intervalo de tempo de espera de 3,5 s, 512 pontos de domínio de tempo, 18.000 aquisições e janela espectral de 33 kHz. Utilizou-se como referência externa uma amostra de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ em cujo espectro há um sinal em 41,5 ppm.

Espectros de RMN de ^2H em fase sólida foram obtidos no espectrômetro Bruker AMX400 *wide-bore* (peptídeo L-Phes), e em um espectrômetro Bruker Avance 300 *wide-bore* (demais peptídeos) utilizando-se uma sonda estática comercial de ressonância tripla. Medidas foram realizadas para orientação da normal da membrana paralela ao campo magnético externo. Utilizou-se uma sequência de eco quadrupolar com os seguintes parâmetros: ^2H B1 de 50 kHz, tempo de eco de 40 μs , janela espectral de 100 kHz, 4.096 pontos, 80.000 transientes e intervalo de tempo de repetição de 1 s. Os espectros foram calibrados com relação à $^2\text{H}_2\text{O}$ no valor de 0 ppm, e a sequência de eco foi averiguada pelo formato do espectro de uma amostra de *plexiglass* deuterado. Funções exponenciais de apodização correspondentes a um alargamento de linha de 300 Hz foram aplicadas antes da transformada de Fourier.

2.2.9. Simulação de parâmetros da RMN em fase sólida e determinação da orientação dos peptídeos em bicamadas lipídicas

Os possíveis alinhamentos dos peptídeos foram calculados usando-se o programa Mathematica (Wolfram Research, Inc.) e as estruturas PDB dos peptídeos foram orientadas de acordo com as relações angulares calculadas, utilizando-se o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, V. 0.99, Schrödinger, LCC). Para a orientação das estruturas, primeiro alinhou-se o vetor da hélice do peptídeo com o eixo z , e, em seguida, realizaram-se as rotações referentes ao ângulo polar de rotação interna e ao ângulo de inclinação (Figura 2.1), nesta ordem.

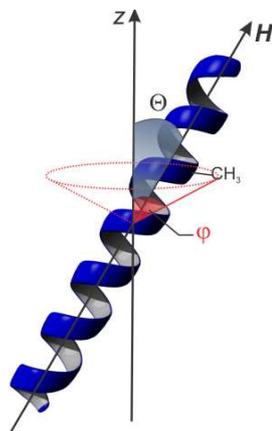


Figura 2.1. Representação de um peptídeo α -helicoidal, com a representação do eixo z (coincidente com a normal da membrana) e do vetor H , definido como eixo principal da hélice. O ângulo Θ , ângulo de inclinação, é definido pela orientação de H em relação a z , e φ , ângulo polar de rotação interna, é o semi-ângulo do cone formado pela rotação da ligação $C_{\alpha} - C_{\beta}$ em torno da normal da bicamada fosfolipídica.

2.2.10 Preparação de Lipossomas para Experimentos de Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC)

Para a preparação dos lipossomas, foram utilizados uma mistura de POPC e POPG 3:1 (mol:mol) destes fosfolídeos. As membranas miméticas (lipossomas) foram preparadas sob a forma de vesículas unilamelares de diâmetro aproximadamente 100 nm. A preparação destes lipossomas envolveu quatro fases distintas.

2.2.10.1. Obtenção do filme lipídico

A quantidade de fosfolídeo utilizada foi calculada de modo a fornecer a concentração de 35 mM. O fosfolídeo foi dissolvido em clorofórmio e o excesso de solvente foi eliminado com um fluxo brando de N_2 gasoso. O filme lipídico obtido após eliminação do excesso de solvente foi mantido sob pressão reduzida, em rotavapor, a 30 °C, durante 3h, para completa secagem.

2.2.10.2. Hidratação do filme lipídico

O filme seco foi hidratado com solução de tampão Tris-HCl, de pH 7,6 e aquecido em banho de água termostaticado durante 1h, a 30 °C. O aquecimento da suspensão lipídica foi

alternado com a agitação em vortex para assegurar o descolamento total do filme das paredes do balão, obtendo-se nesta fase vesículas multilamelares (MLVs).

2.2.10.3. Ciclos de aquecimento/congelamento (“Freeze/Taw”)

A suspensão de fosfolídeos foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL e as vesículas multilamelares (MLVs) foram submetidas a cinco ciclos de congelamento-descongelamento (*‘freeze-taw’*): mergulhou-se o tubo em nitrogênio líquido para congelamento muito rápido da suspensão e, em seguida, no banho de água termostaticado à temperatura referida até o completo descongelamento.

2.2.10.4. Extrusão

Após os ciclos de congelamento-descongelamento, a suspensão foi submetida várias vezes, a 30 °C, por um extrusor termostaticado (Figura 2.2), equipado com membranas de policarbonato (Nucleopore, Pleasanton, CA, Estados Unidos) com poros de diâmetros decrescentes. A extrusão foi efetuada sob pressão com N₂, cinco vezes com cada uma das membranas de 400 nm e 200 nm, sob pressão de 4 e 8 atm de N₂, respectivamente, e dez vezes pela membrana de 100 nm, sob pressão de 12 atm de N₂, para obtenção das vesículas unilamelares grandes (LUVs).



Figura 2.2. Extrusor com capacidade para 10 mL (Lipex Biomembranes, Vancouver, BC, Canadá), podendo ser operado em uma faixa larga de temperatura por ligação a um banho de água termostaticado circulante. A pressão N₂ (g) permite a passagem rápida da amostra através da membrana de policarbonato

A suspensão de lipossomas foi mantida sob refrigeração a 4 °C até a sua utilização, por um período nunca superior a 12 h. As suspensões preparadas foram sempre usadas no período de cinco dias após preparação, para não comprometer a integridade e tamanho médio das vesículas. A concentração foi determinada para cada preparação, pelo método de Bartlett, também conhecido como método do fosfomolibdato (New, 1990). A distribuição de tamanhos das vesículas unilamelares grandes (LUVs) obtidas após extrusão foi determinada por espalhamento de luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering* – DLS).

2.2.11. Calorimetria de Titulação Isotérmica

As experiências de titulação calorimétrica isotérmica foram efetuadas no calorímetro VP-ITC da Microcal-GE Healthcare (Piscataway, Estados Unidos). Para efetuar a caracterização termodinâmica dos sistemas membranas modelo/peptídeos, foram feitos dois tipos de ensaios de ITC:

Em um tipo, a suspensão de lipossomas de concentração elevada é colocada na célula calorimétrica, sendo titulada com a solução do peptídeo. Neste ensaio, a razão peptídeo/lipossoma é muito baixa, não ocorrendo assim saturação nem alterações significativas da morfologia da membrana. A quantidade de calor envolvida é constante em todas as injeções (praticamente todo o peptídeo titulado particiona para a membrana) e a entalpia média da interação ($\Delta_{int}H$) pode ser calculada pela área média dos picos observados, dividida pelo número de mol de peptídeo por injeção.

No outro tipo de ensaio, a solução do peptídeo é colocada na célula calorimétrica em concentração baixa e pequenos volumes da solução do lipossoma são injetados. A concentração de lipossoma varia significativamente ao longo da titulação, observando-se diminuição progressiva da área de pico com a diminuição da quantidade de peptídeo disponível para a partição. A partir deste tipo de experiência podem ser construídas curvas de interação para obter simultaneamente a constante de partição, K_p e a variação de entalpia da interação ($\Delta_{int}H$).

A entalpia de diluição deve ser medida em ensaios independentes, em que a solução de peptídeo (ou solução de lipossoma) é titulada em tampão, nas mesmas condições das experiências anteriores com o respectivo titulante. Esta entalpia, se não for desprezível, deve ser

comparada com a obtida nas injeções finais da titulação ou, até com a obtida por ajuste, para testar a validade dos efeitos interação/diluição, subjacente à correção com entalpia de diluição determinada em ensaios independentes. Após subtração do calor de diluição obtêm-se as entalpias de interação, que são analisadas por modelos termodinâmicos de interação adequados aos sistemas estudados.

2.2.11.1. Titulações efetuadas no calorímetro VP-ITC

No calorímetro VP-ITC mostrado na figura 2.3 (p. 62) foram efetuadas as titulações de lipossomas de POPC:POPG (3:1, mol:mol), com o peptídeo HSP2. Nas experiências de titulação isotérmica com este calorímetro, foi seguido o protocolo descrito a seguir, para assegurar uma boa precisão e exatidão nos resultados:

As amostras para serem colocadas na célula e na seringa foram desgaseificadas num aparelho Microcal apropriado (Figura 2.3, p. 62). A primeira injeção foi de 3 μL , um volume menor do que o das injeções subsequentes, porque o sistema automático de enchimento da seringa causa imprecisão no volume da primeira injeção e, além disso, há difusão durante o período de estabilização antes do início da titulação. Esta injeção não é considerada na avaliação dos resultados calorimétricos, embora a quantidade de soluto injetado o seja.

A célula de referência continha solvente idêntico ao da célula de amostra. A concentração da amostra do titulante a ser usada depende das características do processo em estudo. Como regra de partida, pode considerar-se que ela deve ser de 10 a 30 vezes maior que a concentração do titulado para garantir a cobertura de todo o processo.

Os parâmetros experimentais são inseridos no programa VPViewer que faz aquisição dos dados e o controle da operação do aparelho. O programa Origin-ITC (Microcal-GE Healthcare, Piscataway, Estados Unidos) foi usado para o tratamento inicial dos resultados, fornecendo a área integrada e a variação de entalpia observada, por mol de titulante (ou titulado, à escolha do operador), assim como as concentrações de titulante e titulado na célula, após cada injeção. Com estes resultados, foi feito o ajuste de curvas que descrevam o processo em estudo, com vista à obtenção dos parâmetros termodinâmicos que o caracterizam.

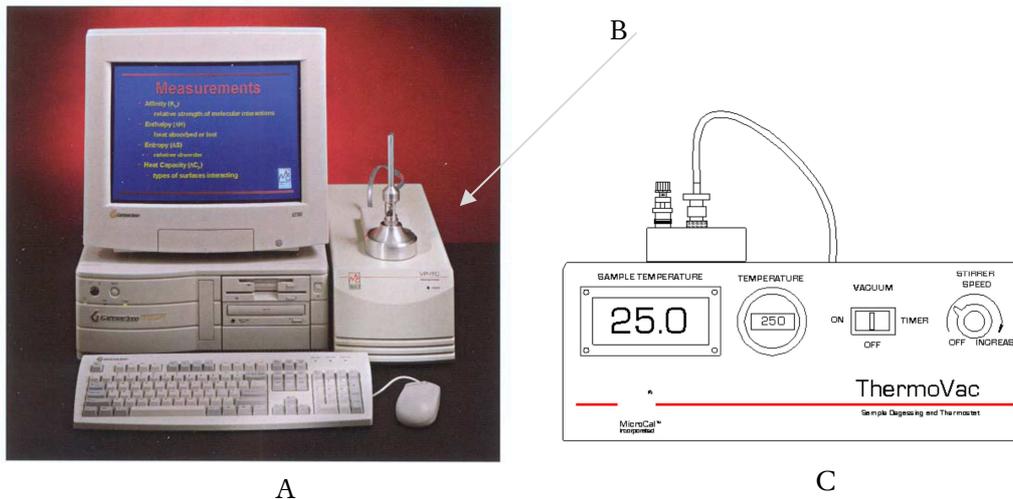


Figura 2.3. (A) Computador usado no controle da experiência de titulação e para a aquisição de dados. (B) Calorímetro VP-ITC com seringa giratória. (C) perspectiva do aparelho com bomba a vácuo, agitação e controle de temperatura para desgaseificação das amostras.

As experiências de calorimetria de titulação isotérmica foram conduzidas com os lipossomas na seringa em concentrações de 30-35 mM e os peptídeos na célula, com concentrações de 340 μM a 2 mM. O número de injeções variou entre 10 e 50 e os volumes de injeções variaram entre 5 a 27 μL . O volume efetivo da célula do calorímetro usado é de 1,4244 mL. Os ensaios de titulação experiências foram efetuados a 25 e 35 $^{\circ}\text{C}$.

A constante de partição (K_p) e a respectiva variação de entalpia para o processo de interação peptídeo/membrana foram obtidas usando um modelo de partição simples (p. 136).

3. Resultados e Discussão

3.1. Síntese em Fase Sólida dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes

3.1.1. Síntese da Distinctina

A distinctina foi sintetizada em duas etapas, a primeira constituiu-se na síntese em fase sólida das duas cadeias (estrutura primária representada na Tabela 3.1, utilizando-se a estratégia Fmoc. A uma segunda constituiu-se na reação de formação da ligação dissulfeto entre os resíduos C19, da Cadeia 1, e C45, da Cadeia 2.

Tabela 3.1. Sequência dos monômeros Cadeias 1 e 2 da distinctina

Monômero	Sequência Peptídica
Cadeia 1	H-ENREVPFGFTALIKTLRKCKII-NH ₂
Cadeia 2	H-NLVSGLIEARKYLEQLHRKLNCKV-NH ₂

A primeira etapa foi realizada anteriormente, estando descrita em Munhoz (2008). A reação de síntese do heterodímero constituiu-se de uma reação de oxidação ao ar. Para isso, foram preparados volumes iguais de 2 mL de duas soluções tampão NH₄HCO₃ a 10 mM, pH 8,3, cada uma com um dos peptídeos (cadeia 1 ou 2) à concentração de 5 mg/mL. As duas soluções foram então misturadas em um único recipiente e o meio reagente foi mantido sob agitação, em contato com ar, por cerca de 24 h. Como a reação demora um período considerável de tempo, esta etapa necessitou ser submetida a um controle cinético, o qual foi feito por CLAE. O acompanhamento foi realizado com injeções em longos intervalos de tempo, mantendo-se sempre o gradiente representado na Tabela 3.2 (p. 64) Pôde-se observar, simultaneamente, a diminuição na intensidade de absorção nos picos correspondentes às cadeias 1 e 2 (tempo de retenção de 20,0 e 20,7 min, respectivamente) e a intensificação na absorção do pico relativo ao heterodímero (tempo de retenção de 22,2 min), conforme mostrado na Figura 3.1 (p. 64).

Tabela 3.2. Gradiente utilizado para o acompanhamento cinético da reação de dimerização da distinctina. O fluxo para este gradiente foi de 1,0 mL/min

Tempo (min)	TFA, 0,1% em água (%)	TFA, 0,08% em acetonitrila (%)
0	100	0
15	60	40
55	40	60
60	0	100
65	0	100

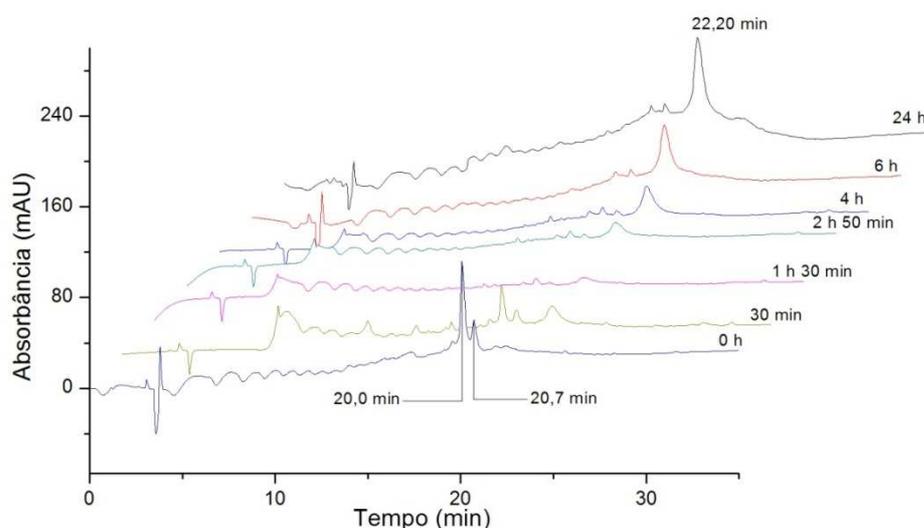


Figura 3.1. Cromatogramas CLAE do acompanhamento da reação de formação do heterodímero distinctina coletados em diversos intervalos de tempo durante a reação, mostrando os tempos de retenção das Cadeias 1 e 2 (20,0 min e 20,7 min, respectivamente) e o tempo de retenção do sinal supostamente relativo ao heterodímero (22,2 min).

Devido ao fato de os tempos de retenção relativos aos monômeros estarem próximos aos observados nas suas análises cromatográficas individuais sob as mesmas condições de gradiente, considerou-se que os sinais com os tempos de retenção observados correspondem às cadeias separadas. A fração correspondente ao produto com tempos de retenção 22,2 foi coletada e analisada por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF (Figura 3.2, p. 65). Entretanto, apesar de se observar um sinal a $[M]^+ = 5478$ g/mol correspondente à massa molecular da distinctina, percebem-se também diversos outros sinais, de intensidades comparáveis ao da distinctina, indicando que, apesar de no cromatograma estar presente apenas um sinal no tempo de retenção

22,2, a fração correspondente a esse sinal é, na verdade, constituída por uma mistura de diversos compostos.

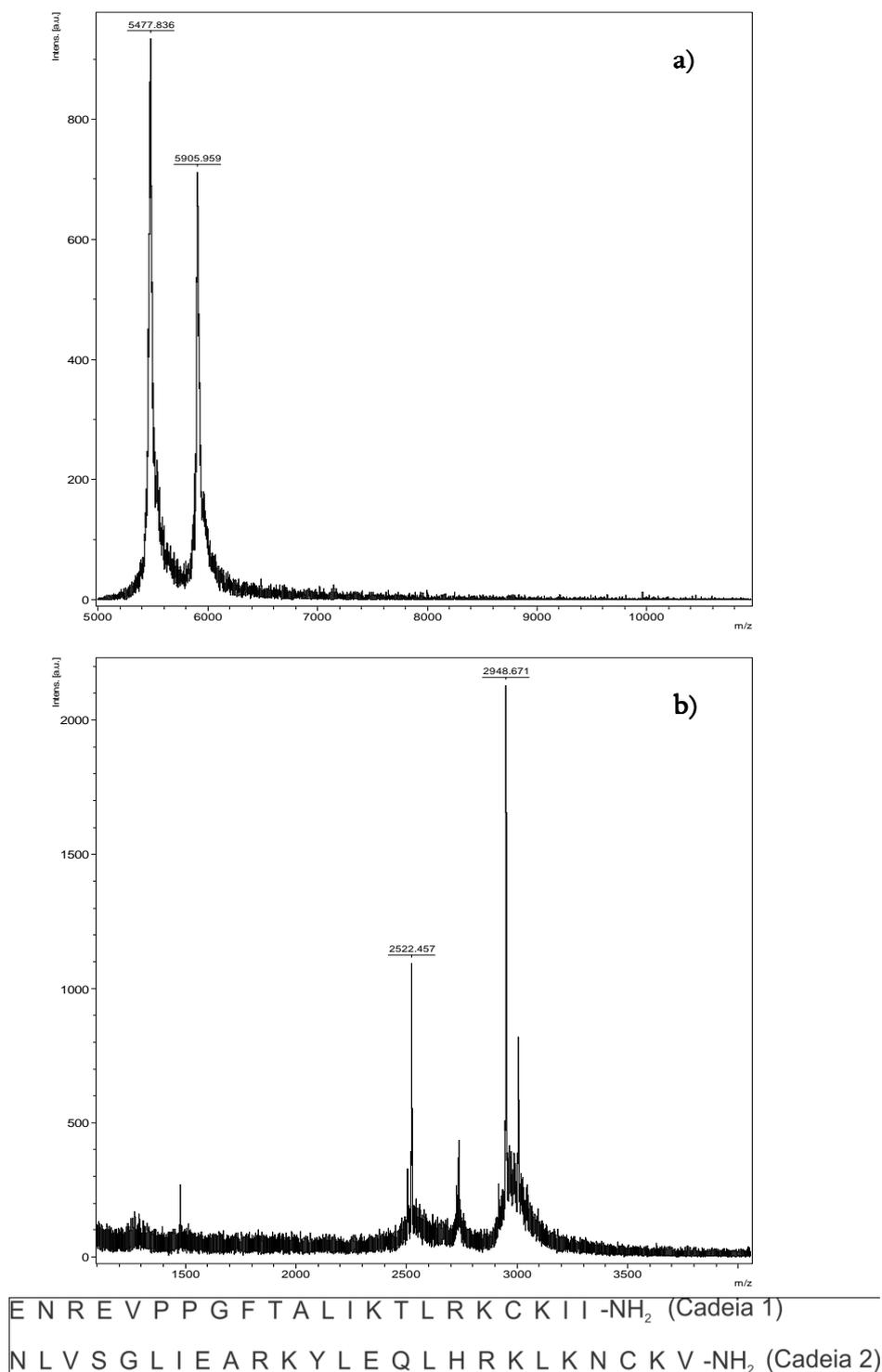


Figura 3.2. Espectro de massas da amostra da solução da reação de formação da distinctina coletada em tempo de retenção 22,2 min para espécies de massa maior que 4 kg/mol (a) e espécies de massas menores que 4 kg/mol (b). Estão indicadas quatro espécies principais, com valores de m/z 5906, 5478, 2949 e 2522.

A fração coletada a 22,2 min foi então submetida novamente a uma análise cromatográfica. Desta vez, utilizou-se um cromatógrafo do tipo UFLC e, utilizando-se um gradiente de 10% a 80% de acetonitrila 0,08% TFA e com fluxo de 0,4 mL/min, realizou-se uma varredura de temperatura, de 40 a 80 °C, com incrementos de 10 °C, conforme mostrado na Figura 3.3. O sinal único observado a temperatura ambiente desdobra-se em três sinais distintos com o aumento de temperatura. Isso pode se deve ao fato de peptídeos que interagem com membrana possuírem uma tendência considerável em se agregar. Com o aumento da temperatura, algumas das interações responsáveis pela agregação são quebradas, podendo-se, assim, separar os diferentes estados de agregação entre as diferentes moléculas do peptídeo que compõem a fração analisada.

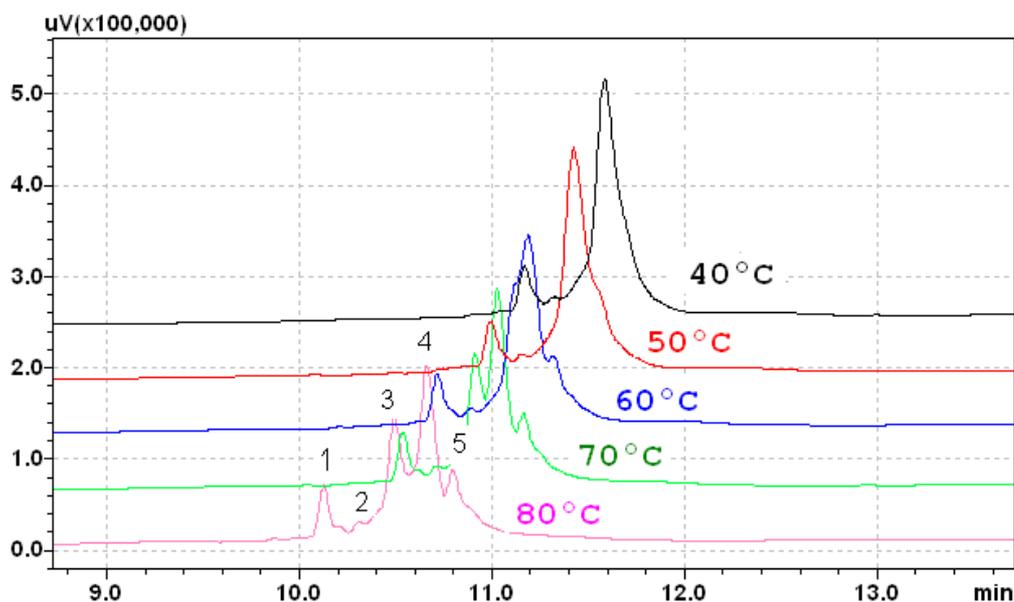


Figura 3.3. Cromatogramas de UFLC das amostras da solução da reação de formação da distinta coletada a um tempo de retenção de 22,2 min, mostrando o perfil das curvas em função da temperatura de análise. As cinco frações coletadas para análise de espectrometria de massas estão representadas pelos números 1 – 5.

Todas as frações foram coletadas separadamente e analisadas por espectrometria de massas MADI-TOF/TOF. A Figura 3.4a (p. 67) mostra os espectros de massa de cada fração no modo linear, onde se pode observar sinais relativos a espécies de massas moleculares maiores e a Figura 3.4b (p. 67), no modo refletido onde se encontram os sinais relativos a espécies de massas moleculares menores.

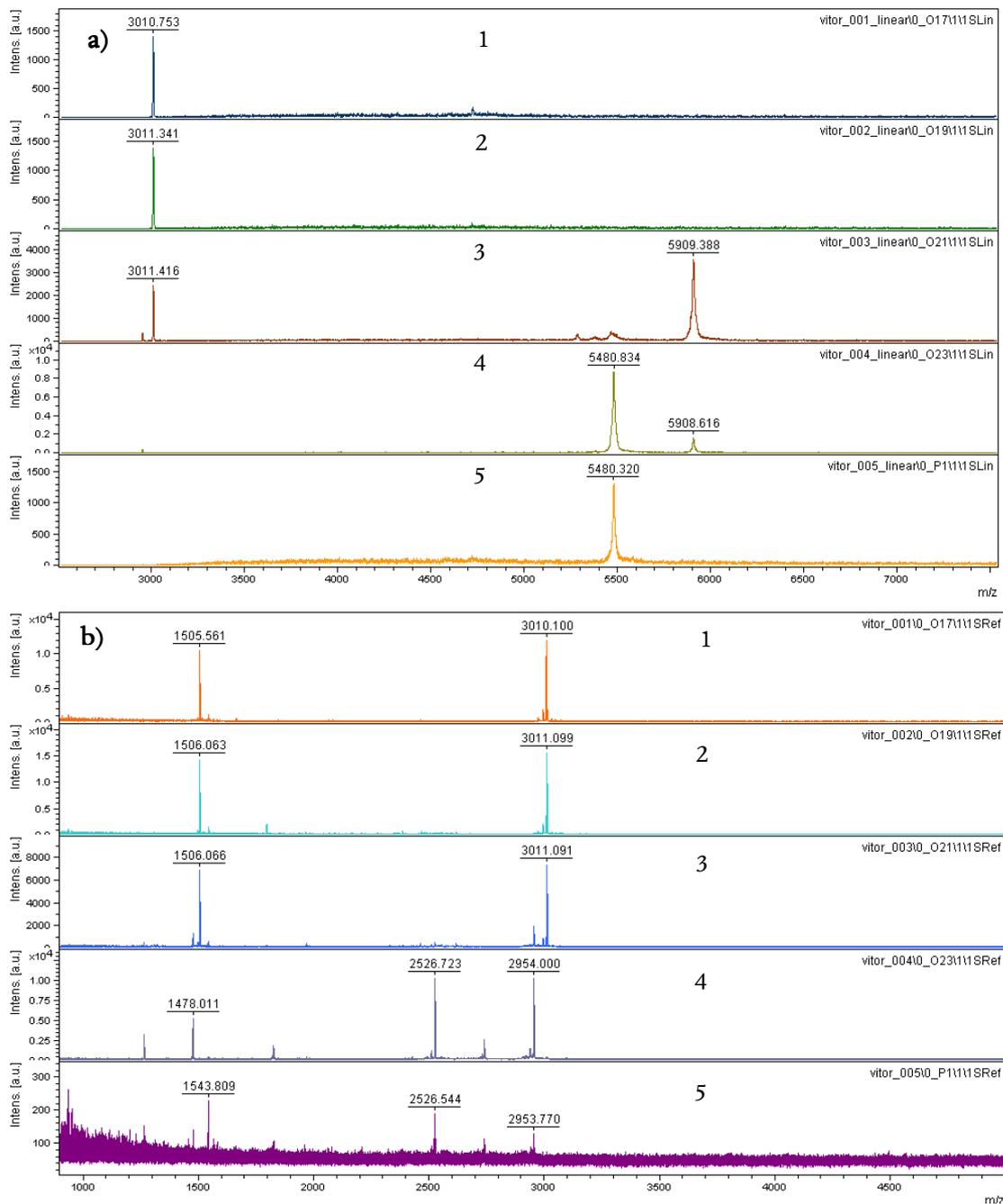


Figura 3.4. Espectro de massas das frações 1 – 5 coletadas na análise pelo UFLC, com variação de temperatura, para espécies de massa maior que 4 kg/mol (a) e espécies de massas menores que 4 kg/mol (b).

Pela análise da Figura 3.4 podem ser percebidos vários outros sinais além do sinal $[M]^+ = 5480$ g/mol, relativo ao íon molecular da distinctina. As espécies do contaminante mais abundante na maior parte das amostras corresponde aos sinais $[M]^+ = 3010$ g/mol, $[M+H]^+ =$

3011 g/mol, $[M]^{2+} = 1505$ g/mol e $[M+H]^{2+} = 1506$ g/mol. A massa molar de $[M]^+$ dessa espécie difere cerca de 56 g/mol da massa do íon molecular da Cadeia 2 ($[M]^+ = 2954$ g/mol), podendo corresponder a essa cadeia com um grupo protetor *terc*-butila (*t*Bu) na cadeia lateral de algum resíduo de aminoácido. Possivelmente, a etapa de clivagem não foi suficiente para desproteger a cadeia lateral de algum resíduo da Cadeia 2. Outro contaminante encontrado possui o sinal referente ao íon molecular em $[M+H]^+ = 5909$ g/mol, atribuído ao homodímero formado pela condensação entre duas moléculas da Cadeia 2. Além disso, puderam ser identificados sinais relativos às Cadeias 1 e 2 em suas formas monoméricas $[M]^+ = 2527$ g/mol e $[M]^+ = 2954$ g/mol, respectivamente. As espécies encontradas em cada fração estão listadas na Tabela 3.3. Embora seja bem provável que estas espécies estejam presentes em pequenas quantidades em mais alguma outra fração, a única fração cuja resolução do espectro de massas permitiu a identificação dessas espécies foi a fração 5.

Tabela 3.3. Relação das espécies encontradas em cada fração cromatográfica, na análise a 80°C de acordo com a numeração de sinais representada na Figura 3.4 (p. 67)

Fração	Espécie presente*
1	CH2- <i>t</i> Bu
2	CH2- <i>t</i> Bu
3	CH2- <i>t</i> Bu, <i>Homodim</i> -CH2
4	Dtn, <i>Homodim</i> -CH2
5	Dtn, CH1 [*] , CH2 [*]

* CH2-*t*Bu = Cadeia 2 com um grupo protetor *terc*-butila ligado a uma cadeia lateral de algum resíduo de aminoácido; *Homodim*-CH2 = Homodímero formado pela condensação de duas moléculas de Cadeia 2; Dtn – distinctina; CH1 = Cadeia 1; CH2 = Cadeia 2.

Nas frações 1 a 3, a espécie mais abundante foi a Cadeia 2 com o grupo *terc*-butila (CH2-*t*Bu). A distinctina, por sua vez, foi identificada somente nas frações 4 e 5. Embora a distinctina aparente estar mais abundante na fração 4, pela análise dos cromatogramas e ionogramas, a única fração que contém a distinctina em um grau de pureza aceitável para análise é a fração 5. Essa fração foi coletada e liofilizada para ser então submetida aos estudos por RMN.

3.1.2. Síntese e Purificação da Hilaseptina P2 (HSP2)

A síntese do peptídeo HSP2 foi feita manualmente, pela estratégia Fmoc (Chan & White, 2000). O sentido de acoplamento é apresentado na Tabela 3.4. O acoplamento e a desproteção foram acompanhados pelo teste de Kaiser, um teste qualitativo para a identificação de aminas primárias. Assim, a presença de grupos amino livres na sequência peptídica é evidenciada pela cor púrpura nos grãos em que o teste é realizado. Conforme mostrado também na Tabela 3.4, foi realizada uma síntese do peptídeo isotopicamente marcado com ^{15}N no resíduo L18, e com $^2\text{H}_3$ na cadeia lateral do resíduo de A16 para a realização dos experimentos de RMN em fase sólida (item 3.3.4.1, p. 116).

Tabela 3.4. Sequência peptídica do peptídeo HSP2, com o sentido de acoplamento dos aminoácidos, com o resíduo de aminoácido isotopicamente marcado com ^{15}N representado em negrito e o resíduo de aminoácido isotopicamente marcado com $^2\text{H}_3$ representado sublinhado

Peptídeo	Sequência peptídica
HSP2	G I G D I L K N L A K A A G K A <u>A</u> L H A V G E S L
sentido do acoplamento	←

A Tabela 3.5 mostra as quantidades dos demais reagentes utilizados para cada etapa, bem como os resultados de acoplamento e desproteção através dos testes de Kaiser. Em determinadas etapas, foram necessários reacoplamentos devido a resultados insatisfatórios do teste de Kaiser, conforme indicado na Tabela 3.6 (p. 70). Após a conclusão da síntese, foi realizada a etapa de clivagem, utilizando-se a solução descrita anteriormente (p. 46) sobre a resina. Foram obtidos 286 mg do peptídeo bruto ao final da síntese, consistindo em 95% de rendimento.

Tabela 3.5. Quantidade dos reagentes utilizada na síntese do peptídeo HSP2

Reagente/Suporte Polimérico	Quantidade
Resina Rink 0,63 mmol/mg	98,4 mg
HOBt	38,0 mg
DIC	39 μL

A Tabela 3.6 apresenta o acompanhamento da síntese manual em todos os seus acoplamentos. O acompanhamento fez-se necessário para identificar reações incompletas que são detectadas pelo teste de Kaiser. Neste teste a presença de grupo amino livre é caracterizada pela coloração azulada da resina. Dessa forma, ao fim de cada etapa de acoplamento e de desproteção do grupo amino, foram realizados testes de Kaiser.

Tabela 3.6. Acompanhamento da síntese de HSP2

<i>Ordem do Acoplamento</i>	<i>Derivado de Aminoácido</i>	<i>Excesso</i>	<i>Tempo de reação (h)</i>	<i>Teste de Kaiser</i>	
				<i>Acoplamento</i>	<i>Desproteção</i>
1	Fmoc-Leu-OH	4	3	----	+++
2	Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	4	1,5	----	+++
3	Fmoc-Glu(<i>t</i> Bu)-OH	4	1,5	----	+++
4	Fmoc-Gly-OH	4	1,5	----	+++
5	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++
6	Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	4	1,5	----	+++
7	Fmoc-His(Trt)-OH	4	1,5	----	+++
8	Fmoc-Leu-OH	4	1,5	+++	×
Reacoplamento	Fmoc-Leu-OH	4	2,5	----	+++
9	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++
10	Fmoc-Ala-OH	4	2,5	----	+++
11	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	1,5	+++	×
Reacoplamento	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2	---	+++
12	Fmoc-Gly-OH	4	2	----	+++
13	Fmoc-Ala-OH	4	2	----	+++
14	Fmoc-Ala-OH	4	2	----	+++
15	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2	----	+++
16	Fmoc-Ala-OH	4	2	----	+++
17	Fmoc-Leu-OH	4	2	----	+++
18	Fmoc-Asn(Trt)-OH	4	2	+++	×
Reacoplamento	Fmoc-Asn(Trt)-OH	4	2,5	+++	×
Reacoplamento	Fmoc-Asn(Trt)-OH	5	3	----	+++

19	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	2	----	+++
20	Fmoc-Leu-OH	4	2	----	+++
21	Fmoc-Ile-OH	4	2	++-	×
Reacoplamento	Fmoc-Ile-OH	4	2,5	----	+++
22	Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	4	2	----	+++
23	Fmoc-Gly-OH	4	2	----	+++
24	Fmoc-Ile-OH	4	2	+++	×
Reacoplamento	Fmoc-Ile-OH	4	2	----	+++
25	Fmoc-Gly-OH	4	2	----	+++

+ Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre. - Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre. × Desproteção não realizada devido à necessidade de reacoplamento.

A reação de clivagem do peptídeo foi realizada em meio ácido (TFA) para a clivagem simultânea da ligação peptídil-resina e remoção dos grupos protetores das cadeias laterais. No entanto, a mistura de clivagem e o tempo de reação são dependentes da sequência de cada peptídeo, uma vez que diferentes grupos protetores de cadeias laterais requerem diferentes tempos e condições de reação para sua completa remoção e que cadeias de aminoácidos mais susceptíveis a reações com carbocátions requerem a adição de sequestradores desses carbocátions. Neste caso, as condições de clivagem para o peptídeo HSP2 estão apresentadas na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Mistura de clivagem e tempo de reação para o peptídeo HSP2

<i>Peptídeo</i>	<i>Tempo de Reação(h)</i>	<i>Mistura de Clivagem</i>
HSP2	2	95%TFA, 2,5% água, 2,5% TIS

Logo após a clivagem, o peptídeo foi liofilizado e pesado, correspondendo a um rendimento bruto de cerca de 91%. Em seguida, o produto da síntese foi submetido à análise por CLAE. Foi preparada uma solução de concentração 1 mg/mL e foram injetados 20 μ L da solução no cromatógrafo. O gradiente de fase móvel utilizado encontra-se representado na Tabela 3.8 (p. 72).

Tabela 3.8. Gradiente utilizado (fluxo de 1,0 mL/min) para a análise do produto obtido da síntese do peptídeo HSP2

<i>Tempo (min)</i>	<i>Água 0,1% TFA (%)</i>	<i>Acetonitrila 0,08% TFA (%)</i>
0	95	5
10	75	25
30	60	40
35	0	100
40	0	100

A Figura 3.5 mostra o cromatograma do produto síntese do peptídeo HSP2. Nessa figura, pode-se observar um sinal de alta intensidade a um tempo de retenção de 17,1 min, correspondendo a 32% da solução de acetonitrila 0,08% TFA. De modo geral, percebe-se uma síntese sem grandes quantidades de produtos laterais de natureza peptídica, com um produto principal bem abundante, conforme observado no cromatograma.

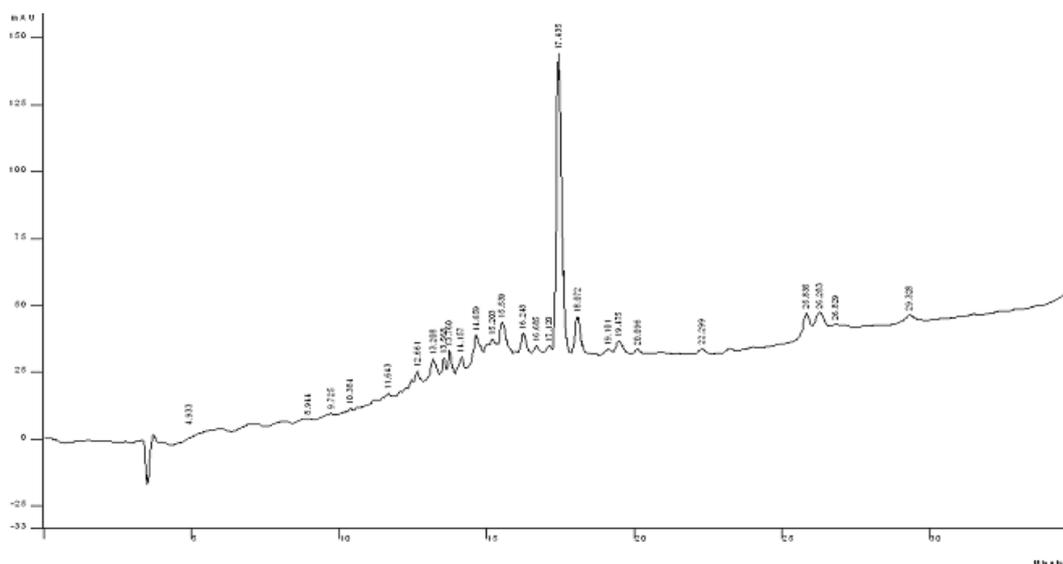
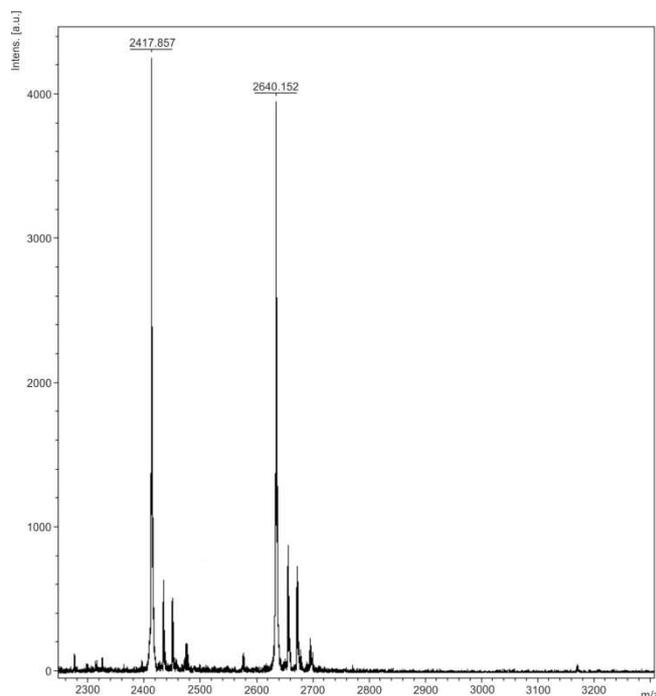


Figura 3.5. Cromatograma do produto de síntese do peptídeo HSP2, utilizando-se o gradiente descrito na Tabela 3.8 (coluna Microsorb C18, solventes H₂O:TFA 0,1% e Acetonitrila:TFA 0,08%).

A Figura 3.6 (p. 73) mostra o espectro de massas obtido para o produto bruto da síntese. Nele, pode-se observar a presença de um sinal de *m/z* aproximadamente 2418 g/mol,

correspondente ao peptídeo HSP2 o sinal a m/z igual a aproximadamente 2640 g/mol corresponde ao peptídeo ligado ao grupo Fmoc na extremidade *N*-terminal.



G I G D I L K N L A K A A G K A A L H A V G E S L -NH₂

Figura 3.6. Espectro de massas do produto de síntese do peptídeo HSP2.

3.1.3. Síntese da [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes)

A síntese do peptídeo L-Phes foi feita de forma análoga à de HSP2, sendo que a sequência peptídica deste, bem como a indicação do sentido de acoplamento seguido na síntese, encontram-se na Tabela 3.9.

Tabela 3.9. Sequência peptídica do peptídeo L-Phes, com a ordem de acoplamento dos aminoácidos, com o resíduo de aminoácido isotopicamente marcado com ¹⁵N representado em negrito e o resíduo de aminoácido isotopicamente marcado com ²H₃ representado sublinhado

<i>Peptídeo</i>	<i>Sequência peptídica</i>
L-Phes	F F F D T L K N L A G K V I G A L T
Sentido do acoplamento	←

A síntese de L-Phes ocorreu sem necessidade de reacoplamentos, conforme mostrado na Tabela 3.10, mantendo-se durante toda a síntese o excesso de 4× dos reagentes e o tempo de acoplamento de 1,5 h, com exceção do primeiro acoplamento, cuja duração foi de 3 h.

Tabela 3.10. Acompanhamento da síntese de L-Phes

Ordem do Acoplamento	Derivado de Aminoácido	Excesso	Tempo de reação (h)	Teste de Kaiser	
				Acoplamento	Desproteção
1	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	4	3	----	+++
2	Fmoc-Leu-OH	4	1,5	----	+++
3	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++
4	Fmoc-Gly-OH	4	1,5	----	+++
5	Fmoc-Ile-OH	4	1,5	----	+++
6	Fmoc-Val-OH	4	1,5	----	+++
7	Fmoc-His(Trt)-OH	4	1,5	----	+++
8	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	1,5	---	+++
9	Fmoc-Gly-OH	4	1,5	----	+++
10	Fmoc-Leu-OH	4	1,5	----	+++
11	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++
12	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	1,5	----	+++
13	Fmoc-Leu-OH	4	1,5	---	+++
14	Fmoc-Thr(<i>t</i> Bu)-OH	4	1,5	----	+++
15	Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	4	1,5	----	+++
16	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++
17	Fmoc-Lys(Boc)-OH	4	1,5	----	+++
18	Fmoc-Ala-OH	4	1,5	----	+++

+ Resultado positivo, indicativo da presença de grupo amina livre. – Resultado negativo, indicativo da ausência de grupo amina livre.

A clivagem de L-Phes foi feita sob as mesmas condições realizadas para a clivagem do peptídeo HSP2 (Tabela 3.7, p. 71).

A Figura 3.7 mostra o perfil cromatográfico do produto obtido após a síntese, em que pode-se observar um tempo de retenção de 15,3 min, correspondente ao peptídeo L-Phes.

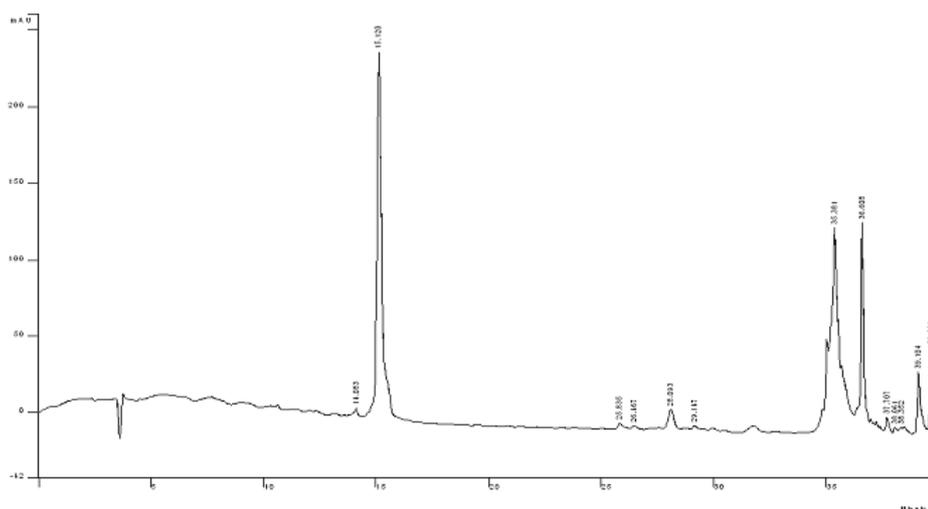


Figura 3.7. Cromatograma do produto de síntese do peptídeo L-Phes, utilizando-se o gradiente descrito na Tabela 3.8, p. 72 (coluna Microsorb C18, solventes H₂O:TFA 0,1% e Acetonitrila:TFA 0,08%).

3.2. Estudos por Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes

3.2.1. Estudos por CD da Distinctina

Na primeira etapa, as conformações das Cadeias monoméricas 1 e 2 da distinctina, assim como as do próprio dímero, foram avaliadas, tanto em solventes que mimetizam membranas quanto na presença de vesículas de fosfolípidos. Enquanto que, em solução aquosa, as cadeias polipeptídicas apresentam predominantemente conformações randômicas, uma propensão alta à formação de hélice é observada com a adição de TFE (Figuras 3.8A e B, p. 77). Esse solvente é conhecido por favorecer a formação de estruturas α -helicoidais caso haja, por parte do polipeptídeo, uma propensão em adotar esse tipo de conformação (Sonnichsen *et al.* 1992). Quando a porcentagem de TFE é aumentada de 10% para 20% (v/v), o conteúdo de α -hélice da Cadeia 1 aumenta até 50%. Aumento de porcentagem de TFE mostra pouco efeito na estruturação da cadeia peptídica. A Cadeia 2, em contraste, chega a apresentar 77% de sua estrutura como α -hélice na presença de TFE/água 60/40 (v/v) (Figuras 3.8B e 3.9, p. 77). A titulação de ambas as cadeias é caracterizada por um ponto isobéstico, que é um indicativo de

que as estruturas randômica e α -hélice podem ser caracterizadas por um equilíbrio entre dois estados (Figuras 3.8A e 3.8B, p. 77).

Deve-se notar que artefatos advindos do espalhamento da luz limitam a concentração das vesículas de lipídeo que podem ser adicionadas à solução peptídica. O baixo grau de formação de α -hélice da Cadeia 1, na presença de POPC (Figura 3.8F, p. 77), indica, provavelmente, que somente uma pequena porção de peptídeo está associada com os fosfolipídeos zwitteriônicos. Observações similares, com base em valores de constantes de particionamento em membranas, foram relatadas para outros peptídeos antimicrobianos (Matsuzaki *et al.*, 1991, Wenk *et al.*, 1998, Wieprecht *et al.*, 1999).

A Figura 3.8C (p. 77) mostra o espectro de CD de 33 μM de Cadeia 1, aumentando-se a concentração de vesículas POPC/POPG (3:1, mol:mol). Na presença de 10 μM de fosfolipídeos, um mínimo em 201 nm é observado e a desconvolução dos dados indicam um conteúdo de α -hélice de apenas 5%. Quando a concentração lipídica aumenta gradativamente, o espectro de CD passa a adotar feições características de conformações helicoidais, com um máximo em 197 nm e mínimos em 209 nm e 223 nm. A desconvolução dos dados sugere um conteúdo de α -hélice de cerca de 17%, na presença de 50 μM de fosfolipídeos e de aproximadamente 23% a concentrações de lipídeo de 250 μM . Interessantemente, um ponto isobéstico somente pode ser definido a concentrações de lipídeo maiores ou iguais a 50 μM , indicativo de que transições estruturais da solução para o estado associado lipídeo-peptídeo envolvem mais de dois estados conformacionais.

A Figura 3.8D (p. 77) mostra os espectros de CD de 33 μM da Cadeia 2 a quantidades crescentes de vesículas POPC/POPG (3:1, mol:mol). Enquanto o espectro adquirido a concentrações de lipídeo de 10 μM exibe pouca atividade ótica, as características relativas a α -hélices aumentam com a adição das vesículas lipídicas, com as proporções calculadas de 15%, 18%, 29% e 31%, na presença de 20 μM , 50 μM , 150 μM e 250 μM de POPC/POPG (3:1, mol:mol), respectivamente. Esses resultados indicam que a Cadeia 2 exibe uma propensão maior a estruturas helicoidais quando comparada à Cadeia 1, a razões peptídeo-lipídeo similares, o que provavelmente reflete seu melhor particionamento em membranas (veja também Figura 3.8F, p. 77).

A Figura 3.8E (p. 77) mostra os espectros de CD da distinctina a 39 μM na presença de quantidades crescentes de vesículas POPC/POPG (3:1, mol:mol). Em contraste com as cadeias

individuais, um perfil da curva característica de α -hélice pode ser observada na presença de 10 μM de fosfolípídeos (conteúdo de hélice de 20%). Quando a concentração de lipídeos é aumentada ainda mais, contribuições de μ -hélice de cerca de 41% são observadas na com 150 μM e 250 μM de fosfolípídeos. Finalmente, a Figura 3.8F mostra espectros de CD obtidos na presença de vesículas de POPC. Pode-se notar que o formato da curva assemelha-se bastante ao da curva obtida na presença de POPC/POPG (3:1, mol:mol) (Figura 3.8E).

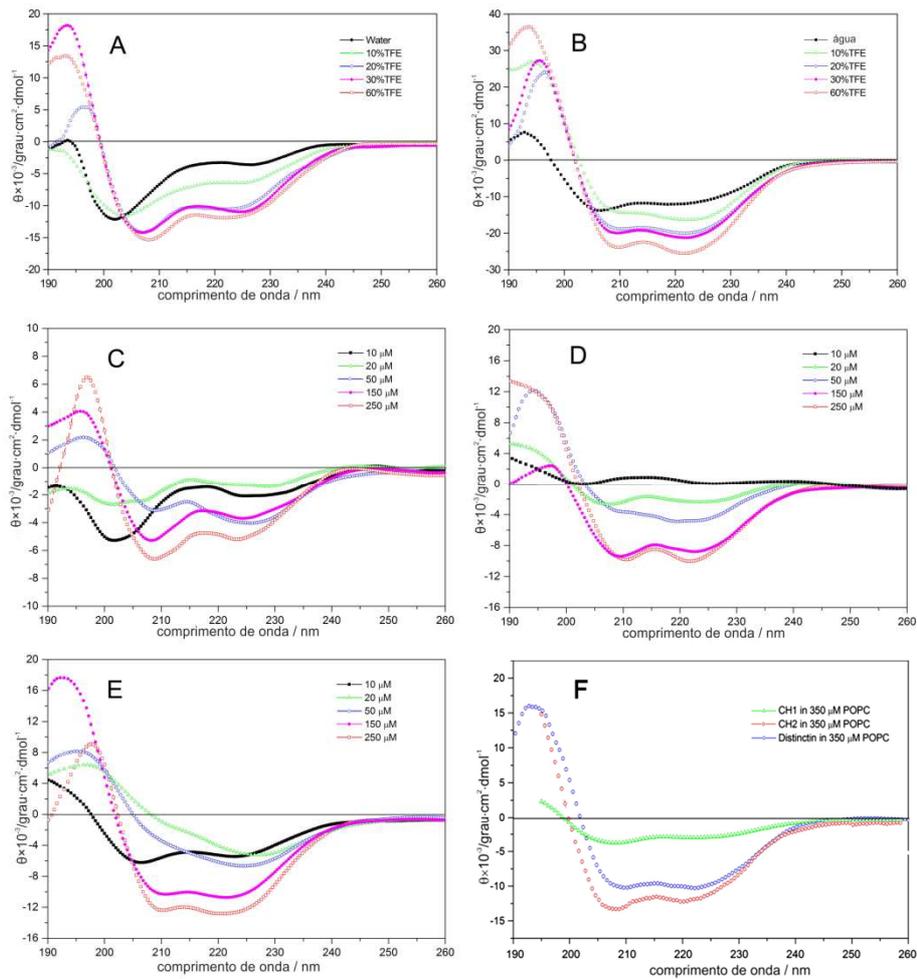


Figura 3.8. Espectros de dicroísmo circular de 10 μM da Cadeia 1 (A) e Cadeia 2 (B) em água (quadrados pretos preenchidos), 10% TFE (triângulos, em verde), 20% TFE (círculos vazados, em azul), 30% TFE (círculos preenchidos, em magenta) e 60% TFE (círculos vazados, em marrom). (C) Espectros que resultaram da titulação de vesículas pequenas unilamelares POPC:POPG (3:1, mol:mol) à solução da Cadeia 1. A concentração inicial do peptídeo é de 33 μM e diminui a 29 μM devido à adição do lipídeo. (D) Titulação do lipídeo em 38 μM a 27 μM de Cadeia 2, e (E) em 39 μM a 36 μM da distinctina. As concentrações de lipídeos são 10 μM (quadrados preenchidos, em preto), 150 μM (círculos preenchidos, em magenta), 250 μM POPC:POPG (quadrados vazados, em marrom). (F) espectros de CD de 7 μM da Cadeia 1 (triângulos, em verde), 7 μM da Cadeia 2 (círculos vazados, marrom), e 20 μM da distinctina (círculos vazados, em azul) na presença de 350 μM POPC na forma de vesículas unilamelares pequenas.

O conteúdo de α -hélice como uma função da concentração de fosfolipídeos é mostrado na Figura 3.10 (p. 79) para ambas as cadeias individuais e para o heterodímero distinctina. Pode-se observar que a 150 μM POPC/POPG (mol/mol), ambas as Cadeias 1 e 2 atingiram seu conteúdo máximo de hélice. Para a distinctina, essa saturação ocorre para concentrações de cerca de 250 μM com o conteúdo de α -hélice observado a 650 μM similar ao de 250 μM (dados não mostrados).

Enquanto o grau de formação de α -hélices das cadeias individuais em misturas TFE/água aumenta com a concentração de álcool, atingindo valores altos e seguindo um equilíbrio entre dois estados, a situação na presença de fosfolipídeos é um tanto mais complexa e caracterizada por equilíbrios entre vários estados. Provavelmente o formato da curva do espectro de CD é afetado por agregação de vesículas de POPC/POPG quando a associação de peptídeos catiônicos resulta na neutralização das cargas negativas dos lipídeos, ou quando os lipídeos agregam-se entre si.

A adição de 390 μM de POPC na forma de vesículas unilamelares à solução aquosa das Cadeias 1 e 2 da distinctina, respectivamente, causa somente um pequeno aumento na conformação helicoidal. O baixo grau de formação de α -hélice pode indicar que somente uma pequena quantidade do peptídeo está associada aos fosfolipídeos zwitteriônicos, conforme indicam estudos feitos com peptídeos antimicrobianos catiônicos semelhantes.

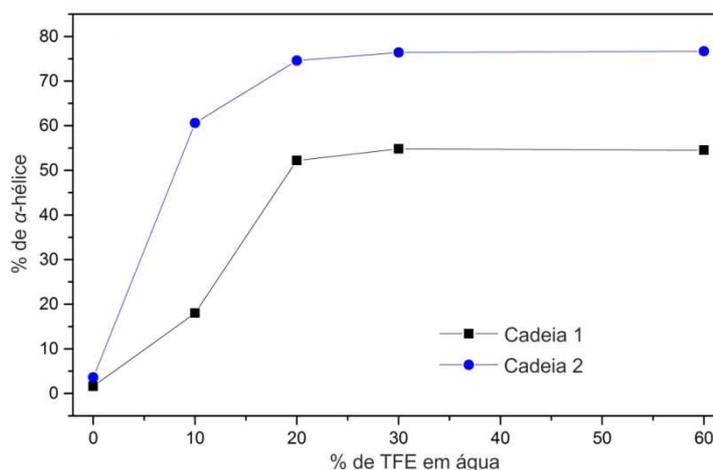


Figura 3.9. Conteúdo de α -hélice das Cadeias 1 e 2 obtido por espectroscopia de CD como função da porcentagem de TFE em água.

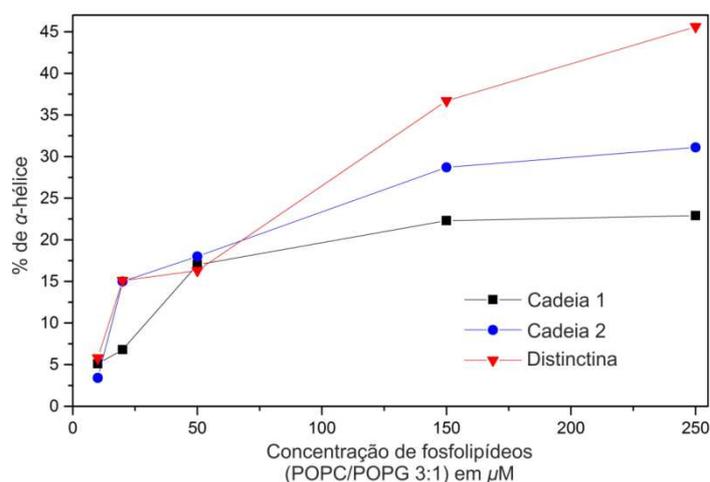


Figura 3.10. Conteúdo de α -hélice das Cadeias 1 e 2 e da distinctina obtido por espectroscopia de CD como função da concentração de lipídeos POPC:POPG (3:1, mol:mol).

3.2.2. Estudos por CD da Hilaseptina P2 (HSP2)

Foram realizados experimentos de CD para o peptídeo HSP2 para verificar se, na presença de fosfolípidos, o peptídeo adotaria uma estrutura em α -hélice, como comumente ocorre para peptídeos antimicrobianos (Zaslöff, 2002). Os experimentos foram realizados aumentando-se gradativamente a concentração de vesículas unilamelares pequenas (SUVs), compostas por POPC e POPG na proporção 3:1 (mol:mol). A Figura 3.11 (p. 80) mostra os espectros de CD do peptídeo em solução e na presença de concentração máxima de vesículas. Em solução e sem a presença de fosfolípidos, o peptídeo encontra-se totalmente desestruturado. Em meios com grande concentração de vesículas, o peptídeo passa a adotar uma estrutura quase altamente helicoidal. Esse comportamento é esperado uma vez que a forma helicoidal da HSP2 é consideravelmente anfipática (Figura 1.9, p. 14), característica fundamental para se dar a interação do peptídeo com vesículas ou membranas fosfolipídicas.

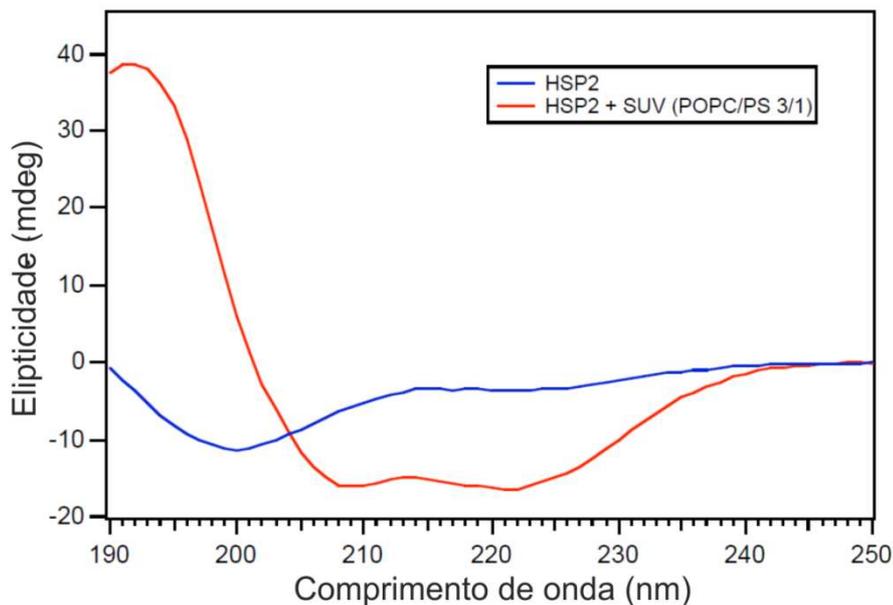


Figura 3.11. Espectros de CD da HSP2, em solução a pH 7,4 contendo tampão Tris-HCl a 100mM (linha azul) e em solução, na presença de vesículas de POPC/POPG 3:1, mol:mol (linha vermelha).

3.3. Determinações Estruturais por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em Solução dos Peptídeos Distinctina, Hilaseptina P2 (HSP2) e Fenilseptinas L-Phes e D-Phes

As estruturas de todos os peptídeos, Distinctina, Hilaseptina-P2 (HSP2), [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes) foram determinadas por meio da estratégia de assinalamento sequencial a partir da análise dos mapas de contorno de experimentos bidimensionais de RMN, conforme proposto por Wuthrich (Wuthrich, 1986). Dessa forma, o mapa de contornos TOCSY foi utilizado para identificar sinais referentes aos átomos de hidrogênio não-lábeis de cada resíduo de aminoácido. Concomitantemente a essa atribuição, foram atribuídos também os sinais de carbono hidrogenado por meio da análise do mapa de contornos ¹H-¹³C-HSQC editado. Esse assinalamento foi auxiliado pela atribuição de correlações sequenciais do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ no mapa de contornos NOESY, que permitiu identificar a posição de cada resíduo na estrutura primária de cada peptídeo. Após essa etapa, foram identificadas as correlações à média e, caso existissem, à longa

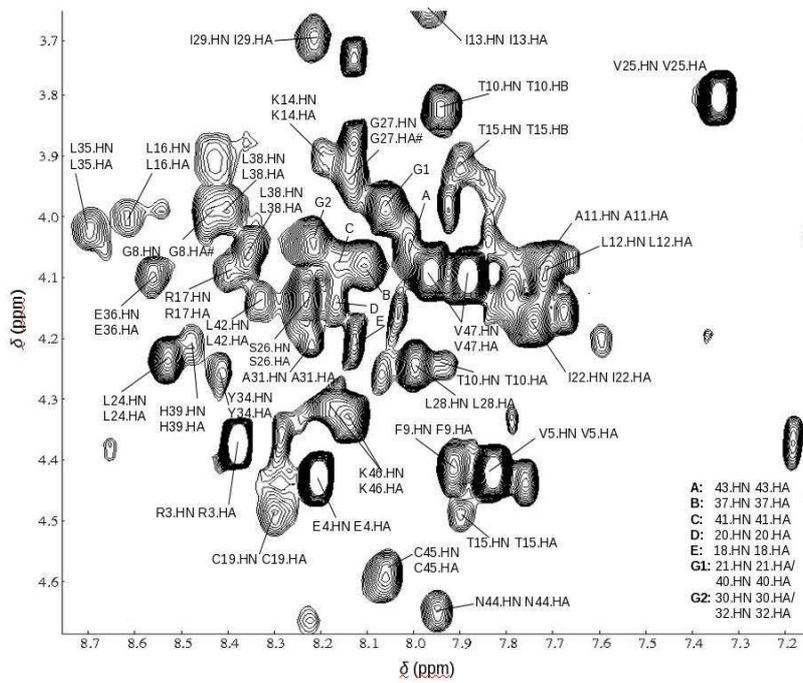
distância, bem como as correlações intrarresiduais de cada molécula. Em seguida, realizaram-se os procedimentos de análise das listas de restrições, cálculo e validação, conforme descrito na Introdução. Para ambos os peptídeos, construíram-se as listas com base em pseudoátomos ao invés de serem consideradas atribuições esteroespecíficas. Essa estratégia foi adotada de forma a evitar possíveis interpretações incorretas por parte do programa Xplor-NIH devido a diferenças de nomenclatura em relação ao programa NMRView. A aproximação por pseudoátomos, nesse caso, não acarreta grande perda de resolução, uma vez que, ao contrário de proteínas e sistemas proteicos, ambos os peptídeos não apresentam enovelamento suficiente para que essa simplificação surta efeito considerável sobre os conjuntos de estruturas calculados.

3.3.1. Determinação Estrutural da Distinctina por RMN em Solução

A análise dos dados de RMN em da distinctina solução foi, em grande parte, dificultada por sobreposições e, em menor escala, por trocas químicas. A Figura 3.12 (p. 82) mostra a região α N do mapa de contornos TOCSY, onde se pode perceber uma baixa dispersão de sinais. Algumas dessas sobreposições puderam ser resolvidas por análise do mapa de contornos ^1H - ^{13}C -HSQC (Figura 3.13, p. 82), embora em alguns resíduos, os sinais relativos aos átomos das cadeias principais de ambas Cadeias 1 e 2 não puderam ser precisamente identificados, como por exemplo, os sinais pertencentes aos resíduos L16, R17, R32, E33, L38 e K41 (numeração mostrada na Tabela 3.11). No mapa de contornos NOESY a sobreposição mostrou-se mais problemática, sendo necessária uma análise mais criteriosa das principais regiões estudadas (Figura 3.14, p. 83), levando-se em conta os sinais atribuídos no mapa de contornos TOCSY.

Tabela 3.11. Sequência de aminoácidos da distinctina, com suas respectivas numerações utilizadas durante a análise dos experimentos de RMN em solução

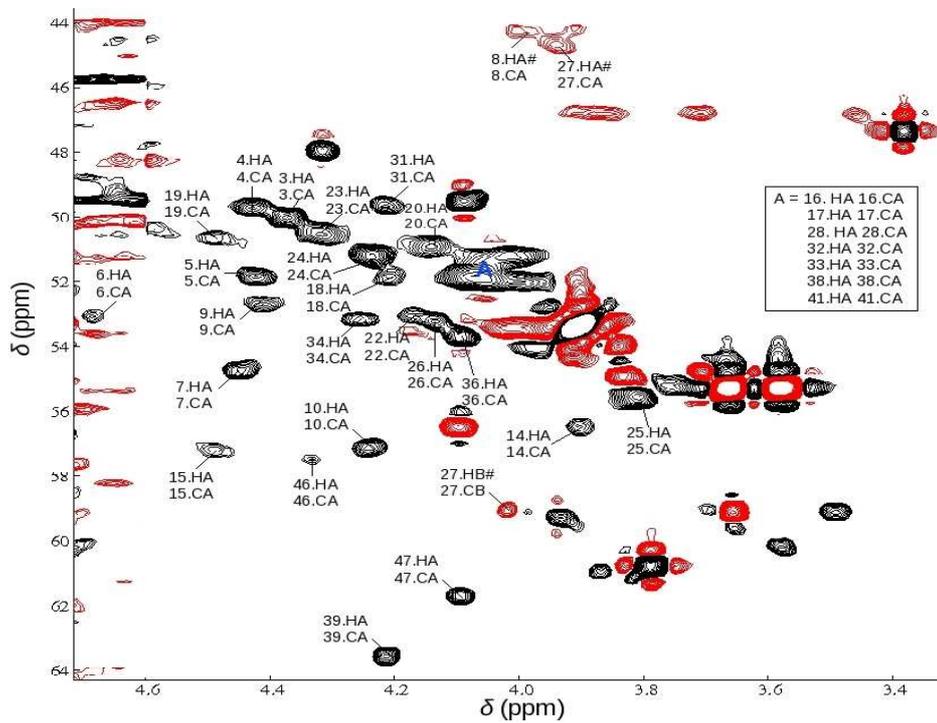
Cadeia	Sequências de Aminoácidos																									
1	E	N	R	E	V	P	P	G	F	T	A	L	I	K	T	L	R	K	C	K	I	I	NH ₂			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22				
2	N	L	V	S	G	L	I	E	A	R	K	Y	L	E	Q	L	H	R	K	L	K	N	C	K	V	NH ₂
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45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



ENREVP PPGFTALIKTLRKCKII-NH₂ (Cadeia 1)

NLV SGLIEARKYLEQLHRK LKNCKV-NH₂ (Cadeia 2)

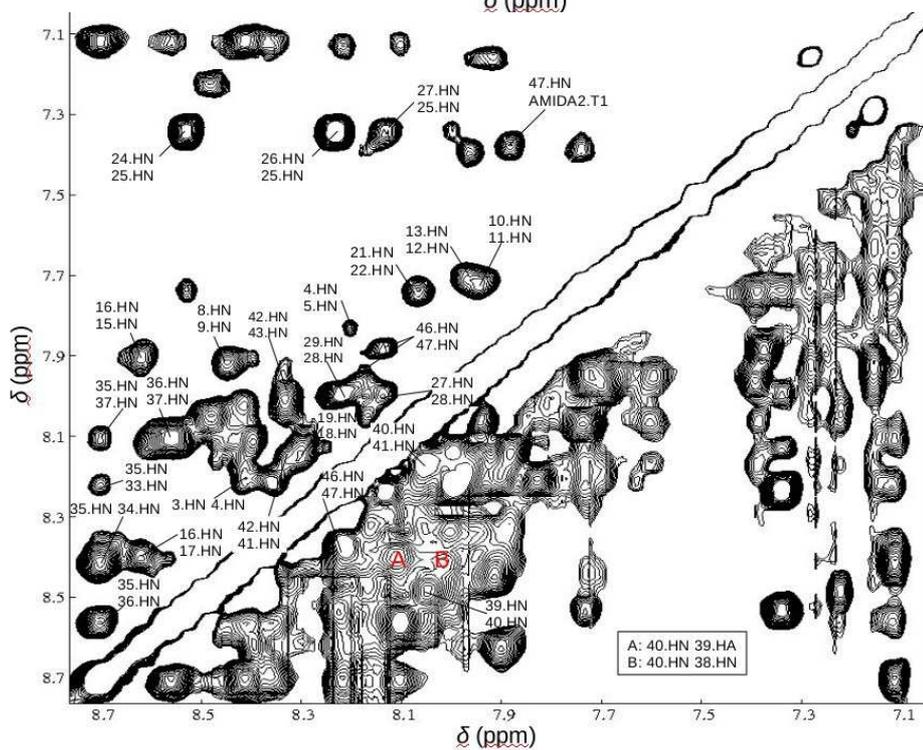
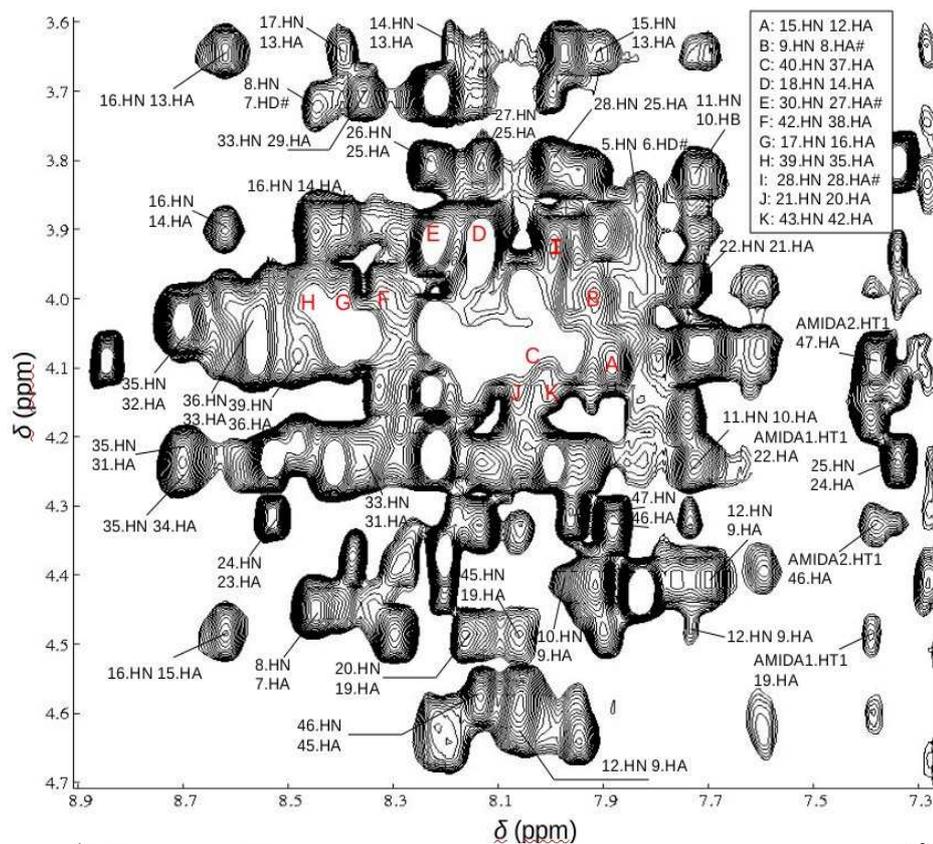
Figura 3.12 Mapa de contornos TOCSY da distinctina (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1,) mostrando conectividades intrarresiduais dos tipos $d_{\alpha N}$.



ENREVP PPGFTALIKTLRKCKII-NH₂ (Cadeia 1)

NLV SGLIEARKYLEQLHRK LKNCKV-NH₂ (Cadeia 2)

Figura 3.13. Mapa de contornos ¹³C,¹H HSQC da distinctina (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1, v:v) mostrando conectividades intrarresiduais C_α - H_α.



ENREVP PGFTALIKTLRKCKII-NH₂ (Cadeia 1)

NLVSG LIEARKYLEQLHRKLNCKV-NH₂ (Cadeia 2)

Figura 3.14. Mapas de contornos NOESY da distinctina (600 MHz; TFE-d₂:H₂O 1:1, v:v) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos: (a) $d_{\alpha N}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ e $d_{\alpha N}(i, i + 4)$; (b) $d_{\beta N}(i, i + 1)$.

Após o final da atribuição, foi construída uma lista de restrições de distância, contendo 258 restrições intrarresiduais, 121 sequenciais, 103 de médio alcance e cinco a longo alcance. Essa lista foi submetida à análise pelo programa QUEEN, que forneceu os resultados mostrados na Figura 3.15 (p.90). Esses resultados mostram que, dentre todas as restrições, duas constituem valores atípicos: H39 HD#/I13 HD1# (R_1) e L12 HD1#/L25 HN (R_2), ambas com limites superiores de distância de 5,00 Å. Essas duas restrições apresentaram ambos valores de unicidade e informação média altos. Além disso, podem ser observados dois agrupamentos diferentes na Figura 3.15a (p. 85), destacados como grupos *A* e *B*. Em *A*, encontra-se a maior parte das restrições, enquanto que, em *B*, encontram-se apenas quatro restrições, representadas na Tabela 3.12 (p. 85), juntamente com seus respectivos valores de informação média.

Duas considerações merecem ser feitas a respeito dos dois *outliers* e do agrupamento *B*. Primeiramente, os sinais de NOE que originaram as restrições R_1 e R_2 somente puderam ser atribuídos de um lado da diagonal no mapa de contornos NOESY, devido a problemas de linha de base ou, simplesmente, porque só estavam presentes de um lado da diagonal, o que lhes garantiu um valor alto de unicidade. Além disso, o alto grau de informação contida nessas restrições, não corroborado por nenhuma outra, garantiu, ainda, a esses dados, um alto valor de informação média. Levando em conta o fato de que os sinais não apareceram nos dois lados da diagonal e os seus respectivos valores de informação, há uma probabilidade considerável de que esses sinais sejam, na verdade, artefatos ou sinais devido à presença de múltiplas conformações presentes na amostra. Os sinais pertencentes ao agrupamento *B*, entretanto, puderam ser atribuídos em ambos os lados da diagonal, garantindo a eles valores praticamente nulos de informação única, mas, mesmo assim, o valor relativamente alto de informação média mostra que, embora essas restrições sejam consistentes entre si, elas têm um forte impacto sobre a estrutura final. Esses dados a respeito do agrupamento *B*, no entanto, 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 intercadeias encontradas e que, por consequência, são as únicas responsáveis pela orientação de uma cadeia em relação à outra. Em outras palavras, essas restrições são as únicas que definem uma estrutura quaternária, enquanto as demais restrições definem as estruturas secundária e terciária de cada cadeia. Dessa forma, é totalmente plausível que essas restrições contenham um valor alto de informação na estrutura final do peptídeo, uma vez que estão ausentes restrições orientacionais que poderiam validar ou não os dados do agrupamento *B*. Sendo assim, decidiu-se por, a princípio, manter essas restrições nos cálculos subsequentes, enquanto que as restrições R_1 e

R_2 foram retiradas. Um exemplo do impacto dessas restrições sobre a estrutura final do peptídeo é mostrado na Figura 3.15, em que as restrições são mostradas na forma de tubos amarelos, conectando os átomos entre os quais as distâncias são restringidas. A Figura 3.16a (p. 86) mostra todas as restrições, enquanto que as Figuras 3.16b e 3.16c (p. 86) mostram as restrições dos *outliers* e do agrupamento *B*, respectivamente.

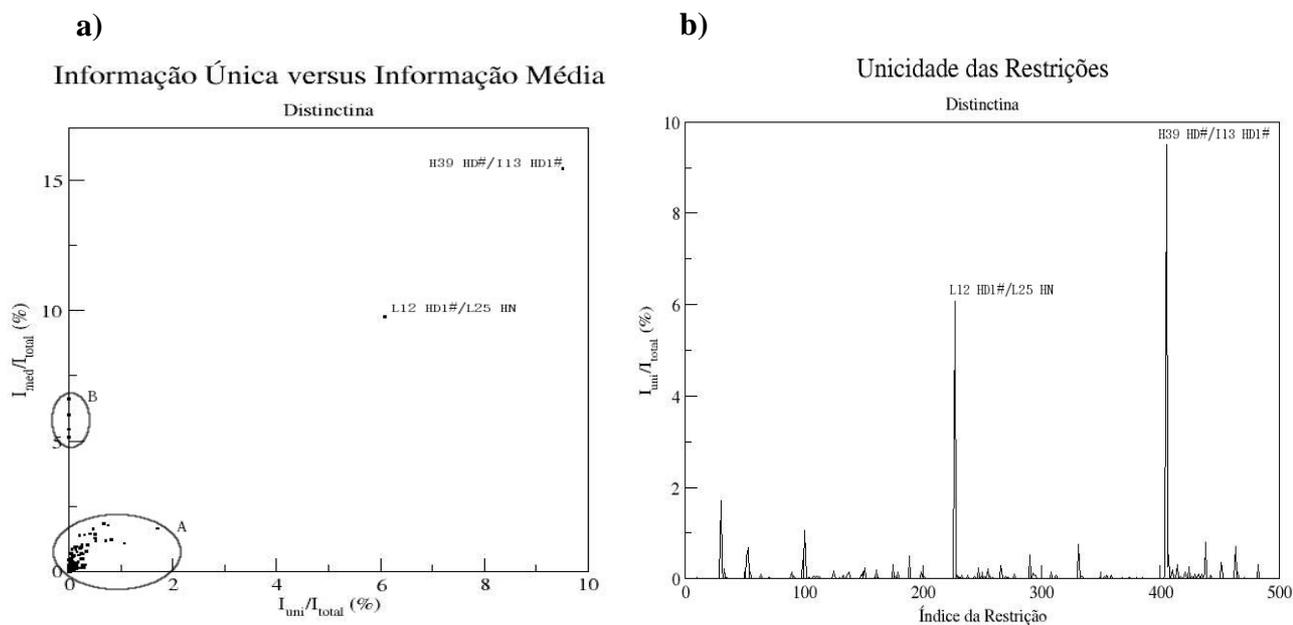


Figura 3.15. (a) Gráfico de informação única por informação média da primeira lista de restrições da distinctina, mostrando a aglomeração dos pontos em dois grupos, *A* e *B*, e as duas restrições *outliers* identificadas: H39 HD#/I13 HD1# e L12 HD1#/L25 HN. (b) Gráfico de unicidade pelo índice de cada restrição da primeira lista de restrições da distinctina, mostrando as duas restrições de maior valor de unicidade.

Tabela 3.12. Relação das restrições pertencentes ao agrupamento *B* representado na Figura 3.16a (p. 86) e seus respectivos valores de informação média (I_{med})

Restrição	I_{med}
C19 HA/C45 HN	6,61
C45 HN/C19 HA	6,02
C19 HA/C45 HB#	5,46
C45 HB#/C19 HA	5,14

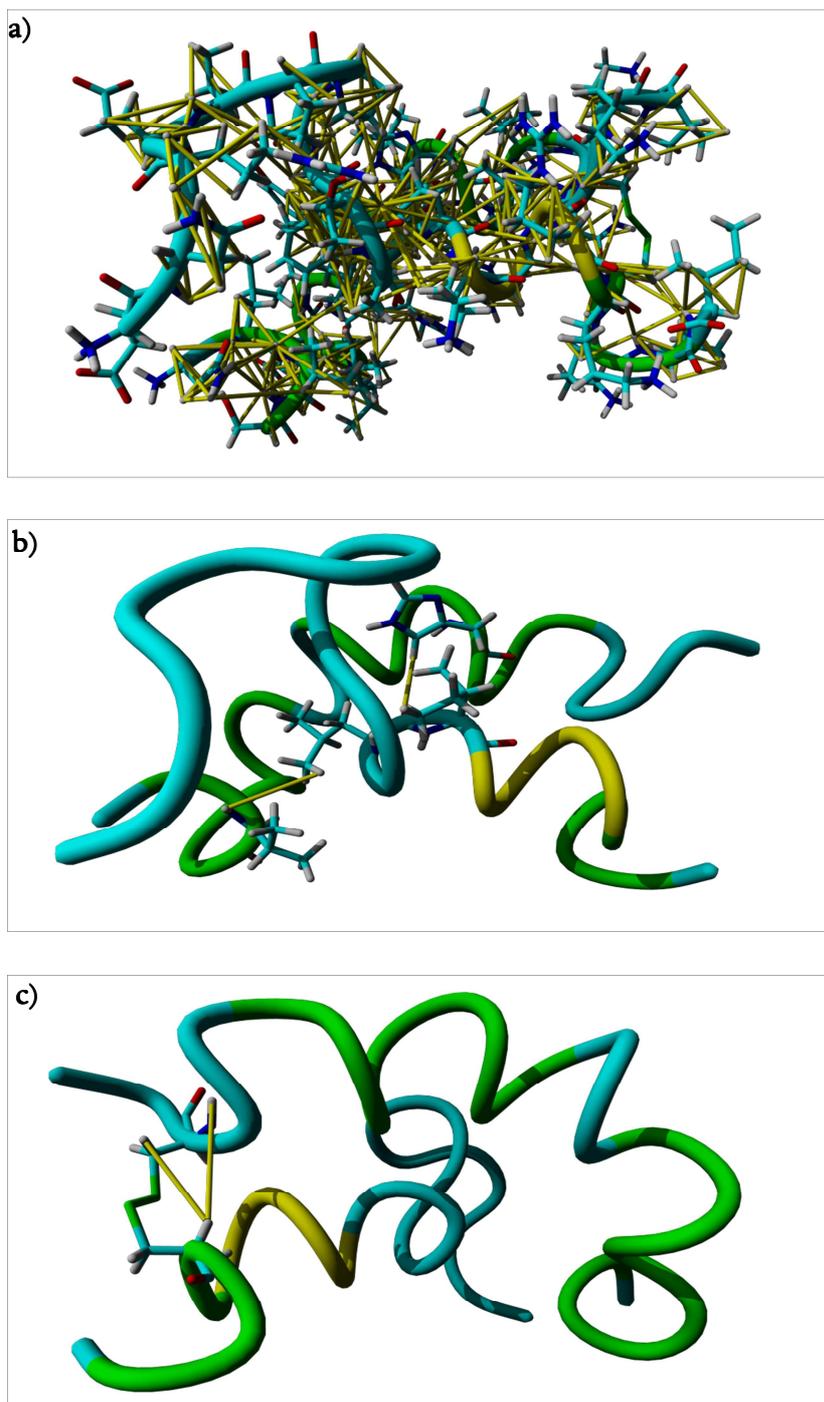


Figura 3.16. Representação das restrições de distância (tubos amarelos) em uma estrutura da distinctina calculada com essas restrições. Em (a) estão representadas todas as restrições de distância determinadas, em (b) estão representados os *outliers* e, em (c), as restrições do agrupamento *B*.

Entretanto, não se pode afirmar quais dessas restrições são ou não corretas com base apenas nas análises de suas informações, uma vez que um conteúdo alto de informação sugere a presença de restrições incorretas, mas não se pode afirmar que uma restrição é incorreta com

base somente em seu conteúdo de informação única. Isso torna necessária uma avaliação mais detalhada das restrições e de seus efeitos sobre o conjunto final de estruturas, levando-se em conta também as violações ocorridas durante o cálculo das estruturas e parâmetros de qualidade estrutural. As violações presenciadas foram identificadas pelo próprio programa Xplor-NIH e sua análise consistiu em mapear as regiões com maior número de violações, que constituem regiões com maior probabilidade de estarem incorretas. Os parâmetros de qualidade estrutural foram obtidos pelo servidor *iCing*, utilizando-se os programas PROCHECK (Laskowski, Rullmann et al., 1996) e WHATIF (Vriend, 1990). A Figura 3.17 (p. 88) mostra os resultados para o conjunto inicial de estruturas, do qual faz parte o modelo apresentado na Figura 3.16 (p. 86). Na Figura 3.17a (p. 88) estão as sequências das duas cadeias, 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.

a) **Análise Baseada nos Resíduos de Aminoácido**

Cadeia 1

1-9	GLU1	ASN2	ARG3	GLU4	VAL5	PRO6	PRO7	GLY8	PHE9	
10-19	THR10	ALA11	LEU12	ILE13	LYS14	THR15	LEU16	ARG17	LYS18	CYSS19
20-29	LYS20	ILE21	ILE22							

Cadeia 2

23-29			ASN23	LEU24	VAL25	SER26	GLY27	LEU28	ILE29
30-39	GLU30	ALA31	ARG32	LYS33	TYR34	LEU35	GLN37	LEU38	HISE39
40-49	ARG40	LYS41	LEU42	LYS43	ASN44	CYSS45	LYS46	VAL47	

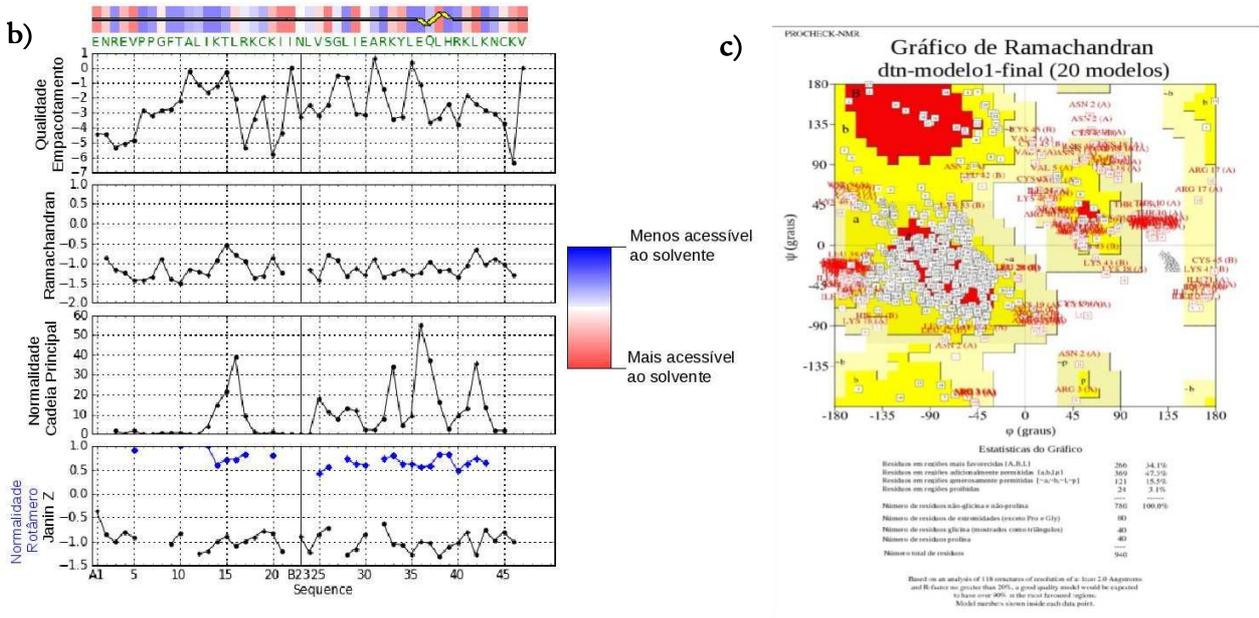


Figura 3.17. Resultados da análise de qualidade estrutural e validação dos modelos calculados para a distinctina utilizando-se a primeira lista de restrições. **(a)** Resumo da análise para cada resíduo de aminoácido. As cores verde, laranja e vermelho representam, respectivamente, estrutura de boa qualidade, estrutura de qualidade mediana ou região com pouca informação estrutural e estrutura de qualidade baixa, ou pouco comum. **(b)** Resultados do programa WHATIF, relativos à qualidade de empacotamento, *Z-score* do gráfico de Ramachandran e de Janin, e normalidade da cadeia principal e dos rotâmetros. **(c)** Diagrama de Ramachandran, obtido pelo programa PROCHECK. Cada ponto corresponde a um determinado resíduo de algum dos vinte modelos. Os pontos que se encontram em regiões generosamente favorecidas e em regiões proibidas são representados em vermelho.

Pode-se notar, pela análise da Figura 3.17a, que grande parte dos resíduos apresenta estruturação possivelmente incorreta, salvo uma minoria de segmentos que apresentaram conformações aceitáveis. A Figura 3.17b mostra em mais detalhes os problemas encontrados nas estruturas calculadas através de gráficos de algumas grandezas relacionadas com características estruturais de peptídeos e proteínas. O gráfico de qualidade de empacotamento mostra se há eventuais sobreposições de grupos e se a vizinhança desses grupos é condizente com sua

característica (e.g. polar, apolar, aromática, carregada positiva ou negativamente, etc.). Valores de qualidade de empacotamento menores que -5 apontam erros potenciais na estrutura, como observado em especial na Cadeia 1. O gráfico de qualidade do gráfico de Ramachandran (Fig. 17.b, p. 88) mostra a coerência das distribuições de ângulos de torção em relação às distribuições desses ângulos de torção em várias proteínas em um banco de dados. Regiões com valores abaixo de -1,2 são consideradas como merecedoras de uma análise mais detalhada, e as com valores abaixo de -1,3 podem ser encaradas como possivelmente erradas. Pela análise desse gráfico, pode-se perceber que grande parte da Cadeia 1 está potencialmente errada e que aos resíduos da Cadeia 2 foram atribuídos valores próximos de -1,2, indicando um desvio menor, porém considerável em relação às distribuições de ângulos diedros normalmente observadas nesse tipo de biomoléculas. O gráfico de normalidade da cadeia principal também mostra o desvio da estrutura do peptídeo em relação a um banco de dados de biomoléculas proteicas. Contudo, na determinação dessa grandeza são levados em conta segmentos maiores da cadeia polipeptídica, possibilitando uma avaliação mais abrangente do desvio da normalidade estrutural. Ao analisar essa grandeza, consideram-se valores abaixo de três como indicativos de desvio grande da normalidade, segmentos com valores maiores que três e menores que 10 são considerados pouco comuns e, portanto, merecedores de uma análise mais criteriosa. Valores acima de 10 são considerados como bons. O valor máximo para essa grandeza é 80. A Cadeia 1, em quase sua totalidade, apresenta valores de normalidade da cadeia principal próximos a zero, à exceção de uma pequena região compreendida entre os resíduos I14 e R17, que apresentaram valores maiores ou iguais a 10. A Cadeia 2 também apresentou resultados pouco satisfatórios, com a maior parte dos valores menores que 10. A normalidade dos rotâmeros e o *Z-score* de Janin são análogos à normalidade da cadeia lateral e à qualidade do diagrama de Ramachandran, porém aplicados aos ângulos diedros das cadeias laterais. Para a normalidade dos rotâmeros, consideram-se valores problemáticos aqueles menores que -0,5 e, para o *Z-score* de Janin, os valores menores que -0,9. Analisando-se também esse gráfico, percebem-se diversos segmentos problemáticos em relação às cadeias laterais.

Por fim, a figura 3.17c (p. 88) mostra a distribuição dos ângulos diedros φ e ψ por resíduo e para cada um dos 20 modelos calculados. Pode-se observar que vários pontos se agrupam na região característica de formas α -hélice, mas ainda assim encontram-se bastante dispersos, indicando a presença de uma hélice bastante distorcida. O mais problemático, no entanto, é que apenas uma pequena fração dos pontos encontra-se nas regiões mais favorecidas (cerca de 34%), enquanto que a maioria (cerca de 47%) encontra-se em regiões adicionalmente permitidas. Além

de outra grande parcela estar distribuída em regiões generosamente permitidas ou totalmente proibidas, indicando conformações estericamente improváveis.

Com base nas informações obtidas por essas análises, foi construída então uma nova lista, excluindo-se inicialmente os valores atípicos e foram realizadas novas análises com o programa QUEEN. A Figura 3.18a mostra o gráfico de informação única por informação média, onde se pode observar que as restrições do agrupamento *B* passaram a ter, nessa nova lista, valores de informação média próximos de 10, o que seria esperado, uma vez que essas são as únicas restrições que dizem respeito à estrutura quaternária do peptídeo e que o programa QUEEN leva em conta todas as informações de fundo durante a análise, ou seja, o conteúdo de informação de cada restrição nunca é considerado de forma independente em relação às demais restrições ou às constrições inerentes à própria estrutura (comprimentos e ângulos de ligação, por exemplo). Além disso, percebe-se com maior clareza a dispersão dos dados, com restrições para ambos os valores de unicidade e informação média relativamente altos (maiores que 1). Essas restrições, apresentadas nas Figuras 3.18a e 3.18b, e listadas na Tabela 3.13 (p. 91), no entanto, são tipos de restrição comumente observados em estruturas ricas em α -hélice, o que é o caso da distinctina, como pode-se inferir pelo estudo de dicroísmo circular.

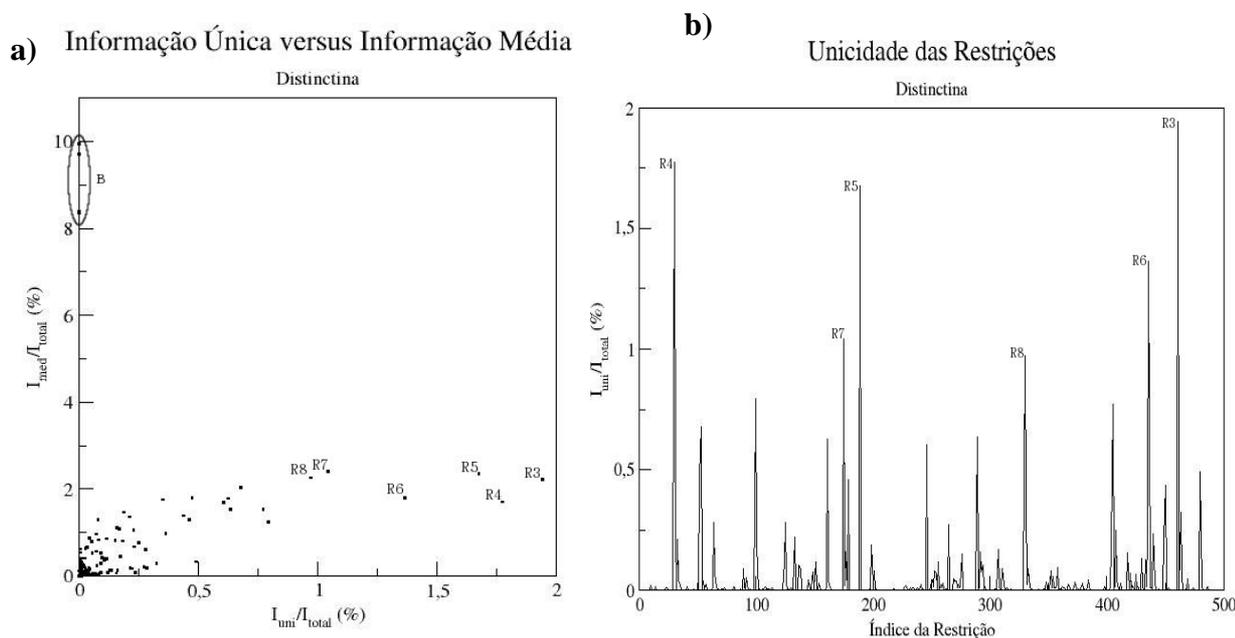


Figura 3.18. (a) Gráfico de informação única por informação média para a segunda lista de restrições da distinctina, mostrando os pontos relativos às restrições com os maiores valores de informações única e média, destacando o agrupamento *B* presente também na Figura 3.16a (p. 91). (b) Gráfico de unicidade pelo índice de cada restrição, mostrando as duas restrições com os maiores valores de informação única.

Tabela 3.13. Relação das restrições destacadas nas Figuras 3.18a e 3.18b, relativa à lista de restrições da distinctina, com seus respectivos valores de informação média (I_{med}), informação única ou unicidade (I_{uni}) e limite superior de distância (l_{sup})

Restrição	Descrição da Restrição	I_{med}	I_{uni}	l_{sup} (Å)
R_3	C45 HN/L42 HA	2,21	1,94	5,00
R_4	P6 HD#/R3 HB#	1,70	1,70	2,80
R_5	K18 HA/I21 HN	2,35	1,68	2,80
R_6	H39 HA/L42 HB#	1,80	1,36	2,80
R_7	K18 HN/K14 HA	2,40	1,04	5,00
R_8	L35 HN/A31 HA	2,26	0,97	2,80

A restrição R_3 envolve o resíduo de aminoácido C45, que participa da ligação dissulfeto com o resíduo C19 e a restrição R_7 também envolve um resíduo próximo à ligação dissulfeto, K18. Essas regiões próximas aos resíduos de cisteína nesse peptídeo têm uma tendência em apresentar um grau de distorção e, também de mobilidade. Isso leva a uma menor estruturação dessa área e, por consequência, um menor número de correlações NOE. Isso, logicamente, leva a um menor número de restrições nessas regiões e, dessa forma, qualquer restrição encontrada nas proximidades da ligação dissulfeto terá um grau maior de informação. A restrição R_7 em especial, por si só já carregaria uma informação estrutural maior, uma vez que ela é do tipo $\alpha N(i, i + 4)$, característica apenas de estruturas do tipo α -hélice. Dessa forma, para definir melhor a estrutura do peptídeo seria necessário obter experimentalmente outras restrições geométricas, como restrições angulares, de ligação de hidrogênio e orientacionais. A restrição R_4 também diz respeito a uma região potencialmente menos estruturada, devido à presença de dois resíduos de prolina. Sendo assim, a restrição pode tanto ser a única relevante encontrada nessa região ou o sinal que originou essa restrição pode ter sido originado de trocas conformacionais, que são frequentes em regiões sem estrutura secundária definida. Essas restrições, portanto, merecem uma análise mais detalhada, conforme o proposto adiante.

As restrições R_5 , R_6 e R_8 , por sua vez, são restrições comumente encontradas em espectros NOESY de peptídeos e proteínas essencialmente α -helicoidais, porém o valor de limite superior de distância (l_{sup}) dessas restrições é demasiado baixo para estruturas helicoidais regulares. Observando-se, ainda, as restrições simétricas a essas (cujas correlações NOE foram

atribuídas do outro lado da diagonal do mapa de contornos), percebem-se discrepâncias entre os valores de l_{sup} entre elas. A restrição simétrica a R_5 tem um valor de l_{sup} igual a 2,80 Å, enquanto que as simétricas a R_6 e R_8 têm valores de l_{sup} iguais a 5,00 Å (dados não mostrados). Essa diferença entre os limites superiores pode dever-se ao fato de haver distorções de linha de base ou sobreposições ao sinal em apenas um dos lados da diagonal, prejudicando a integração dos NOEs.

Esses resultados foram, durante todo o processo de triagem das restrições, analisados juntamente com as violações encontradas e com os dados de saída do *iCing*. A lista final obtida pelas análises foi utilizada para os cálculos, sendo que, no caso das restrições com limite superior diferente dos seus simétricos, foi considerada em cada lista ou a restrição ou a sua simétrica, para verificar qual seria a mais coerente em relação ao conjunto total de restrições. Essa estratégia permitiu que se chegasse a um conjunto de restrições mutuamente coerentes e que fossem capazes de definir com resolução relativamente alta um conjunto de estruturas do peptídeo. A cada cálculo, foi também verificada a resolução de cada conjunto de estruturas por meio do RMSD e da variância circular.

Na lista utilizada para o cálculo final foram consideradas 258 correlações intrarresiduais, 83 correlações sequenciais, 66 correlações à distância média e 2 correlações à distância longa. As correlações convencionais (*i.e.* correlações comumente encontradas em estruturas secundárias definidas) do tipo sequencial e à distância média para as Cadeias 1 e 2 estão resumidas nas Figuras 3.19a e 3.19b (p. 93), respectivamente. Todas as correlações à distância longa foram correlações intercadeia, sendo elas as seguintes: C45 HB#/C19 HA e C45 HN/C19 HA, sendo que ambas resultaram em sinais fracos de NOE, gerando, portanto, restrições com limite superior de distância de 5,00 Å. Foram encontradas as seguintes correlações não convencionais envolvendo os resíduos P6 e F9: P6 HD# / F9 HA e F9 HN / P6 HD#. Ambas as correlações deram origem a restrições com limites superiores de distância de 5,00 Å.

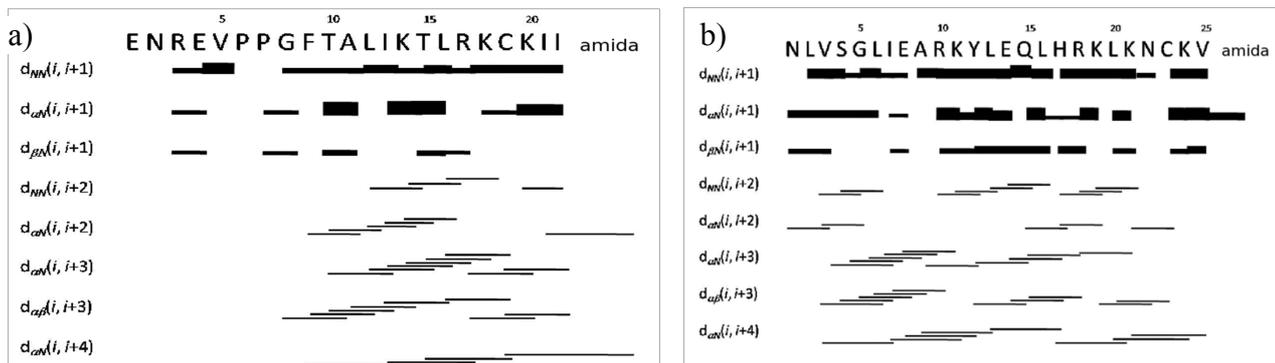


Figura 3.19. Tabela de NOEs com as restrições características de estrutura secundária α -hélice de **a)** Cadeia 1 e **b)** Cadeia 2 da distinctina.

A Figura 3.20 e a Tabela 3.14 (p. 94) mostram a análise de informação nas restrições da lista utilizada para o cálculo final do conjunto de estruturas da distinctina. Pode-se perceber que as restrições que contêm os maiores valores de informação única são as restrições do tipo αN ($i, i+4$) que, como foi dito anteriormente, são restrições características de α -hélice. Como não foi utilizado no cálculo nenhum outro tipo de restrição que defina essa estrutura secundária, é esperado que essas restrições conttenham um maior grau de informação.

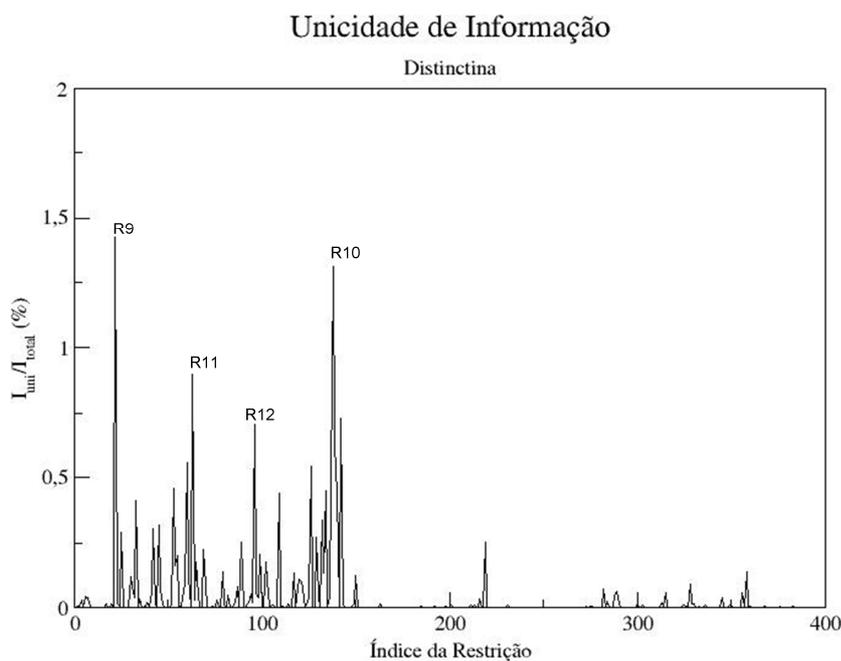


Figura 3.20. Gráfico de unicidade pelo índice de cada restrição na lista utilizada para o cálculo final da distinctina, mostrando as restrições com os maiores valores de informação única.

Tabela 3.14. Relação das restrições destacadas na **Figura 3.20** com seus respectivos valores de informação única, ou unicidade, (I_{uni}), e limite superior de distância (l_{sup})

Restrição	Descrição da Restrição	I_{uni}	l_{sup} (Å)
R9	A9 HA/I13 HN	1,42	5,00
R10	A44 HN/R40 HA	1,31	5,00
R11	K18 HA/I22 HN	0,90	5,00
R12	C45 HA/L42 HA	0,73	5,00

O conjunto das vinte estruturas mais estáveis desse cálculo está representado na Figura 3.21. 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 estruturas contendo as duas cadeias como um todo. No entanto, a sobreposição individual das cadeias mostra que elas, quando consideradas separadamente, apresentam-se bem definidas, com valores RMSD de 0,67 Å e 1,01 Å para as Cadeias 1 e 2, respectivamente. Para a distinctina como um todo, foram observados valores de RMSD de 3,48 Å, valor bastante alto, devido à pouca orientação entre as cadeias.

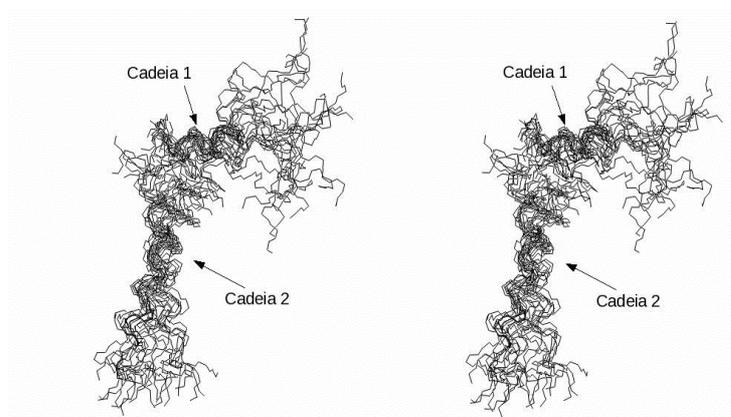


Figura 3.21. Conjunto das 20 estruturas mais estáveis da distinctina, com melhor sobreposição, calculadas utilizando a lista final, com o protocolo de arrefecimento simulado.

Após o fim do cálculo, o conjunto das vinte estruturas mais estáveis foi submetido à validação pelo servidor *iCing*, conforme mostrado na Figura 3.22 (p. 96). A Figura 3.22a (p. 96) mostra que estão ainda presentes vários resíduos de aminoácido com estruturação possivelmente incorreta (indicados em vermelho) e com qualidade média (indicados em laranja). No entanto, nesse conjunto de estruturas, já se pode perceber maior quantidade de resíduos com estruturação

boa (em verde), em comparação com o primeiro conjunto de estruturas calculadas. Pode-se notar, também, que os resíduos em vermelho concentram-se em regiões específicas. Na Cadeia 1, esses resíduos com piores estruturações estão presentes próximo à dobra na cadeia principal, na região das prolinas, inferida pelos NOEs encontrados nesse segmento, e também nas proximidades da extremidade *C*-terminal. Na Cadeia 2, os resíduos presentes em regiões de conformações consideradas erradas ou improváveis estão próximos às terminações, exceto os resíduos G7 e L28. Os resíduos com a cor laranja podem ser resultado das limitações em serem obtidas mais restrições (de distância ou não) devido ao grande número de sobreposições entre os sinais nos mapas de contorno. Em relação aos resultados do WHATIF, representados na Figura 3.22b (p. 96), pode-se também perceber uma melhora significativa, especialmente na normalidade da cadeia principal, embora se possa observar uma ligeira melhora também nos parâmetros de qualidade do diagrama de Ramachandran e na qualidade de empacotamento. Entretanto, não se pode dizer que houve melhoras no *Z-score* de Janin. De fato, muitas vezes os métodos de arrefecimento simulado não mostram muita eficiência na estabilização de conformações de cadeias laterais (Spronk *et al.*, 2004). O diagrama de Ramachandran na Figura 3.22c (p. 96) possibilita uma visão melhor do aumento de qualidade em relação ao primeiro conjunto calculado. Nele, os pontos encontram-se mais agregados na região de típica α -hélice, sendo que 73,6% dos pontos encontram-se nas regiões mais favorecidas do diagrama, e apenas 5,1% estão situados em regiões generosamente permitidas ou proibidas.

a) **Análise Baseada nos Resíduos de Aminoácido**

Cadeia 1

1-9	GLU1	ASN2	ARG3	GLU4	VAL5	PRO6	PRO7	GLY8	THR9
10-19	THR10	ALA11	LEU12	ILE13	LYS14	THR15	LEU16	ARG17	LYS18
20-29	LYS20	ILC21	ILC22						CYS19

Cadeia 2

23-29			ASN23	LEU24	VAL25	SER26	GLY27	LEU28	ILE29
30-39	GLU30	ALA31	ARG32	LYS33	TYR34	LEU35	GLU36	GLN37	LEU38
40-49	ARG40	LYS41	LEU42	LYS43	ASN44	CYS45	LYS46	VAL47	

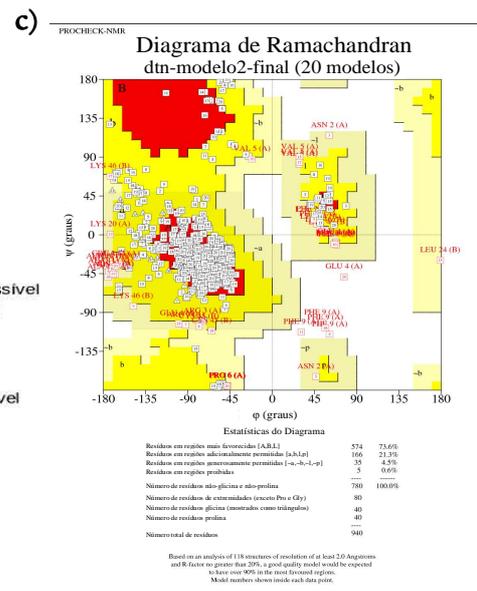
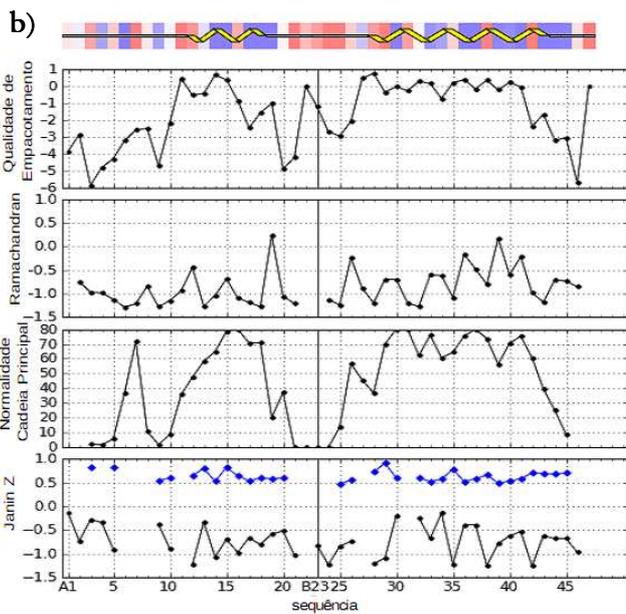


Figura 3.22. Resultados da análise de qualidade estrutural e validação dos modelos calculados para a distinctina utilizando-se a última lista de restrições. **(a)** Resumo da análise para cada resíduo de aminoácido. As cores verde, laranja e vermelho representam, respectivamente, estrutura de boa qualidade, estrutura de qualidade mediana ou região com pouca informação estrutural e estrutura de qualidade baixa, ou pouco comum. **(b)** Resultados do programa WHATIF, relativos à qualidade de empacotamento, *Z-score* do gráfico de Ramachandran e de Janin, e normalidade da cadeia principal e dos rotâmeros. **(c)** Diagrama de Ramachandran, obtido pelo programa PROCHECK. Cada ponto corresponde a um determinado resíduo de algum dos vinte modelos. Os pontos que se encontram em regiões generosamente favorecidas e em regiões proibidas são representados em vermelho.

Finda a análise de validação, procedeu-se ao refinamento das 200 estruturas calculadas. Novamente, escolheram-se as vinte estruturas mais estáveis para compor o modelo da distinctina que se encontra representado na Figura 3.23. À primeira vista, já se pode perceber maior variação conformacional, resultando em uma diminuição na precisão do conjunto de estruturas. Essa diminuição pode ser observada tanto para a distinctina em sua totalidade (que passou a ter um RMSD de 3,73 Å), como para as cadeias separadas (com valores de RMSD de 0,77 Å e 1,80 Å, para

as Cadeias 1 e 2, respectivamente). A diminuição da precisão dos conjuntos de estruturas considerando-se as cadeias individuais pode dever-se ao fato de as formas em α -hélice presentes nos modelos serem anfipáticas, o que dificulta sua estabilização em meios puramente aquosos, ao contrário do que ocorreria em meios ricos em TFE ou em fosfolipídeos. Sendo assim, um refinamento em água poderia causar uma desestabilização de estruturas desse tipo, especialmente em regiões pouco definidas por restrições derivadas de dados de RMN, que estão mais suscetíveis a características do campo de força aplicado durante o cálculo. Em contrapartida, apesar de ser muitas vezes tido como não desejável pela literatura de RMN, o aumento dos valores de RMSD pode ser também interpretado como uma característica positiva, uma vez que a amostragem conformacional da molécula no espaço também aumenta. Isso é particularmente importante, uma vez que muitas estruturas com valores de RMSD baixos superestimam a precisão do experimento, subestimando a característica dinâmica da molécula no sistema estudado.

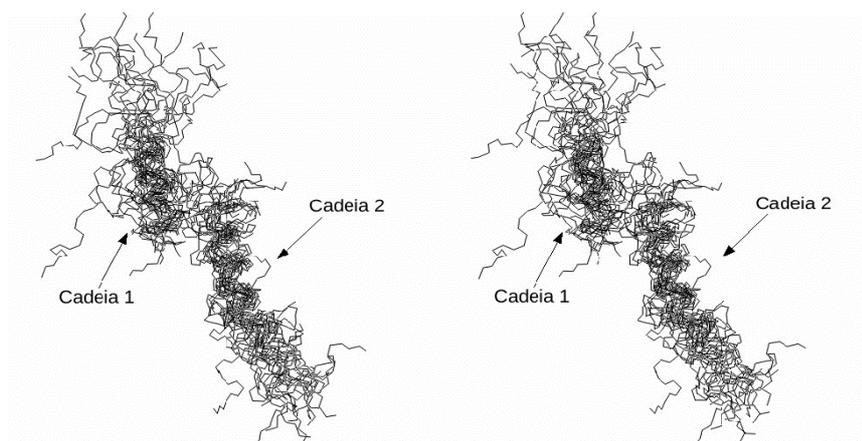


Figura 3.23. Visão estereoespacial do conjunto das 20 estruturas mais estáveis da distinctina, com melhor sobreposição, calculadas utilizando a lista final, com o protocolo de arrefecimento simulado.

Porém, o resultado mais significativo, foi a qualidade estrutural da molécula do peptídeo, como mostra a Figura 3.24 (p. 99). Percebeu-se uma melhora considerável na qualidade total da molécula, caracterizado por mais resíduos de aminoácido representados em verde na Figura 3.24a (p. 99). A qualidade de empacotamento e a do diagrama de Ramachandran apresentaram melhoras consideráveis, bem como a normalidade da cadeia principal e as distribuições dos ângulos diedros de cadeias laterais (Figura 3.24b, p. 99). A melhora da qualidade da estruturação da cadeia principal, no entanto, é melhor percebida pelo diagrama de Ramachandran da Figura

3.24c (p. 99). Observa-se uma distribuição angular bem mais coerente com a forma helicoidal inferida pelos experimentos de CD, com os pontos bem mais aglomerados na região característica de α -hélice. Além disso, percebe-se uma população maior em regiões mais favorecidas (80,1%) em comparação com os resultados de validação obtidos anteriormente. Além de o refinamento ter aumentado a população de pontos nas regiões mais favorecidas do diagrama de Ramachandran, percebeu-se o comportamento inverso para as regiões generosamente favorecidas e proibidas, que, neste caso, possuem juntas apenas 3,7% do total de pontos. Desconsiderando-se as extremidades e as proximidades dos resíduos de prolina, tem-se 93,7% de pontos em regiões mais favoráveis e apenas 1,2% dos pontos em regiões desfavoráveis, valores característicos de modelos de alta qualidade estrutural.

a) Análise Baseada nos Resíduos de Aminoácido

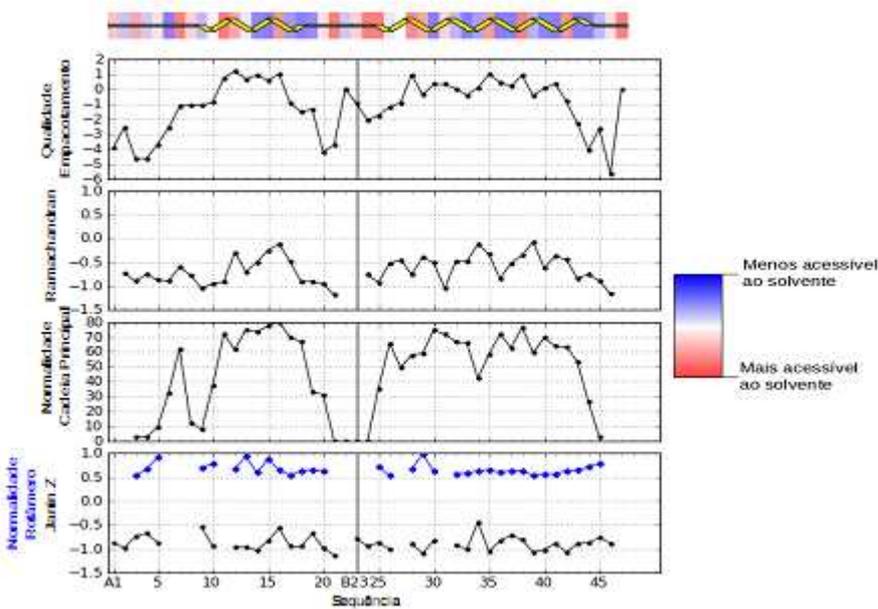
Cadeia 1

1-9	GLU1	ASN2	ARG3	GLU4	VAL5	PRO6	PRO7	GLY8	PHE9
10-19	THR10	ALA11	LEU12	LYS14	THR15	LEU16	ARG17	LYS18	CYS19
20-29	LYS20	ILE21	ILE22						

Cadeia 2

23-29			ASN23	LEU24	VAL25	SER26	GLY27	LEU28	ILE29	
30-39	GLU30	ALA31	ARG32	LYS33	TYR34	LEU35	GLU36	GLN37	LEU38	HISE39
40-49	ARG40	LYS41	LEU42	LYS43	ASN44	CYS45	LYS46	VAL47		

b)



c)

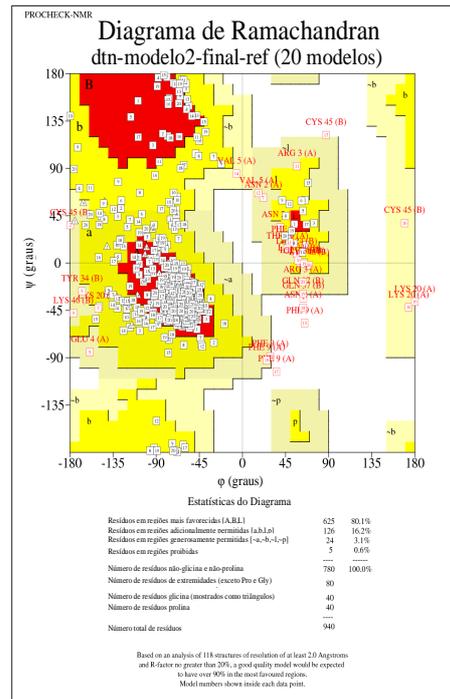


Figura 3.24. Resultados da análise de qualidade estrutural e validação dos modelos calculados para a distinctina utilizando-se a última lista de restrições e posteriormente refinados em água. **(a)** Resumo da análise para cada resíduo de aminoácido. As cores verde, laranja e vermelho representam, respectivamente, estrutura de boa qualidade, estrutura de qualidade mediana ou região com pouca informação estrutural e estrutura de qualidade baixa, ou pouco comum. **(b)** Resultados do programa WHATIF, relativos à qualidade de empacotamento, *Z-score* do gráfico de Ramachandran e de Janin, e normalidade da cadeia principal e dos rotâmeros. **(c)** Diagrama de Ramachandran, obtido pelo programa PROCHECK. Cada ponto corresponde a um determinado resíduo de algum dos vinte modelos. Os pontos que se encontram em regiões generosamente favorecidas e em regiões proibidas são representados em vermelho.

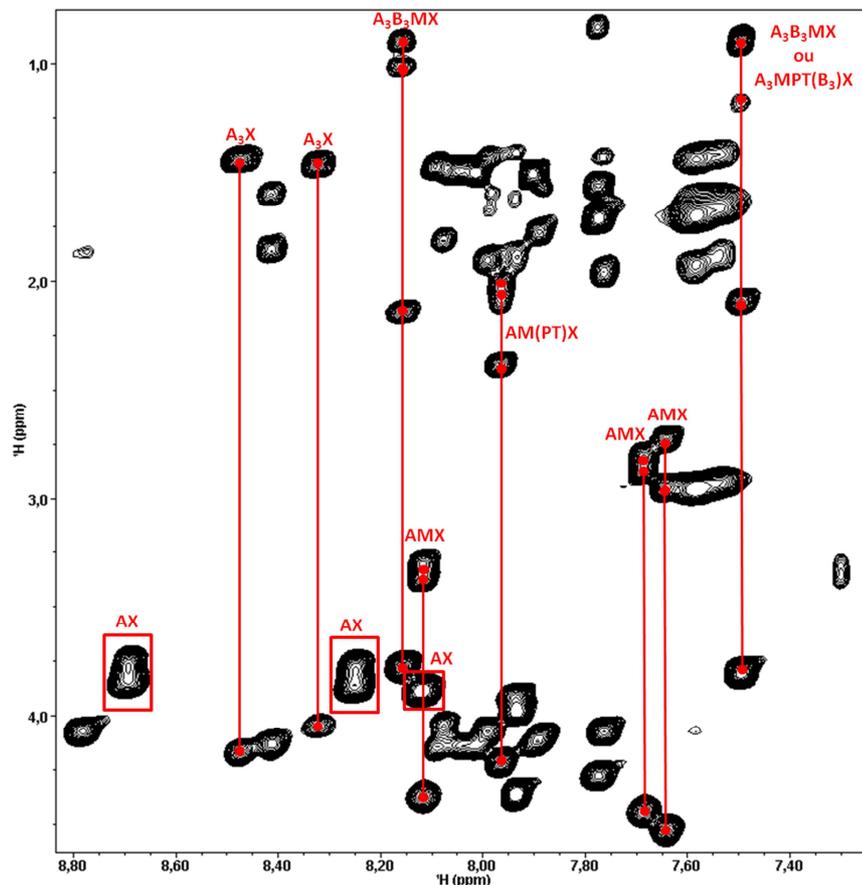
Esse resultado permite apontar as regiões tidas como problemáticas pelas técnicas de validação. As extremidades das cadeias peptídicas em geral apresentam maior grau de liberdade em relação aos segmentos mais estruturados dos peptídeos. Como nessas regiões normalmente são encontrados poucos dados que levem a restrições geométricas, o protocolo de arrefecimento simulado muitas vezes encontra mínimos de energia que não são necessariamente realistas, uma

vez que, devido às baixas restrições experimentais, as conformações desses segmentos dependem muito mais do campo de força aplicado durante o cálculo, em comparação às demais regiões. Tanto a região próxima ao resíduo de prolina, onde se localiza uma dobra acentuada na cadeia principal, quanto as vizinhas à ligação dissulfeto apresentam, também, um grau de liberdade relativamente alto. No entanto, esses segmentos são, além disso, pouco comuns, o que lhes confere uma problemática maior na etapa de validação estrutural. O fato de se tratarem de estruturas pouco convencionais permite que estes segmentos sejam muitas vezes classificados como incorretos em vez de simplesmente incomuns. Isso ocorre porque a maior parte dos métodos de validação leva bastante em conta bancos de dados com diversas estruturas em resolução alta de proteínas. As conformações presentes nessas estruturas proteicas dos bancos de dados são consideradas corretas, enquanto que conformações locais diferentes das observadas nessas estruturas são consideradas incorretas. Sendo assim, não se pode afirmar que as estruturas dessas regiões estejam corretas com base somente na afirmação de que se tratam de conformações pouco usuais, mas também não se devem descartar as evidências desse tipo de estruturação observadas nos experimentos de RMN.

Embora o modelo final calculado não possa ainda representar de modo fiel a molécula do peptídeo estudado, pode-se certamente afirmar que uma boa parcela da estrutura do peptídeo já foi elucidada. Entretanto, futuros experimentos são necessários, principalmente para determinar a orientação relativa entre as duas cadeias. Para tal, deve-se pesquisar um meio que diminua a variação conformacional do peptídeo. Isso pode ser conseguido tanto variando-se parâmetros como temperatura, pH e natureza do tampão, por exemplo, como introduzindo-se bicelas para forçar uma certa orientação no peptídeo, possibilitando, assim, a aquisição de dados de acoplamento dipolar residual, que podem ser convertidos em restrições orientacionais. Além disso, seria interessante realizar experimentos que forneçam outros tipos de restrição, como experimentos heteronucleares de melhor resolução, para que se possam obter com maior precisão os valores de deslocamento químico para serem convertidos em restrições angulares, ou experimentos de COSY-DQF ou *Phase Sensitive* COSY, que também podem fornecer valores de restrições angulares e experimentos que possibilitem o cálculo de restrições de ligação de hidrogênio.

3.3.2. Determinação Estrutural da Hilasptina P2 (HSP2)

A atribuição dos sinais nos mapas de contorno relativos ao peptídeo HSP2 deu-se seguindo a estratégia de atribuição sequencial proposta por Wuthrich (Wüthrich, 1986). Dessa forma, primeiramente, foram identificados os padrões de *spin* característicos no mapa de contornos TOCSY. A Figura 3.25 mostra a região em que se observam correlações dos hidrogênios *alfa* e de cadeias laterais com os hidrogênios amídicos de cada aminoácido. Como a transferência de magnetização que dá origem ao mapa de contornos TOCSY ocorre somente entre átomos de carbono hidrogenados, as correlações observadas nesse experimento são apenas intrarresidual, ou seja, cada sistema de spin observado na região que a Figura 3.25 compreende refere-se apenas a um resíduo de aminoácido, pois entre cada resíduo há uma carbonila, pertencente à ligação peptídica. Sendo assim, é possível identificar claramente sistemas de *spin* e atribuí-los a certos aminoácidos.



G I G D I L K N L A K A A G K A A L H A V G E S L -NH₂
Figura 3.25. Sistemas de spins característicos na região do mapa de contornos TOCSY do peptídeo HSP2, em que se encontram as correlações intrarresiduais de hidrogênios *alfa* e de cadeias laterais com hidrogênios amídicos das ligações peptídicas (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE-*d*₂ em H₂O).

Conforme mostrado na Figura 3.25 (p. 101), alguns sistemas de spin característicos podem ser prontamente identificados no mapa de contornos TOCSY. Os três sistemas de spin do tipo AX correspondem aos três resíduos de glicina (G3, G14 e G22), sendo que é esperado que correlações referentes ao resíduo *N*-terminal (G1) não apareçam no mapa de contornos TOCSY, devido à alta mobilidade normalmente apresentada por resíduos nas extremidades de cadeias polipeptídicas. Dois sistemas de *spin* do tipo A_3X também podem ser facilmente identificados e corresponderiam a dois resíduos de alanina. Entretanto, devido à grande quantidade desse tipo de resíduo na sequência polipeptídica (seis resíduos de alanina no total), não é possível determinar a qual deles correspondem os sistemas de spin identificados.

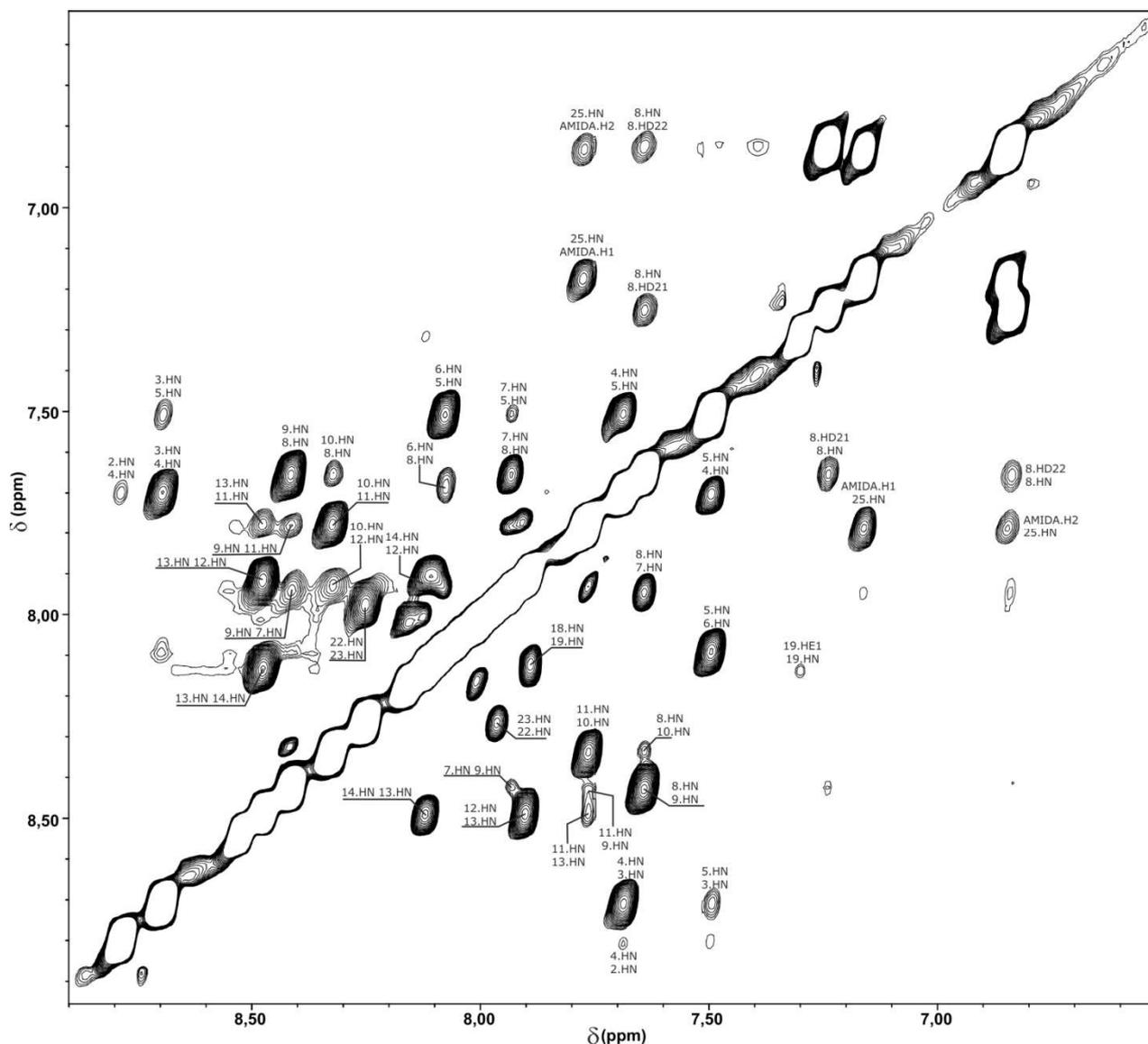
Um sistema do tipo A_3B_3MX é verificado nas correlações envolvendo o hidrogênio amídico relativo ao deslocamento químico 8,16 ppm, e é bastante característico de resíduos de valina. No caso, esse sistema corresponderia ao resíduo V21. Correlações envolvendo o hidrogênio amídico com deslocamento químico em 7,50 ppm poderia apresentar também um sistema de *spin* do tipo A_3B_3MX . porém, devido ao fato de uma das correlações corresponder a um sinal de intensidade menor que os demais (correlação do hidrogênio amídico com o hidrogênio de deslocamento químico 1,18 ppm), é possível que se trate de um sistema de *spin* do tipo $A_3MPT(B_3)X$, característico de resíduos de isoleucina, podendo corresponder, *a priori*, tanto ao resíduo I2 quanto ao I5. O fato de o sistema de *spin* referente ao hidrogênio com deslocamento químico 8,16 ppm estar muito bem definido, corrobora a hipótese de que o outro sistema de *spin* seja referente a um resíduo de isoleucina.

Três sistemas de *spin* do tipo AMX podem ser facilmente identificados, conforme mostrado na Figura 3.25 (p. 101), correspondendo aos resíduos D4, N8, H19, ou S24. Por fim, um sistema de *spin* do tipo A_3B_3MX relativo a correlações envolvendo o hidrogênio amídico de deslocamento químico 7,96 ppm é verificado nessa região do mapa de contornos. Sistemas de *spin* desse tipo são característicos de resíduos de glutamina, ácido glutâmico e metionina. Como existe apenas um resíduo de ácido glutâmico na sequência de HSP2, esse sistema de *spin* corresponde ao resíduo E23.

Além da análise dos padrões TOCSY descrita acima, a identificação dos sistemas de *spin* foi feita considerando-se também os deslocamentos químicos tendo como base as análises estatísticas apresentadas no banco de dados BMRB (*Biological Magnetic Resonance Data Bank*, <http://www.bmrb.wisc.edu>).

A identificação dos resíduos pode ser feita por meio das correlações observadas no mapa de contornos NOESY, em especial as correlações do tipo sequencial, do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$. Além disso, como se sabe que o peptídeo adota uma estrutura secundária do tipo α -hélice, é possível utilizar correlações NOE características desse tipo de conformação, tais como $d_{NN}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 3)$, $d_{\alpha N}(i, i + 4)$ e $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$, como forma de identificação de determinados resíduos. As regiões do mapa de contornos NOESY em que se encontram estas correlações estão mostradas na Figura 3.26 (p. 104, região que compreende correlações do tipo d_{NN}), Figura 3.27 (p. 105, correlações do tipo $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$) e Figura 3.28 (p. 106, correlações do tipo $d_{\alpha\beta}$). Dessa maneira, o resíduo E23 identificado no mapa de contornos TOCSY apresenta uma correlação NOE sequencial do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$ (Fig. 3.26, p. 104) com o resíduo de sistema de *spin* AX (característico de resíduos de glicina) com deslocamento químico do hidrogênio amídico de 8,25 ppm, sendo, portanto, possível identificar o resíduo G22.

O resíduo G22, por sua vez, apresenta uma correlação do tipo $d_{\beta N}(i, i + 1)$ (Fig. 3.27, p. 105) com o resíduo de sistema de *spin* A_3B_3MX , identificado como V21, confirmando, assim, a atribuição previamente proposta. É possível ainda, identificar uma correlação do tipo $d_{\alpha N}$ com o resíduo de sistema de *spin* do tipo AMX com deslocamento químico de hidrogênio amídico de 8,12 ppm, caracterizando-se, assim, uma correlação NOE $d_{\alpha N}(i, i + 3)$, e propiciando a identificação do resíduo H19.



G I G D I L K N L A K A A G K A A L H A V G E S L -NH₂

Figura 3.26. Região do mapa de contornos NOESY de HSP2 (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE-*d*₂ em H₂O) mostrando conectividades inter-residuais dos tipo d_{NN} .

Correlações do tipo $d_{\beta N}(i, i + 1)$ envolvendo os hidrogênios *beta* de H19 tornaram possível a identificação do deslocamento químico do hidrogênio amídico do resíduo A20. O deslocamento químico do hidrogênio *alfa* desse resíduo pôde ser identificado por meio da correlação $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ envolvendo os sinais relativos ao resíduo E23 (Fig. 3.28, p. 106). O resíduo L18 pôde ser identificado pelas correlações do tipo $d_{\beta N}(i, i + 1)$ (Fig. 3.27, p. 105) e $d_{NN}(i, i + 1)$ (Fig. 3.26) com os hidrogênios da H19 e $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ com os átomos de hidrogênio da V21 (Fig. 3.28, p. 106).

Embora seja possível atribuir o hidrogênio *alfa* da A16, pela correlação $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ com a H19 (Fig. 3.28, p. 106), as regiões em que se encontram as correlações relativas aos resíduos de aminoácidos K15, A16 e A17 apresentam muitas sobreposições de sinais, prejudicando, portanto, a atribuição desses resíduos de aminoácido. No entanto, é possível identificar uma correlação do tipo $d_{\alpha N}$ entre a L18 e o resíduo de aminoácido com sistema de *spin* AX cujo hidrogênio amídico apresenta deslocamento químico de 8,12 ppm (Fig. 3.27, p. 110). Esta correlação apresenta intensidade relativamente baixa, o que é bastante comum em NOEs do tipo $d_{\alpha N}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 4)$ em estruturas α -helicoidais. Analisando-se a sequência de aminoácidos de HSP2, pode-se atribuir esse sistema de *spin* AX ao resíduo G14 e confirmar a correlação em questão como sendo do tipo $d_{\alpha N}(i, i + 4)$.

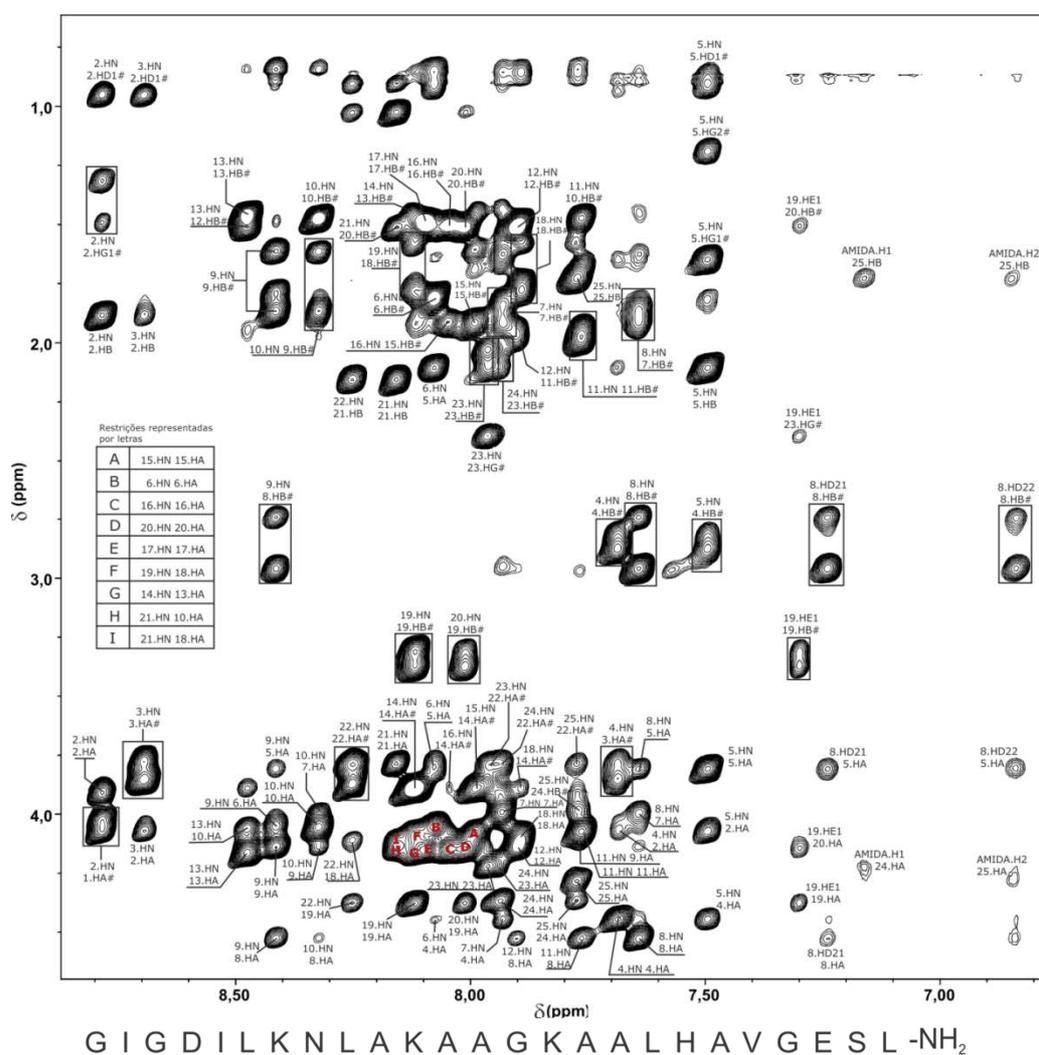


Figura 3.27. Região do mapa de contornos NOESY de HSP2 (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE- d_2 em H₂O) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$.

O hidrogênio amídico do resíduo G14, por sua vez, apresenta correlação do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$ com o hidrogênio amídico (de deslocamento químico 8,48 ppm) pertencente a um sistema de spin do tipo A_3X , característico de resíduos de alanina, sendo possível, portanto afirmar que este sistema de spin corresponde ao resíduo A13. Ainda levando-se em conta as correlações com a G14, é possível identificar uma correlação do tipo $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ com a K15 que, por sua vez, apresenta uma correlação do tipo $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com a A16, possibilitando a atribuição do hidrogênio amídico deste último. A A17 pôde ser identificada a partir da correlação entre seus hidrogênios *beta* e os hidrogênios *alfa* da G14, caracterizando um NOE do tipo $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$. Os hidrogênios amídico e *alfa* da A17 podem ser facilmente atribuídos pelo mapa de contornos TOCSY, através da identificação do sistema de *spin* A_3X .

O hidrogênio amídico do resíduo A13, por sua vez, apresenta correlações do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$ com o hidrogênio amídico da A12 e $d_{NN}(i, i + 2)$ com a K11 (Fig. 3.26, p. 104). A atribuição da K11 é confirmada pela presença de uma correlação do tipo $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com A12 (Fig. 3.27, p. 105). Este tipo de correlação também é identificada entre os resíduos K11 e A10, permitindo a atribuição deste último, que é confirmada por outras correlações envolvendo o resíduo A10, como $d_{NN}(i, i + 1)$ com K11 (fig. 3.26, p. 104) e $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ com o resíduo A13 (fig. 3.27, p. 105).

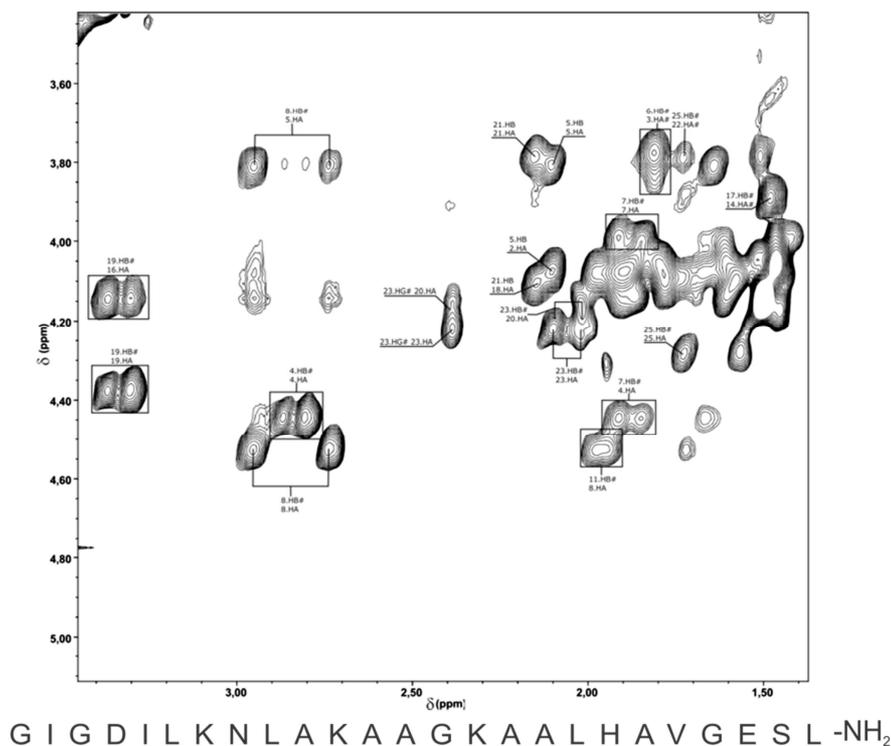


Figura 3.28. Região do mapa de contornos NOESY de HSP2 (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE- d_2 em H₂O) mostrando conectividades inter-residuais dos tipo $d_{\alpha\beta}$.

O resíduo L9 foi identificado com base nas correlações do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com o resíduo A10 (Figs. 3.26, p. 104, e 3.27, p. 105, respectivamente) e o resíduo N8, através dos NOEs com os resíduos L9 ($d_{NN}(i, i + 1)$, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$), A10 ($d_{NN}(i, i + 2)$, $d_{\alpha N}(i, i + 2)$), A11 ($d_{\alpha N}(i, i + 3)$ e $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$) e A12 ($d_{\alpha N}(i, i + 4)$), além do próprio sistema de *spin* do tipo AMX, condizente com o resíduo de asparagina. Devido ao fato de não haver sobreposição de sinais com as correlações envolvendo N8, foi possível atribuir diversas correlações com outros resíduos, possibilitando a identificação destes. Essas correlações são: $d_{NN}(i, i + 1)$ com a K7 (Fig. 3.26, p. 104), $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ com K7 e I5, respectivamente (Fig. 3.27, p. 105), $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ com I5 (Fig. 3.28, p. 106) e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com K7 (Fig. 3.27, p. 105). O resíduo I6 pôde ser atribuído com base nos NOEs $d_{NN}(i, i + 1)$ com K7 e I5 (Fig. 3.26, p. 104), $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ com I5 e L9, respectivamente, e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com I5.

Correlações envolvendo o resíduo I5 também permitiram a identificação de diversos outros sinais e, por consequência, de outros resíduos de aminoácidos. As correlações envolvendo I5 foram: $d_{NN}(i, i + 1)$ e $d_{NN}(i, i + 2)$, com D4 e G3, respectivamente (Fig. 3.26, p. 104), $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\alpha N}(i, i + 3)$ com D4 e I5, respectivamente (Fig. 3.27, p. 105), $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ com I2 (Fig. 3.28, p. 111) e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ com D4 (Fig. 3.27, p. 104). As atribuições relativas a D4 puderam ser confirmadas pelo sistema de *spin* AMX apresentado (Fig. 3.25, p. 106, deslocamento químico do hidrogênio amídico de 7,68 ppm) e com correlações do tipo $d_{NN}(i, i + 1)$ com G3 (Fig. 3.26, p. 104) e $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\alpha N}(i, i + 2)$ com G3 e I2, respectivamente (Fig. 3.27, p. 104).

As atribuições relativas a G3 e I2 foram confirmadas pelos NOEs entre esses dois resíduos, sendo-os, especificamente, $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ (Fig. 3.27, p. 105). No mapa de contornos NOESY apenas, observou-se uma correlação de um resíduo de sistema de *spin* AX com o hidrogênio amídico de I2. Atribuíram-se estes sinais ao resíduo G1, dada a correlação $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ (Fig. 3.27, p. 105) e o sistema de *spin* característico de resíduos de glicina.

O resíduo L25 pôde ser identificado pelas correlações $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$ com G22 (Fig. 3.28, p. 106) e $d_{NN}(i, i + 1)$ com dois átomos de hidrogênio de deslocamentos químicos 6,85 ppm e 7,16 ppm, que foram identificados como sendo aqueles pertencentes à carboxamida terminal. Além disso, L25 ainda apresenta correlações do tipo $d_{\alpha N}(i, i + 1)$ e $d_{\beta N}(i, i + 1)$ (Fig. 3.27, p. 105) com um resíduo de aminoácido cujo sistema de *spin* é do tipo AMX. Além disso, os valores de deslocamento químico de seus hidrogênios *beta* são relativamente altos, se comparados com os valores usualmente encontrados em outros resíduos de aminoácido (os valores obtidos foram

3,97 ppm e 3,98 ppm). Esses altos valores de deslocamento químico de hidrogênios pertencentes a um grupo metileno são característicos de resíduos de serina. Dessa maneira, o resíduo S24 pôde ser, por fim, atribuído.

Todos os resíduos puderam, assim, ser atribuídos com base nessa análise, como se observa na Figura 3.29, que representa a região relativa às correlações intrarresiduais de hidrogênios amídicos com os demais hidrogênios de cada resíduo de aminoácido do mapa de contornos TOCSY. O resumo das correlações NOE sequenciais e características de estruturas α -hélice, que foram utilizadas para a determinação da estrutura tridimensional de HSP2, é apresentado na Figura 3.30, p. 109.

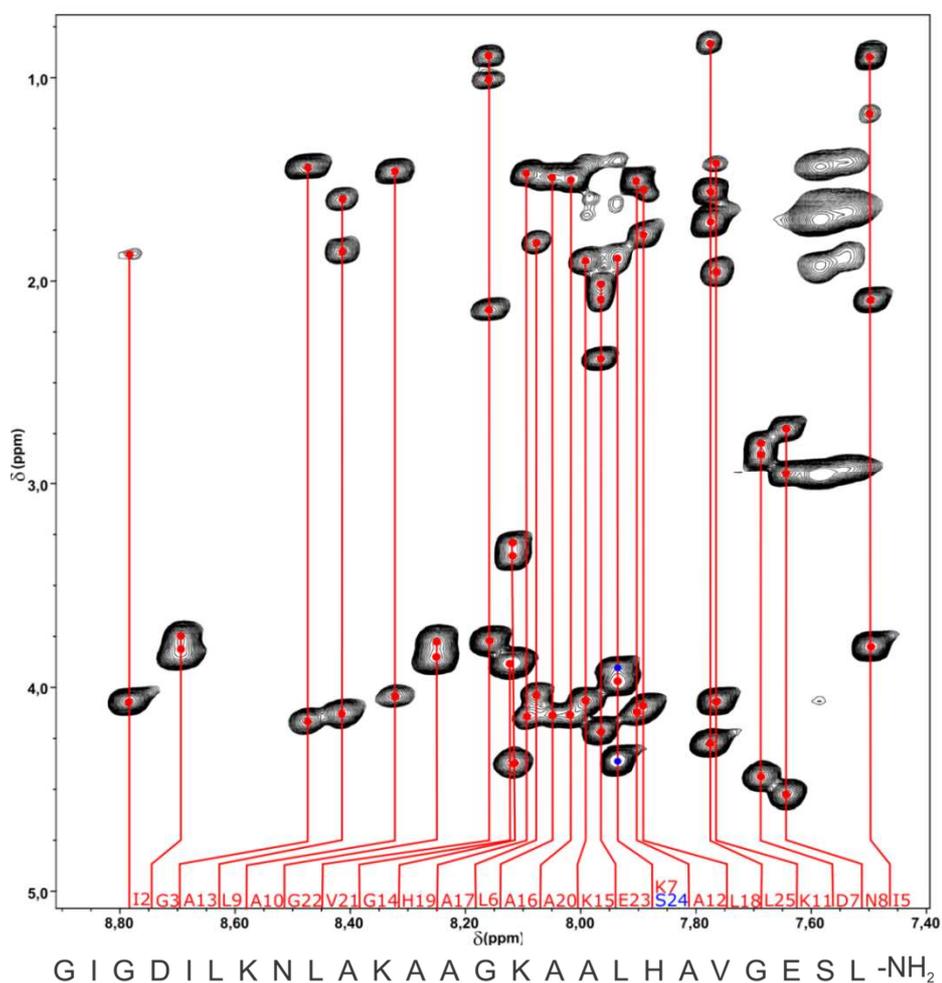


Figura 3.29. Região do mapa de contornos TOCSY de HSP2 (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE- d_2 em H₂O) mostrando conectividades intrarresiduais envolvendo os átomos de hidrogênio amídicos.

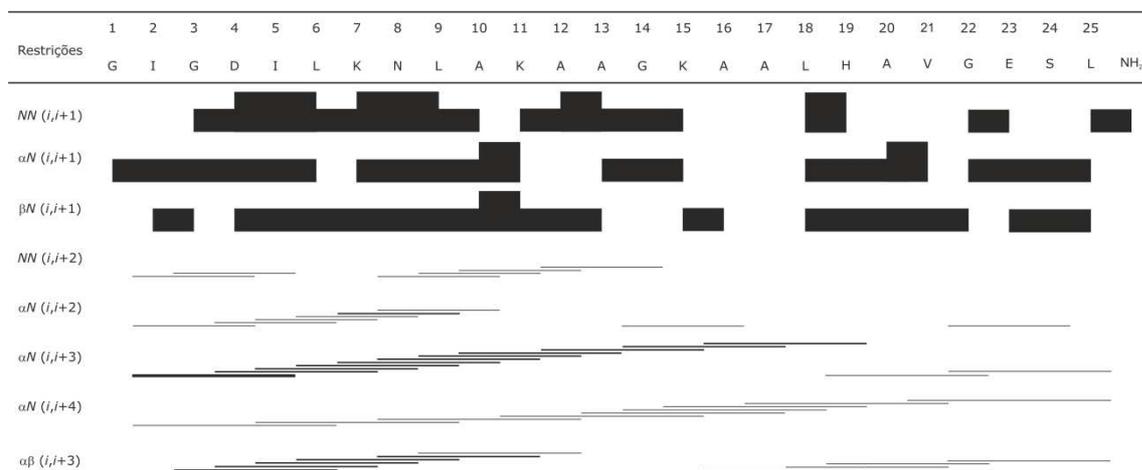


Figura 3.30. Resumo das correlações NOE sequenciais e características de estruturas α -helicoidais encontrados no mapa de contornos NOESY para HSP2 (600 MHz; 4 mM de HSP2 em solução 40% de TFE- d_2 em H₂O). As correlações sequenciais encontram-se representadas pelos retângulos cheios e as correlações de médio alcance são representadas por linhas. As espessuras desses elementos são proporcionais à intensidade dos sinais NOEs a que correspondem.

Analisando o conjunto de correlações NOE mostrado na Figura 3.30, pode-se perceber que há uma grande quantidade de NOEs característicos de estruturas α -hélice, em especial correlações do tipo $d_{\alpha N}(i, i + 3)$, $d_{\alpha N}(i, i + 4)$ e $d_{\alpha\beta}(i, i + 3)$, indicando a presença dessa estrutura secundária em praticamente toda a extensão da cadeia polipeptídica de HSP2.

3.3.3. Determinação Estrutural da [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e da [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes) por RMN em Solução

As atribuições dos sinais relativos aos peptídeos L-Phes e D-Phes foram feitas conjuntamente, em DPC (4 mM do peptídeo em 40 mM de DPC- d_8) e baseadas nas atribuições realizadas por Magalhães a partir de espectros da L-Phes e D-Phes em TFE, descritas em sua tese de doutorado (de Magalhães, 2011). A comparação com os espectros previamente obtidos foi essencial devido ao fato de os mapas de contorno TOCSY adquiridos para os peptídeos em DPC não apresentarem boa relação sinal/ruído dos sinais. Entretanto, algumas informações a respeito do sistema de *spin* dos deslocamentos químicos de alguns resíduos de aminoácido puderam ser obtidas.

Dessa maneira, a atribuição foi realizada com base principalmente nos mapas de contorno NOESY e HSQC editado. Os sinais relativos a cada resíduo de aminoácido e às interações dipolares entre os núcleos ¹H foram identificados por meio da metodologia de

assinalamento sequencial, de forma análoga à explanada na seção 3.3.2 (p. 100), para o peptídeo HSP2. As atribuições das correlações intrarresiduais encontram-se apresentadas na Figura 3.31.

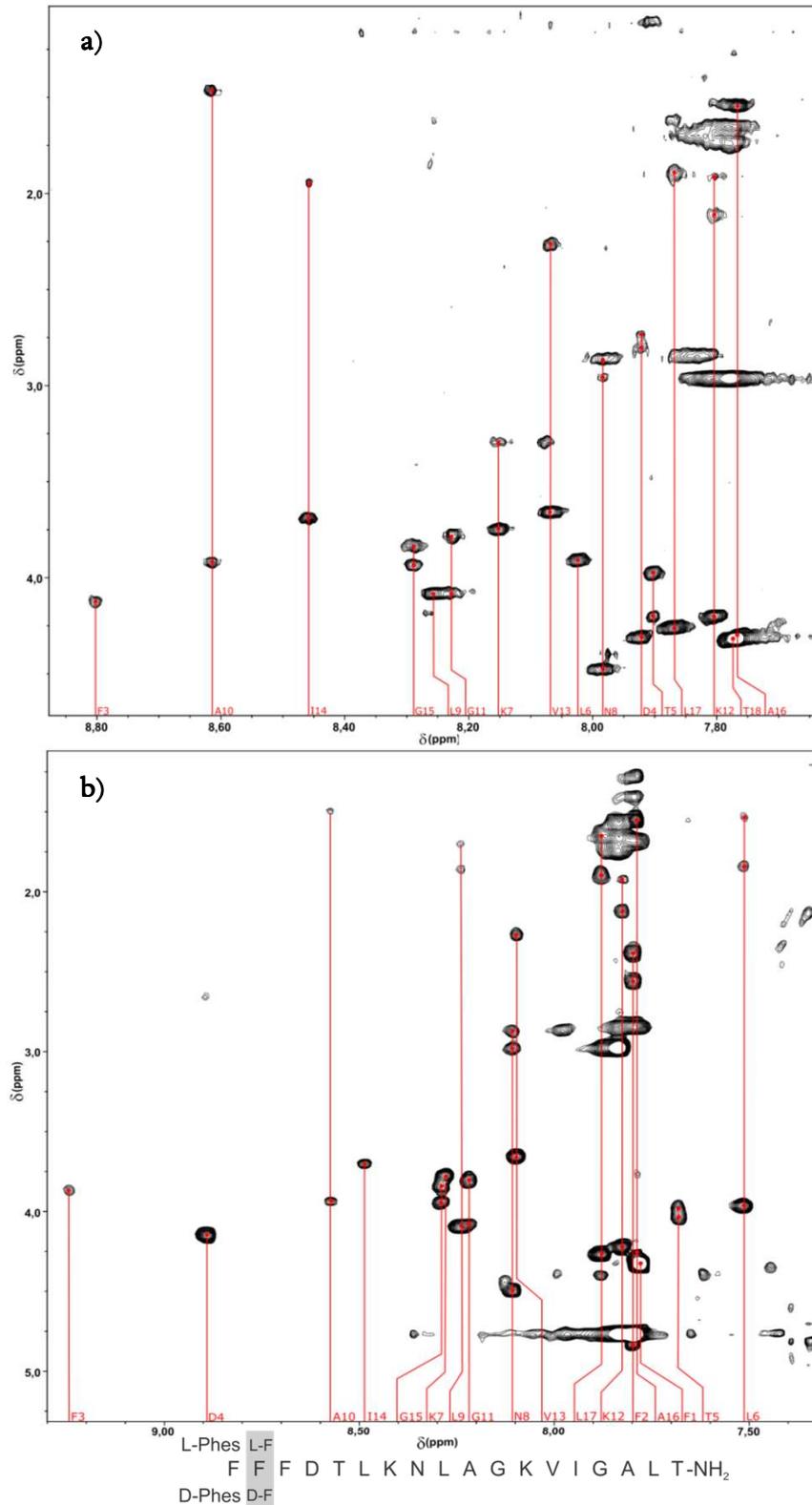


Figura 3.31. Regiões do mapa de contornos TOCSY relativas às correlações intrarresiduais envolvendo os átomos de hidrogênios amídicos de cada resíduo de aminoácido para **(a)** L-Phe e **(b)** D-Phe (800 MHz; 2 mM do peptídeo em 40 mM de DPC-*d*₃₈).

A análise simultânea dos dois espectros mostrou-se de grande auxílio para os assinalamentos, uma vez que os deslocamentos químicos observados para os hidrogênios de resíduos mais distantes da extremidade *N*-terminal variaram pouco (Fig. 3.31, p. 110). Devido ao fato de os deslocamentos químicos de átomos dos hidrogênio *alfa* e de ^{13}C de resíduos mais distantes do resíduo F2 terem sido mais conservados em comparação com os deslocamentos químicos de átomos de hidrogênios amídicos, grande parte da atribuição de sinais foi baseada principalmente na análise comparativa dos mapas de contorno $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC (Fig. 3.32). Os resíduos F2 puderam ser facilmente assinalados devido à maior variação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios *alfa* e amídicos ($\delta_{H_\alpha} = 4,44$ ppm e $\delta_{H_N} = 9,43$ ppm para a L-Phes, e $\delta_{H_\alpha} = 4,24$ ppm e $\delta_{H_N} = 7,80$ ppm, para a D-Phes). Demais deslocamentos químicos de núcleos de ^1H e ^{13}C de L-Phes e D-Phes são mostrados no Anexo A.

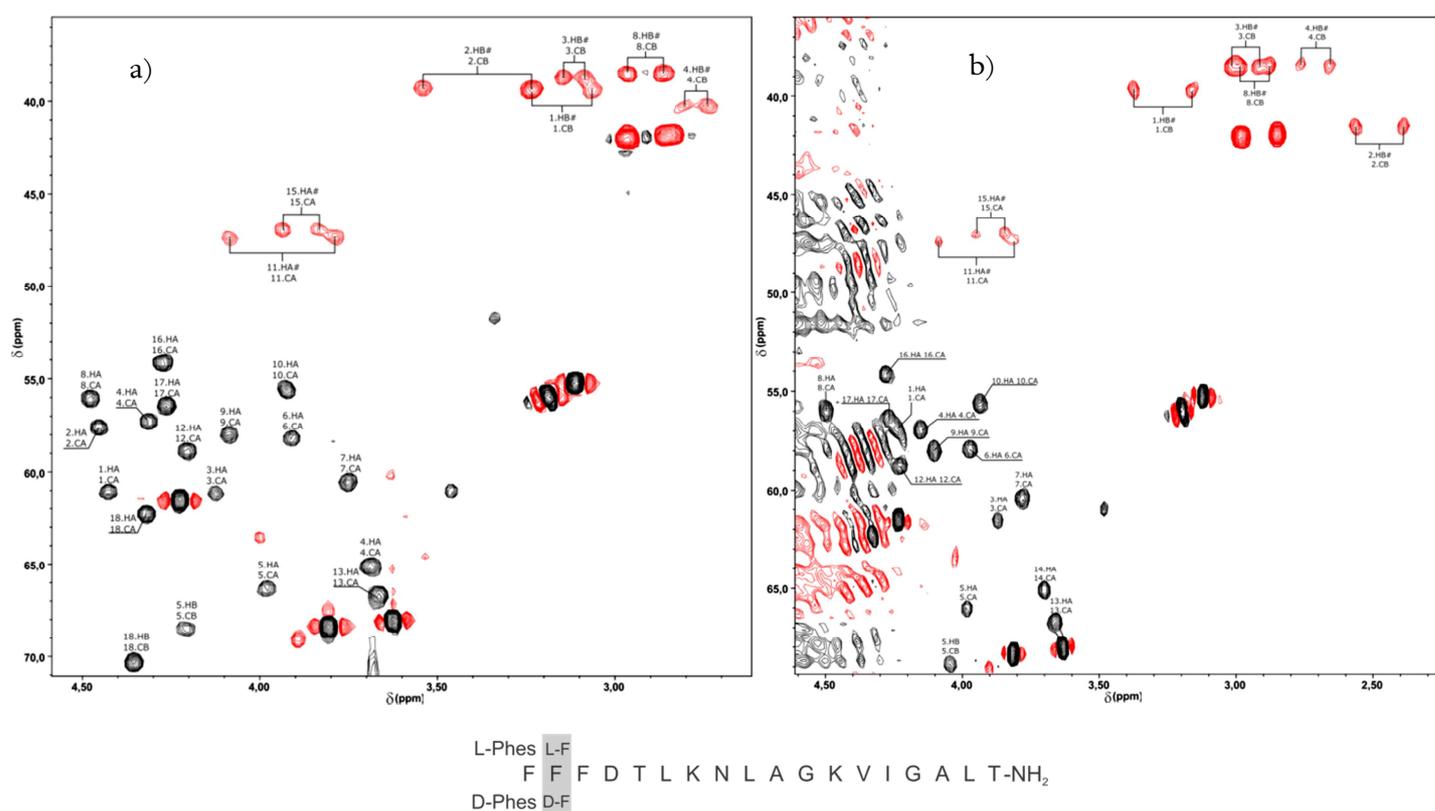


Figura 3.32. Mapas de contorno $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC editados dos peptídeos (a) L-Phes e (b) D-Phes (800 MHz; 2 mM do peptídeo em 40 mM de DPC-*d*₃₈)

As Figuras 3.33 (p. 112), 3.34 (p. 113) e 3.35 (p. 114) mostram, respectivamente, as regiões características de correlações do tipo d_{NN} , $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$, e $d_{\alpha\beta}$ dos mapas de contorno NOESY de ambos os peptídeos.

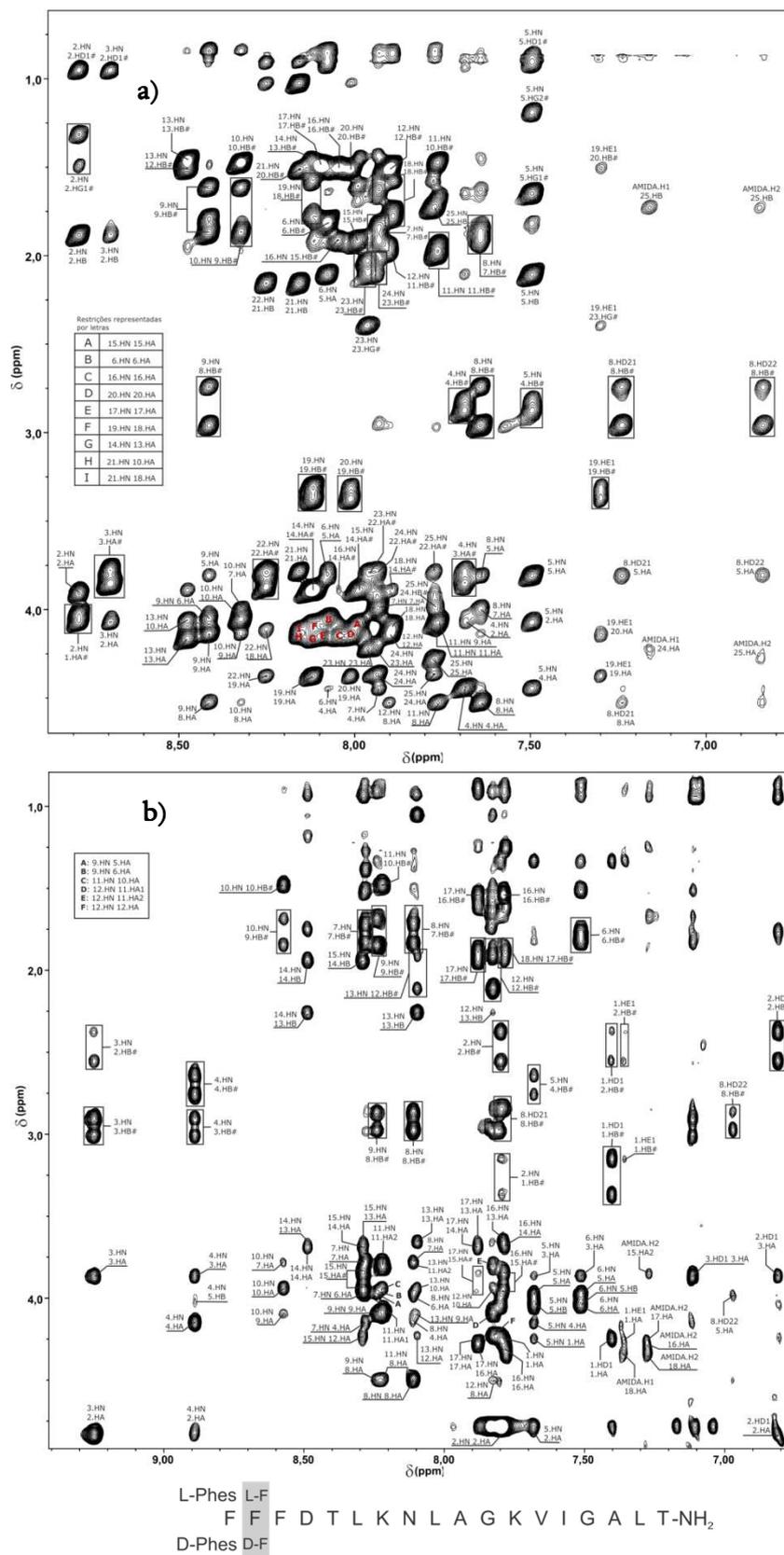


Figura 3.34. Região do mapa de contornos NOESY de (a) L-Phe e (b) D-Phe (800 MHz; 2 mM do peptídeo em 40 mM de DPC-*d*₃₈) mostrando conectividades inter-residuais dos tipos $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$.

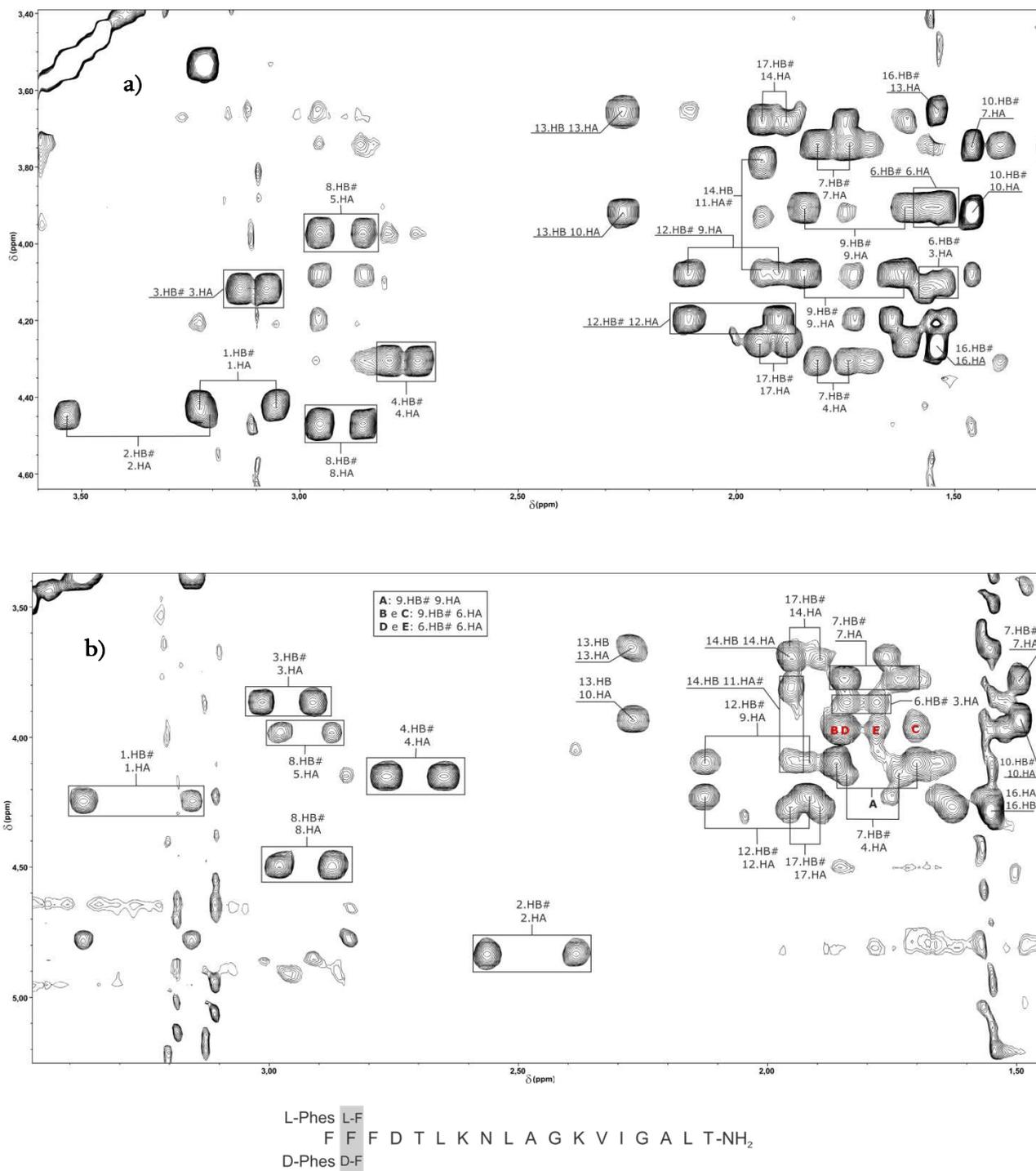


Figura 3.35. Região do mapa de contornos NOESY de (a) L-Phe e (b) D-Phe (800 MHz; 2 mM do peptídeo em 40 mM de DPC-*d*₃₈) mostrando conectividades inter-residuais do tipo $d_{\alpha\beta}$.

A Figura 3.36 (p. 115) apresenta o resumo das correlações NOE sequenciais e características de estruturas α -helicoidais encontradas nos mapas de contorno NOESY, para os peptídeos L-Phe e D-Phe.

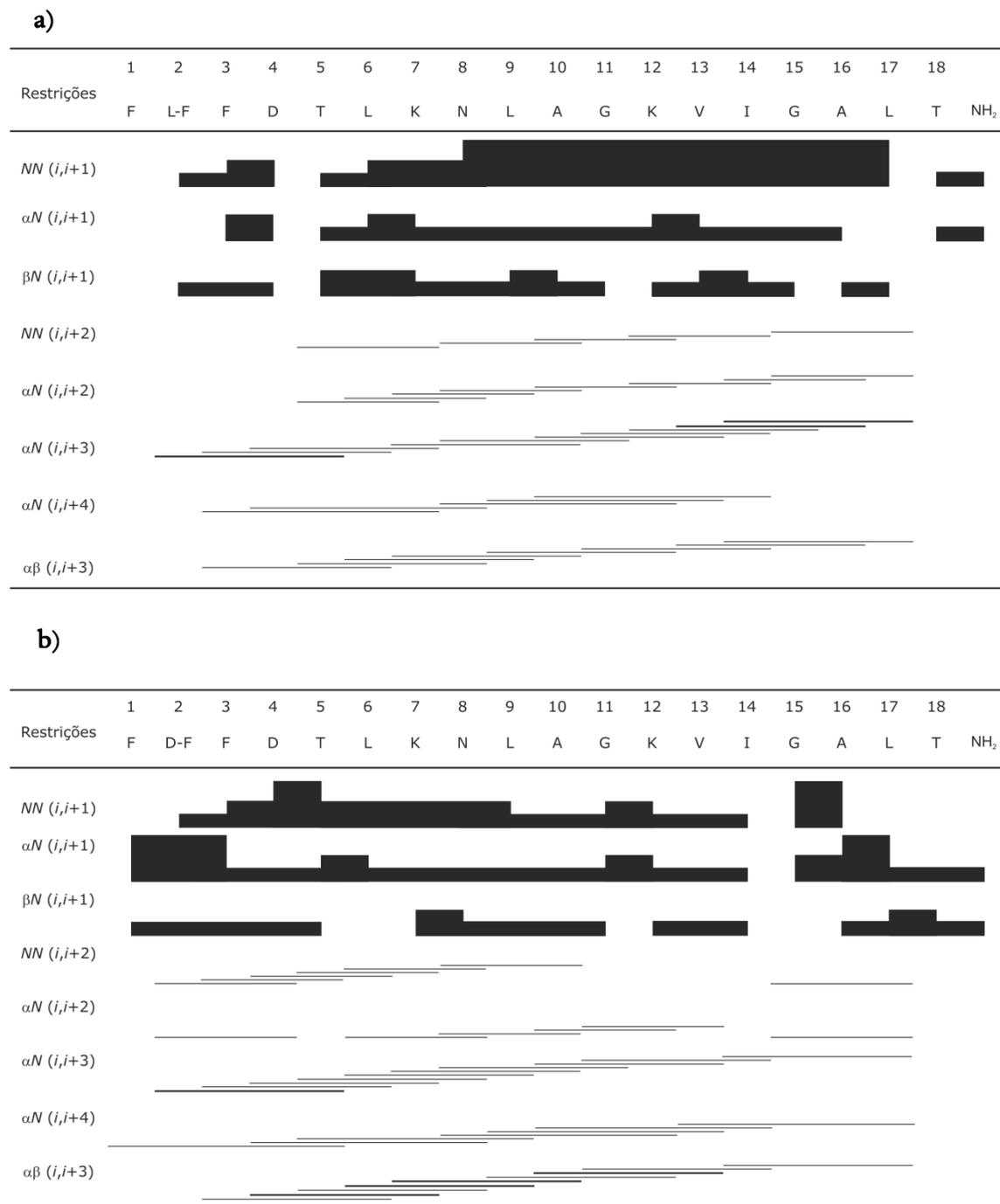


Figura 3.36. Resumo das correlações NOE sequenciais e características de estruturas α -helicoidais encontradas no mapa de contornos NOESY (800 MHz; 2 mM peptídeo em 40 mM DPC-*d*₃₈) para **(a)** L-Phes e **(b)** D-Phes. As correlações sequenciais encontram-se representadas pelos retângulos cheios e as correlações de médio alcance são representadas por linhas. As espessuras desses elementos são proporcionais à intensidade dos sinais NOEs a que correspondem.

Pela análise dos conjuntos de correlações relativas a L-Phes e D-Phes, uma grande quantidade de NOEs característicos de α -hélices, evidenciando a presença dessa estrutura secundária em grande parte de ambas as cadeias peptídicas, embora a maior quantidade de NOEs

presentes na região próxima à extremidade *N*-terminal da D-Phes indica uma maior estruturação deste peptídeo em relação a L-Phes.

3.3.4. Cálculo e Validação Estrutural a partir dos Dados de RMN em Solução

Os cálculos foram realizados utilizando restrições semiquantitativas, de acordo com a intensidade dos NOEs observados entre pares de núcleos de ^1H , cujas distâncias interatômicas são definidas por estas restrições durante o cálculo dos modelos das estruturas peptídicas. Para os peptídeos L-Phes e D-Phes, foram utilizadas também restrições de ângulos diedros derivadas de valores de deslocamento químico de átomos da cadeia principal, calculadas pelo programa TALOS+ (Shai *et al.*, 2009). As listas de restrição obtidas foram submetidas ao programa QUEEN para validação em relação a seus respectivos conteúdos de informação estrutural e, por fim, submetidas ao cálculo.

O cálculo foi realizado utilizando-se o protocolo de arrefecimento simulado (*simulated annealing*), baseado em dinâmica de ângulos de torção (Rice *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1996). Para o refinamento da HSP2, apenas, não foram utilizados valores de deslocamentos químicos de ^{13}C para a definição dos potenciais de força média, baseados nos bancos de dados do Xplor-NIH, devido ao fato de haver apenas resultados de RMN relativos a núcleos de ^1H para este peptídeo.

3.3.4.1. Cálculo e Validação Estrutural da Hilaseptina P2 (HSP2)

A lista utilizada para o cálculo dos modelos para HSP2 constituiu-se de 182 restrições de distância, sendo 89 restrições do tipo intrarresidual, 54 do tipo sequencial e 39 restrições de alcance médio. A análise por conteúdo de informação realizada pelo programa QUEEN é mostrada na Figura 3.37 (p. 117). Pode-se perceber que as restrições de maior conteúdo de informação (15.HA/19.HN, 13.HA/17.HN, 9.HA, 13.HN) referem-se a restrições que têm maior peso na definição de uma estrutura α -helicoidal, durante o cálculo do modelo, ou seja, são as restrições derivadas de correlações NOE que são bastante características desse tipo de estrutura secundária. Como não foram utilizadas restrições de ângulos diedros ou de ligações de hidrogênio, é esperado que este tipo de restrição tenha um conteúdo de informação maior que as demais. Como este peptídeo estrutura-se em meio mimético de membrana na forma α -

helicoidal, é coerente não considerar esse tipo de restrição como incorreta, apesar do alto valor de unicidade dada pelo programa QUEEN.

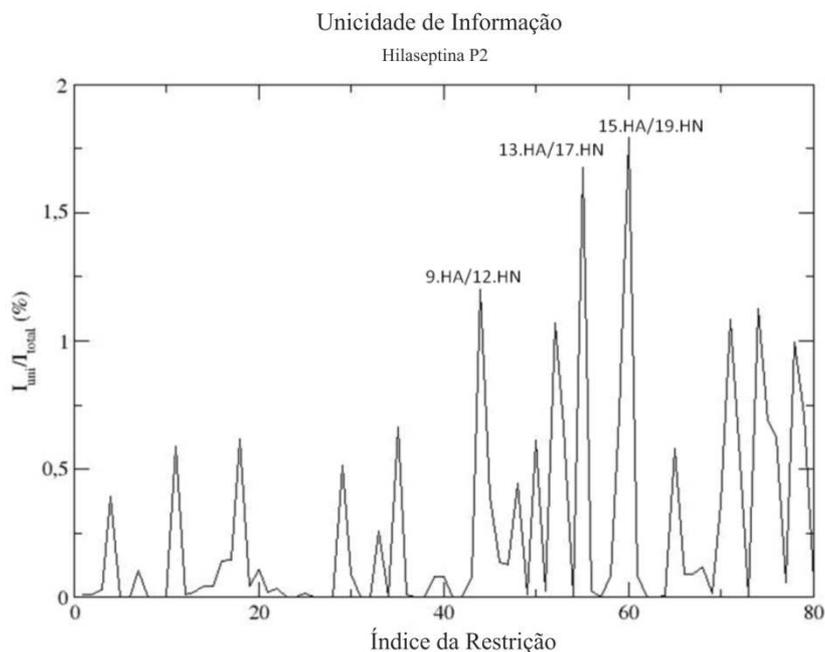


Figura 3.37. Diagrama de unicidade por índice das restrições utilizadas no cálculo de determinação estrutural dos modelos para o peptídeo HSP2.

As vinte estruturas de menores energias estão mostradas na Figura 3.38 e pode-se perceber claramente que a forma α -helicoidal é adotada em praticamente toda a extensão da cadeia polipeptídica. Além do mais, é bastante evidente o caráter anfipático desta hélice, que está de acordo com o que é comumente observado em peptídeos antimicrobianos helicoidais.

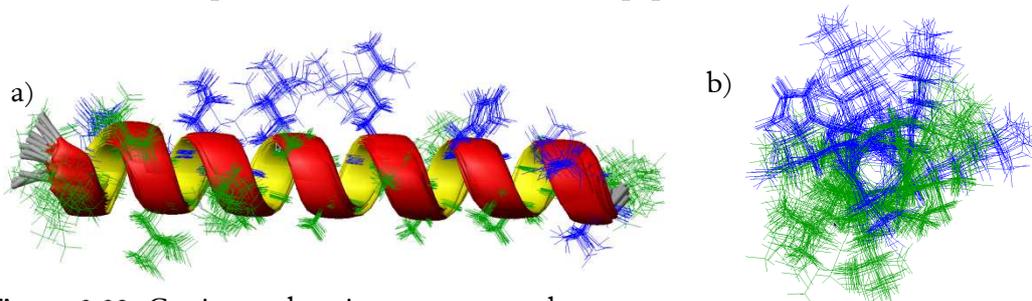


Figura 3.38. Conjunto das vinte estruturas de menor energia do peptídeo HSP2, visualizado **a)** lateralmente, e **b)** frontalmente, com as cadeias laterais hidrofílicas representadas em azul, e as hidrofóbicas em verde.

O conjunto das estruturas apresentou um RMSD de 0,41 Å para a sobreposição de estruturas na região compreendida entre os resíduos V5 e L25 e a validação mostrou qualidade estrutural elevada, conforme o mostrado na Figura 3.39, de acordo com a classificação ROG (*Red Orange Green*) adotada pelo *iCing*. Todos os resíduos de aminoácido foram classificados com a cor verde (significando alta qualidade estrutural), com exceção do resíduo V25, que foi representado pela cor vermelha, indicando qualidade estrutural baixa (Figura 3.39). A razão disso foi devido à distribuição dos valores dos ângulos diedros da cadeia lateral, de acordo com as combinações angulares definidas no diagrama de Janin. O motivo dessa distribuição angular insatisfatória possivelmente deve-se ao fato de não haver restrições de distância suficientes para definir uma determinada estruturação da cadeia lateral de V25 durante o cálculo estrutural. Nos casos em que não há restrições geométricas, a qualidade do modelo depende somente do campo de força utilizado para o cálculo. Apesar de esse campo de força contemplar bem algumas características eletrônicas, eletrostáticas e estéricas, quando utilizadas restrições geométricas, ele é muito realista quando não estão presentes tais restrições, mesmo com o refinamento, que se baseia em minimizações energéticas mais eficientes e campos de força mais completos. Dessa forma, a qualidade baixa devido à conformação adotada pela cadeia lateral de um resíduo terminal, que normalmente tem maior variabilidade estrutural, não compromete o modelo calculado, uma vez que as restrições obtidas a partir de dados experimentais são mutuamente coerentes e convergem para uma estrutura do tipo α -hélice.

Análise Baseada nos Resíduos de Aminoácido

HSP2

1-9		GLY1	ILE2	GLY3	ASP4	ILE5	LEU6	LYS7	ASN8	LEU9
10-19	ALA10	LYS11	ALA12	ALA13	GLY14	LYS15	ALA16	ALA17	LEU18	HISE19
20-29	ALA20	VAL21	GLY22	GLU23	SER24	LEU25				

Figura 3.39. Classificação por resíduos do peptídeo HSP2, de acordo com suas respectivas qualidades estruturais, de pelo critério ROG adotado pela interface *iCing*, em que verde indica boa qualidade estrutural e vermelho indica qualidade insatisfatória.

A Figura 3.40 (p. 119) mostra a distribuição de ângulos φ e ψ dos resíduos de aminoácido no diagrama de Ramachandran, mostrando 99% dos resíduos com combinações dos valores desses ângulos pertencentes a regiões mais favorecidas, sendo os demais 1% distribuídos em regiões permitidas, evidenciando, mais uma vez a qualidade estrutural elevada das estruturas obtidas.

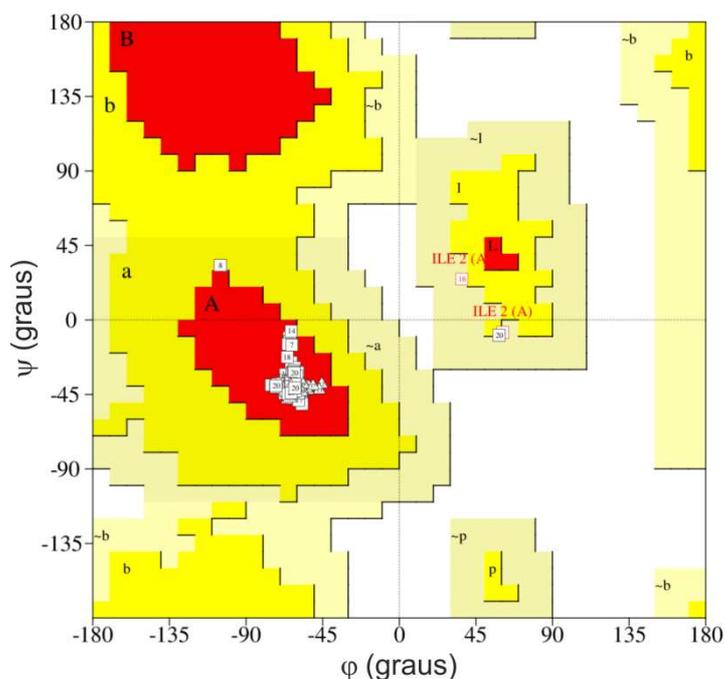


Figura 3.40. Diagrama de Ramachandran das vinte estruturas de menores energias para o peptídeo HSP2. A região mais favorecida é representada em vermelho, a adicionalmente permitida, em amarelo, a generosamente permitida, em amarelo claro, e a região proibida, em branco. 99% dos resíduos apresentaram combinações angulares pertencentes à região mais favorecida, 0,5%, a regiões adicionalmente permitidas e 0,5%, a regiões generosamente permitidas.

3.3.4.2. Cálculo e Validação Estrutural da [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes)

Para a determinação estrutural de L-Phes, foram utilizadas 237 restrições de distância (dentre as quais 119 são do tipo intrarresidual, 61 do tipo sequencial e 57 são restrições de alcance médio) e 32 restrições angulares, derivadas de valores de deslocamento químico de ¹H e de ¹³C de átomos da cadeia principal do peptídeo. Mais uma vez, restrições derivadas de correlações NOE bastante características de estruturas α -hélice apresentaram altos índices de unicidade (7.HN/3.HA, 5.HN/2.HA, 12.HN/8.HA, 17.HB#/14.HA e 8.HN/4.HA, Figura 3.41, p. 120), que poderiam ser ainda melhor embasadas utilizando-se restrições advindas de dados experimentais relativos a ligações de hidrogênio ou acoplamentos dipolares residuais, por exemplo.

Unicidade de Informação

L-Fenilseptina

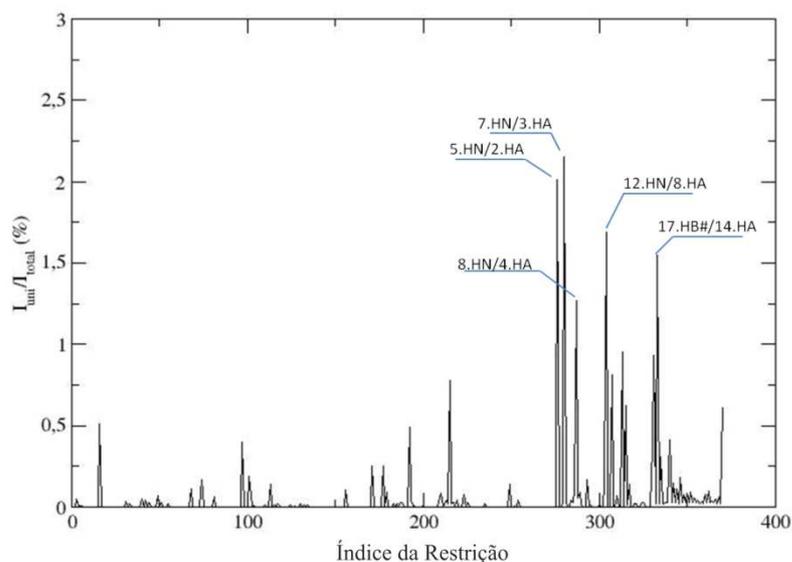


Figura 3.41. Diagrama de unicidade por índice das restrições utilizadas no cálculo de determinação estrutural dos modelos para o peptídeo L-Phes.

O conjunto das vinte estruturas de menor energia é mostrado na Figura 3.42, sendo evidente o conteúdo elevado de estrutura secundária do tipo α -hélice. Percebe-se, ainda, uma grande convergência geométrica entre as estruturas, refletida, também, no RMSD obtido, de 0,36 Å para um alinhamento da cadeia principal, entre os resíduos D4 e T18.

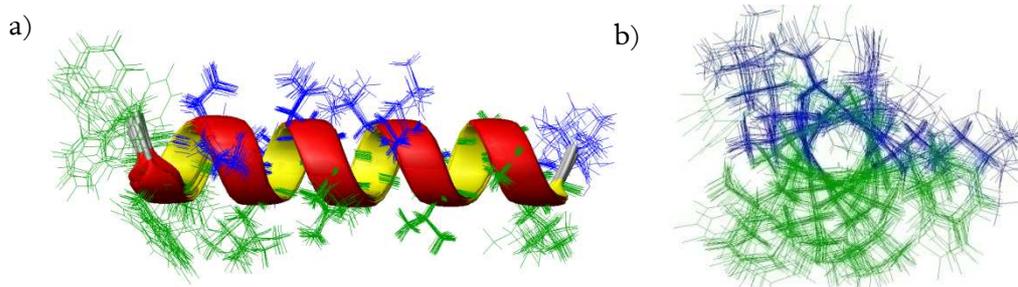


Figura 3.42. Conjunto das 20 estruturas de menor energia do peptídeo L-Phes, visualizado a) lateralmente, e b) frontalmente, com as cadeias laterais hidrofílicas representadas em azul, e as hidrofóbicas em verde.

A classificação de cada resíduo pelo critério ROG do *iCing* é mostrada na Figura 3.43 (p. 121). Os resíduos D4, L9 e T18 foram classificados como laranja, indicativo de uma possível qualidade estrutural baixa. Novamente, a possível deficiência estrutural é apontada na

distribuição angular das cadeias laterais desses resíduos, sendo a possível causa o baixo número de restrições envolvendo átomos dessas cadeias laterais.

Análise Baseada em Resíduos de Aminoácido

L-Phes

1-9 PHE1 PHE2 PHE3 ASP4 THR5 LEU6 LYS7 ASN8 LEU9
10-19 ALA10 GLY11 LYS12 VAL13 ILE14 GLY15 ALA16 LEU17 THR18

Figura 3.43. Classificação por resíduos do peptídeo L-Phes, de acordo com suas respectivas qualidades estruturais, pelo critério ROG adotado pela interface *iCing*, em que verde indica boa qualidade estrutural e laranja indica qualidade estrutural mediana.

A Figura 3.44 mostra o diagrama de Ramachandran da L-Phes, em que 100% dos resíduos possuem combinações dos ângulos φ e ψ dentro da área definida como mais favorável (região em vermelho).

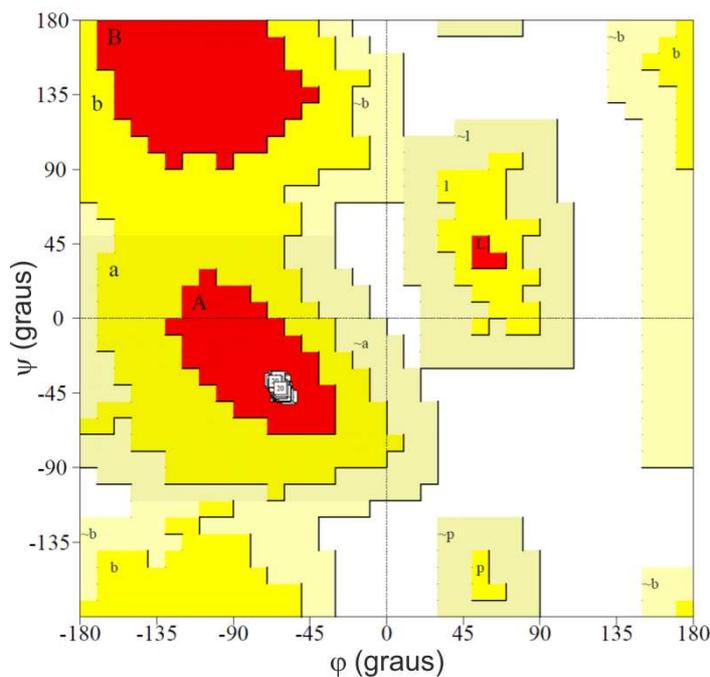


Figura 3.44. Diagrama de Ramachandran das vinte estruturas de menor energia para a L-Phes. A região mais favorecida é apresentada em vermelho, a adicionalmente permitida, em amarelo, a generosamente permitida, em amarelo claro, e a região proibida, em branco. 100% dos resíduos apresentaram combinações angulares pertencentes à região mais favorecida.

3.3.4.3. Cálculo e Validação Estrutural da [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes)

A determinação estrutural da D-Phes foi realizada utilizando-se um conjunto de 215 restrições de distância (122 do tipo intrarresidual, 51 do tipo sequencial e 42 de alcance médio) e 26 restrições angulares. Similarmente aos peptídeos L-Phes e HSP2, os cálculos de unicidade do QUEEN mostraram apenas restrições características de α -hélice como responsáveis pelo maior número de informações estruturais (Figura 3.45).

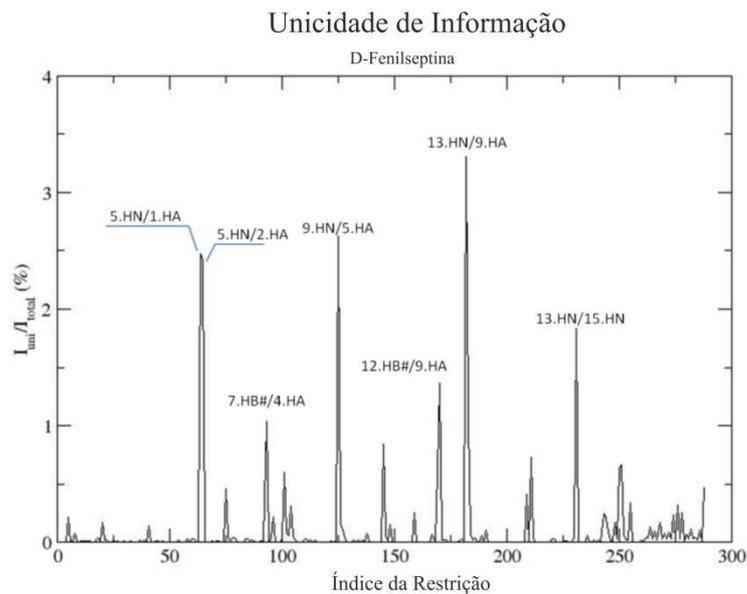


Figura 3.45. Diagrama de unicidade por índice das restrições utilizadas no cálculo de determinação estrutural dos modelos para o peptídeo D-Phes.

As 20 estruturas de menor energia, que compõem o modelo para a D-Phes são mostradas na Figura 3.46. É também evidente o alto grau de sobreposição da cadeia principal desse conjunto de estruturas (também alinhadas na região compreendida entre os resíduos D4 e T18), que é refletido no RMSD calculado, cujo valor é de 0,43 Å.

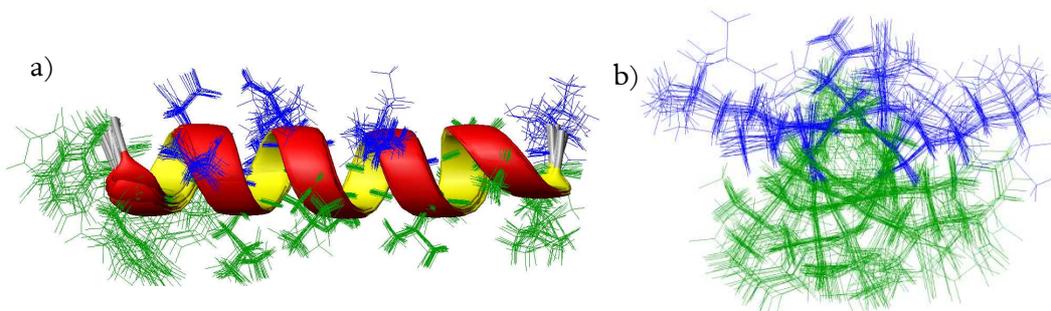


Figura 3.46. Conjunto das 20 estruturas de menor energia do peptídeo D-Phes, visualizado a) lateralmente, e b) frontalmente, com as cadeias laterais hidrofílicas representadas em azul, e as hidrofóbicas em verde.

Em relação ao modelo estrutural da L-Phes (Figura 3.42, p. 120), pode-se averiguar que o conjunto de estruturas para a D-Phes apresenta um caráter anfipático ainda mais acentuado que seu homólogo, comparando-se as visões frontais de ambos os peptídeos (Figura 3.42b, p. 120, e Figura 3.46b, p. 122, para L-Phes e D-Phes, respectivamente), com os resíduos de aminoácido F1 e F2 mais concentrados na face hidrofóbica da hélice. Além disso, percebe-se uma menor variabilidade conformacional das cadeias laterais desses resíduos de aminoácido na D-Phes em relação à L-Phes, acentuando-se, dessa maneira, o caráter anfipático da primeira.

A Figura 3.47 mostra a classificação por resíduo da D-Phes pela interface *iCing*, indicando boa qualidade estrutural, indicando apenas qualidade mediana para os resíduos I14, A16 e L17. O desvio apontado em relação às relações angulares comumente observadas em cadeias polipeptídicas localiza-se na cadeia principal e provavelmente é devido à distorção da hélice na região próxima à extremidade *C*-terminal, conforme observado na Figura 3.46a (p. 122). Apesar de a estrutura secundária em questão apresentar um leve desvio em relação a sua forma ideal, as combinações angulares observadas não violam as condições estéricas em que se fundamenta o diagrama de Ramachandran. Dessa forma, essa distorção foi considerada como uma característica estrutural, pois esta é fundamentada em resultados experimentais de RMN em solução.

Análise Baseada em Resíduos de Aminoácido

D-Phes

1-9	PHE1	PHE2	PHE3	ASP4	THR5	LEU6	LYS7	ASN8	LEU9
10-19	ALA10	GLY11	LYS12	VAL13	ILE14	GLY15	ALA16	LEU17	THR18

Figura 3.47. Classificação por resíduos do peptídeo D-Phes, de acordo com suas respectivas qualidades estruturais, pelo critério ROG adotado pela interface *iCing*, em que verde indica boa qualidade estrutural e laranja indica qualidade estrutural mediana.

O diagrama de Ramachandran para a D-Phes é apresentado na Figura 3.48 (p. 124), mostrando grande parte das combinações angulares relativas à cadeia principal na região mais favorecida, embora em duas das 20 estruturas o resíduo F2 apresenta combinações de φ e ψ que se encontram na região proibida do diagrama. Isso não necessariamente indica erro estrutural, uma vez que o resíduo F2 trata-se do estereoisômero D da fenilalanina e o diagrama de Ramachandran foi construído tendo como base nos estereoisômeros L de aminoácidos. Sendo assim, é esperado que *outliers* como estes sejam observados no caso de D-aminoácidos.

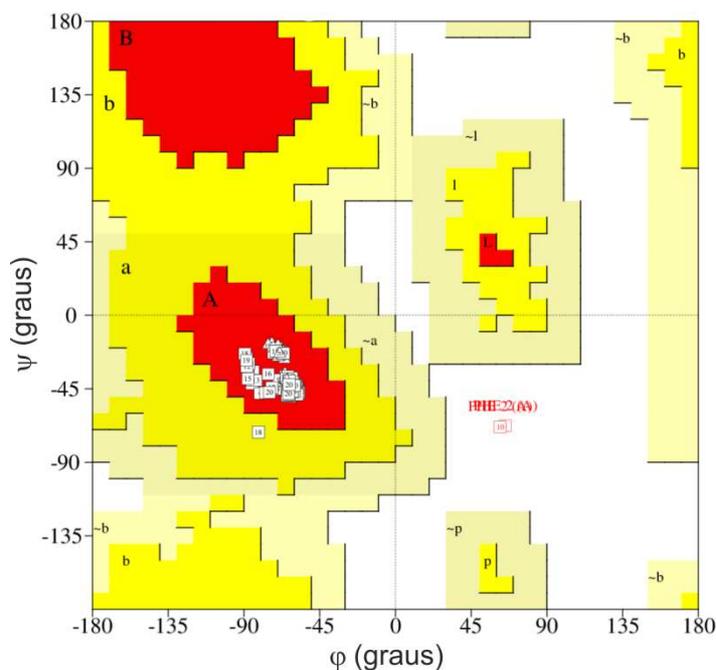


Figura 3.48. Diagrama de Ramachandran das 20 estruturas de menor energia para a D-Phes. A região mais favorecida é representada em vermelho, a adicionalmente permitida, em amarelo, a generosamente permitida, em amarelo claro, e a região proibida, em branco. 98,9% dos resíduos apresentaram combinações angulares pertencentes à região mais favorecida, 0,4% a regiões adicionalmente permitidas e 0,7% à região proibida.

3.3.5. Estudos Topológicos da Interação Peptídeo-Bicamada Fosfolipídica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em Fase Sólida

3.3.5.1. Estudo da Hilaseptina P2 (HSP2) por RMN em Fase Sólida

Para o estudo de RMN em fase sólida de HSP2, foram utilizados peptídeos isotopicamente marcados com ^{15}N no resíduo de leucina na posição 18 (L18) e com $^2\text{H}_3$ na metila do resíduo de alanina na posição 16 (A16).

O espectro de RMN de ^{31}P desacoplado de ^1H (Figura 3.49, p. 125) mostra um sinal em um maior valor de deslocamento químico de intensidade muito maior que os demais sinais, indicando uma boa orientação da bicamada lipídica.

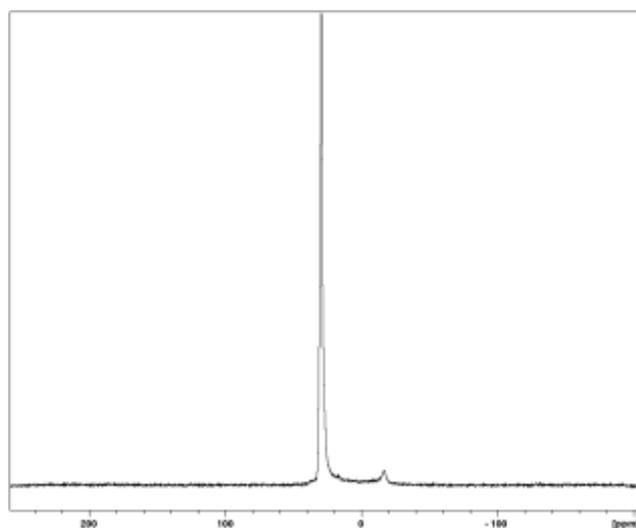


Figura 3.49. Espectro de RMN de ^{31}P desacoplado de ^1H de amostra contendo o peptídeo HSP2 reconstituído em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (1,5% em mol de HSP2 em POPC) a 93% de umidade relativa (161,9 MHz).

A Figura 3.50 mostra o espectro de RMN de ^{15}N desacoplado de ^1H para a HSP2. O espectro apresenta apenas um sinal de alta intensidade, indicando que a maior parte das moléculas de peptídeo encontra-se alinhada paralelamente à superfície da bicamada, em uma orientação principal. O deslocamento químico observado foi de 74 ppm. A presença de apenas um sinal majoritário é indício de que o peptídeo segue preferencialmente uma orientação quando interage com a bicamada fosfolipídica.

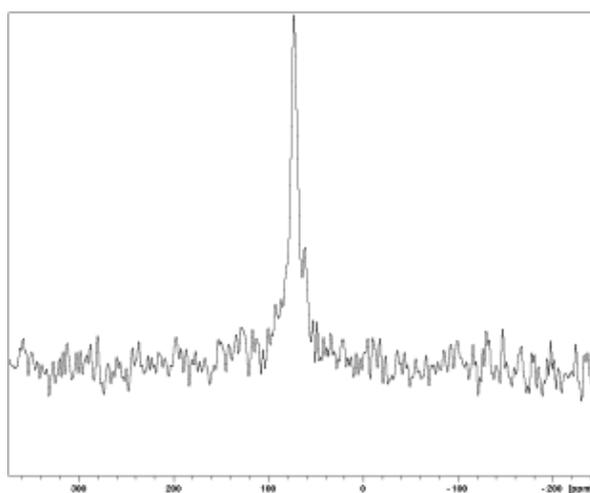


Figura 3.50. Espectro de RMN de ^{15}N desacoplado de ^1H de amostra contendo o peptídeo HSP2 em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (1,5% em mol de HSP2 em POPC) a 93% de umidade relativa (40,6MHz)..

O espectro de RMN de ^2H de HSP2 é apresentado na Figura 3.51. O valor de desdobramento quadrupolar de deutério observado é de 27 kHz, mostrando, também, evidência de que o peptídeo possui uma orientação preferencial ao interagir com a bicamada.

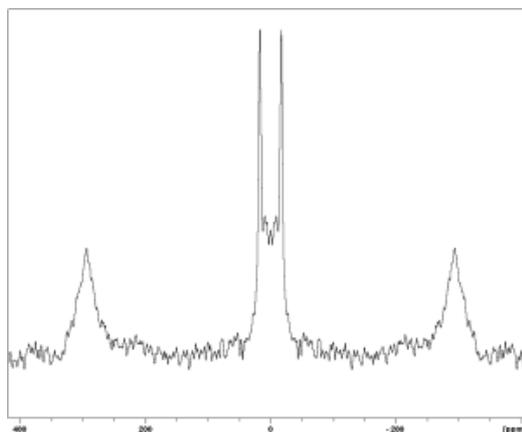


Figura 3.51. Espectro de RMN de ^2H de amostra contendo o peptídeo HSP2 em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (1,5% em mol de HSP2 em POPC) a 93% de umidade relativa (61,4 MHz).

A partir dos valores de deslocamento químico de ^{15}N e desdobramento quadrupolar de deutério, prosseguiu-se com a determinação das possíveis orientações do peptídeo na bicamada. As relações angulares que definem essa orientação encontram-se representadas na Figura 3.52.

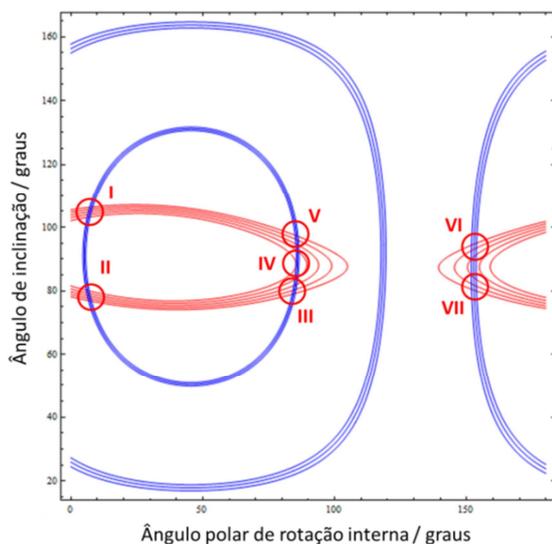


Figura 3.52. Alinhamentos possíveis do peptídeo HSP2 em bicamada de POPC (1,5% em mol de HSP2 em POPC), apresentados em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna. Os pontos em azul representam orientações que concordam com o desdobramento quadrupolar de ^2H e os pontos em vermelho representam as orientações em concordância com o deslocamento químico experimental de ^{15}N . Os pontos de interseção, indicados por algarismos romanos, mostram orientações que concordam simultaneamente com os dois parâmetros e, portanto, representam as possíveis orientações do peptídeo nas bicamadas lipídicas.

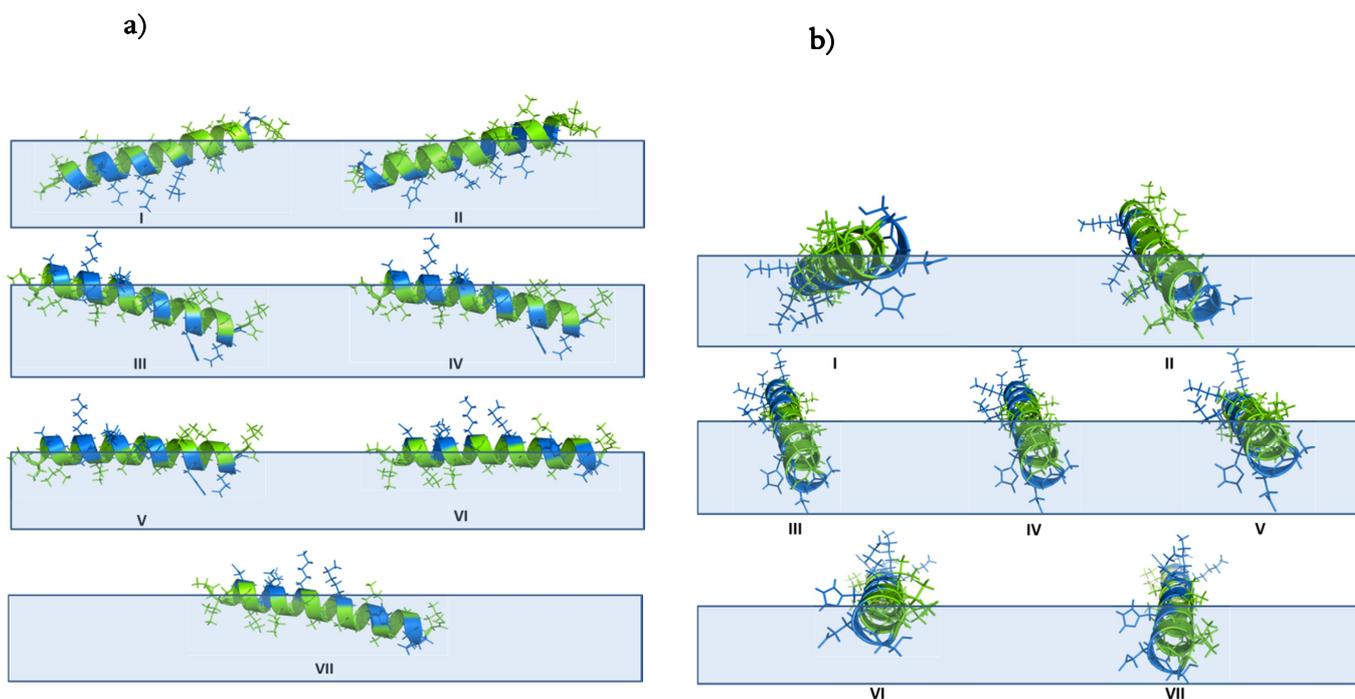


Figura 3.53. Representação dos possíveis alinhamentos indicados na Figura 3.52 (p. 126), para HSP2, com estruturas vistas (a) de lado e (b) de frente. Os resíduos apolares estão representados em verde e os resíduos polares, em azul. A bicamada lipídica encontra-se representada pela área em azul claro.

Na Figura 3.53, pela interação da face hidrofóbica com o interior alifático da bicamada, pode-se considerar que a orientação VI, com o eixo da hélice paralelo à superfície da estrutura fosfolipídica, é a mais provável. Entretanto, percebe-se que, nessa topologia há ainda uma inserção dos resíduos polares E23 e S24 no meio hidrofóbico. Isso pode ser consequência do fato de a estrutura utilizada para a determinação das orientações derivar de resultados de RMN com o peptídeo dissolvido em TFE, meio que normalmente induz estruturas α -helicoidais. A utilização de uma estrutura adquirida com o peptídeo em contato com fosfolípídeos poderia fornecer resultados mais precisos acerca da orientação preferencial. Outro ponto que merece ser levantado é que essa determinação topológica não leva em conta questões dinâmicas do peptídeo e, como esses resíduos de aminoácido encontram-se em uma região próxima à C-terminação, é possível que questões dinâmicas tenham influência significativa sobre esses resíduos e que essa região não se encontra necessariamente em contato com o interior hidrofóbico durante todo o tempo que ocorre a interação peptídeo-membrana.

3.3.5.2. Estudo da [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes) por RMN em Fase Sólida

Primeiramente, foram realizados experimentos de RMN de ³¹P desacoplados de ¹H. Os espectros tanto de L-Phes quanto de D-Phes mostram sinais com maior valor de deslocamento químico de intensidade muito maior que os demais sinais (Fig. 3.54), indicando uma boa orientação da bicamada lipídica. O espectro de L-Phes (Fig. 3.54a) mostra um terceiro sinal imediatamente ao lado do sinal principal, que indica degradação da bicamada lipídica, embora, devido à sua intensidade, pode-se concluir que a degradação é mínima e não influencia significativamente os resultados dos demais experimentos realizados.

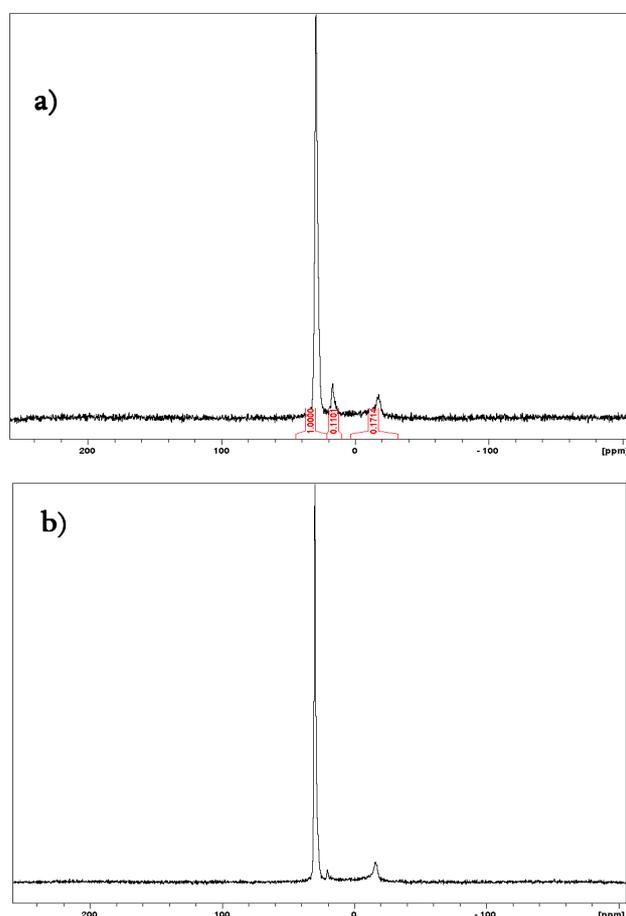


Figura 3.54. Espectros de RMN de ³¹P desacoplados de ¹H, de amostras contendo os peptídeos (a) L-Phes e (b) D-Phes, em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (3% em mol dos peptídeos em POPC) a 93% de umidade relativa (161,9 MHz).

A Figura 3.55 mostra os espectros de RMN de ¹⁵N desacoplados de ¹H para a L-Phes (Fig. 3.55a, p. 129) e D-Phes (Fig. 3.55b, p. 129). Os deslocamentos químicos observados para ambas as amostras foram bastante próximos entre si (76 ppm para L-Phes e 74 ppm para D-Phes), o que indica orientações das respectivas hélices similares entre si.

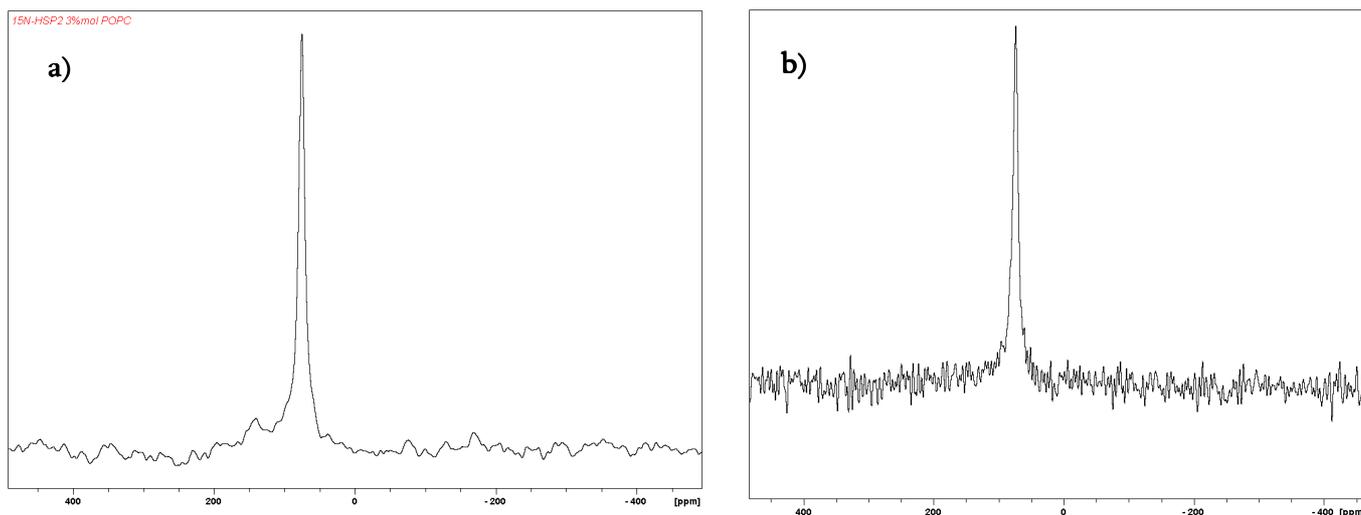


Figura 3.55. Espectros de RMN de ^{15}N desacoplados de ^1H de amostras contendo os peptídeos **(a)** L-Phes e **(b)** D-Phes em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (3% em mol dos peptídeos em POPC) a 93% de umidade relativa (40,6 MHz).

Os espectros de ^2H de ambas as fenilseptinas encontram-se na Figura 3.56. Os valores de desdobramento quadrupolar de deutério observados são bastante diferentes (36 kHz para a L-Phes, Fig. 3.56a, e 27 kHz para a D-Phes, Fig. 3.56b, indicando uma diferença significativa entre os ângulos azimutais de rotação, o que indica que as maneiras com que cada peptídeo ancora-se à membrana se diferenciam significativamente entre si.

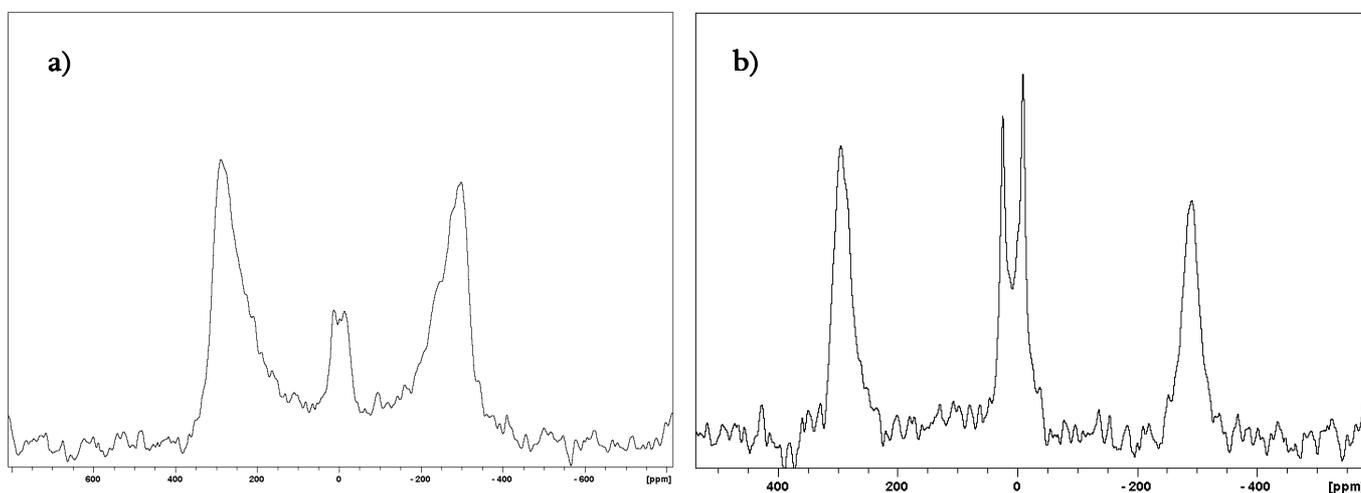


Figura 3.56. Espectros de RMN de ^2H de amostras contendo os peptídeos **(a)** L-Phes e **(b)** D-Phes em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC (3% em mol dos peptídeos em POPC) a 93% de umidade relativa (61,4 MHz).

Com os valores de deslocamento químico de ^{15}N e desdobramento quadrupolar de deutério, foi possível realizar o cálculo de orientações possíveis do peptídeo na membrana. As relações angulares que definem essa orientação para a L-Phes encontram-se representadas na

Figura 3.57 e, para a D-Phes, na Figura 3.59 (p. 131). As aplicações dessas orientações sobre as estruturas dos peptídeos encontram-se representada nas Figuras 3.58 (p. 131) e 3.60 (p. 132) para a L-Phes e D-Phes, respectivamente. As estruturas utilizadas para a determinação das topologias orientacionais mais prováveis foram os modelos de menor energia cujas geometrias foram determinadas com base nos resultados de RMN em solução, na presença de DPC. As estruturas foram primeiramente alinhadas em relação ao eixo z, levando em conta o eixo principal da α -hélice compreendida entre os resíduos D4 e L17. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa GROMACS 4.4 (Van Der Spoel *et al.*, 2005), pelo vetor paralelo ao sentido da ligação $N - H$ da amida pertencente à ligação peptídica entre os resíduos N8 e L9.

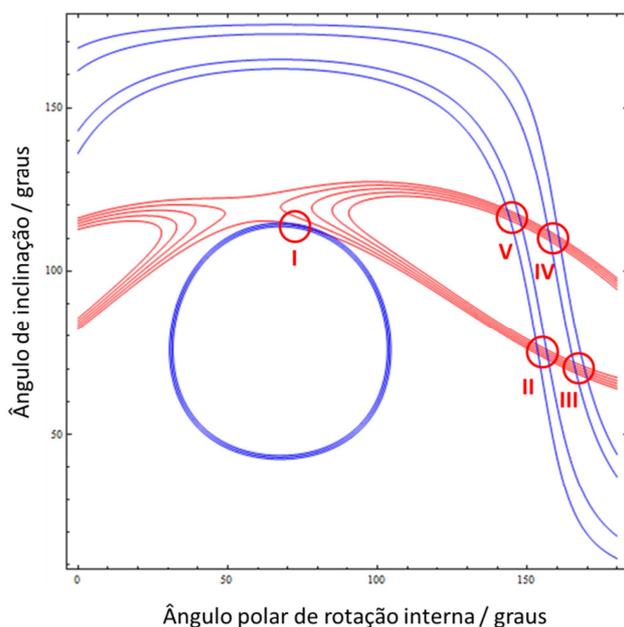


Figura 3.57. Alinhamentos possíveis do peptídeo L-Phes em bicamada de POPC, apresentados em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna. As curvas em azul representam orientações que concordam com o desdobramento quadrupolar de ^2H e as curvas em vermelho representam as orientações em concordância com o deslocamento químico experimental de RMN de ^{15}N . Os pontos de interseção, indicados por algarismos romanos, mostram orientações que concordam simultaneamente com os dois parâmetros e, portanto, representam as possíveis orientações do peptídeo nas bicamadas lipídicas.

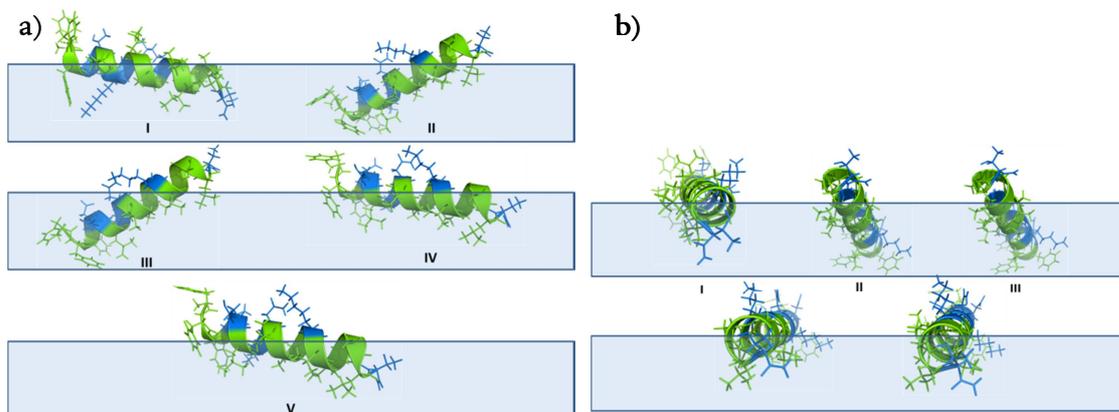


Figura 3.58. Representação dos possíveis alinhamentos indicados na Figura 3.57, para L-Phe, com estruturas vistas a) de lado e b) de frente. Os resíduos apolares estão representados em verde e os resíduos polares, em azul. A bicamada lipídica é representada pela área em azul claro.

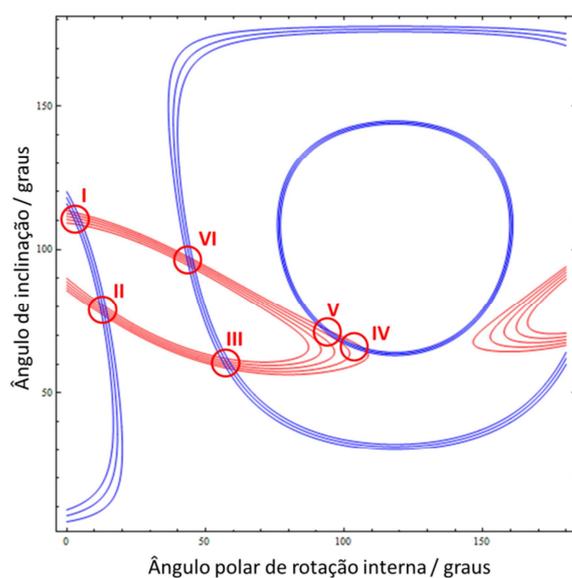


Figura 3.59. Alinhamentos possíveis do peptídeo D-Phe em bicamada de POPC, apresentados em função do ângulo de inclinação e do ângulo polar de rotação interna. Os pontos em azul representam orientações que concordam com o desdobramento quadrupolar de ^2H e as curvas em vermelho representam as orientações em concordância com o deslocamento químico experimental de RMN de ^{15}N . Os pontos de interseção, indicados por algarismos romanos, mostram orientações que concordam simultaneamente com os dois parâmetros e, portanto, representam as possíveis orientações do peptídeo nas bicamadas lipídicas.

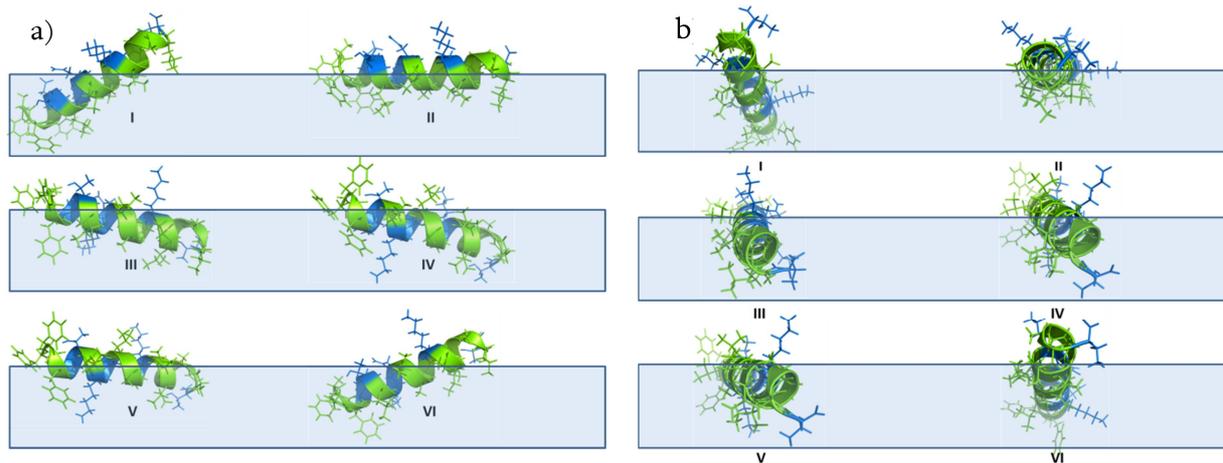


Figura 3.60. Representação dos possíveis alinhamentos indicados na Figura 3.59, para D-Phe, com estruturas vistas (a) lateral e (b) frontal. Os resíduos apolares estão representados em verde e os resíduos polares, em azul. A bicamada lipídica encontra-se representada pela área em azul claro.

Analisando-se a Figura 3.58 (p. 131) pela anfipaticidade das estruturas, pode-se concluir que, para o peptídeo L-Phe, as orientações mais favorecidas são as IV e V, devido ao fato de grande parte dos resíduos apolares estarem em contato direto com a bicamada fosfolipídica, sugerindo interações menos energéticas do peptídeo com o meio mimético de membrana. Entretanto, devido ao fato de a orientação IV promover uma melhor inserção dos resíduos de fenilalanina (hidrofóbicos) e menor inserção da extremidade *C*-terminal, em que se encontra o resíduo hidrofílico treonina (T18) no interior hidrofóbico da bicamada fosfolipídica, pode-se considerar esta como sendo a orientação mais provável. Com base nos mesmos critérios, pela análise da Figura 3.60, pode-se concluir que a orientação mais provável para D-Phe seria a orientação II, pois trata-se da única em que as cadeias laterais de resíduos polares não se encontram inseridas no interior da bicamada. Apenas as cadeias laterais de resíduos como lisina encontram-se parcialmente inseridas no meio hidrofóbico na representação da Figura 3.60. Isso sugere que a cadeia lateral desse resíduo interage com a interface da bicamada, que é polar. Além disso, os resíduos de fenilalanina encontram-se quase totalmente inseridos na bicamada, sugerindo um ancoramento que facilitaria a interação do entre o peptídeo e os fosfolípidos.

É interessante comparar os dois peptídeos epiméricos em relação à suas respectivas orientações mais prováveis. Primeiramente, observa-se que, para a D-Phe, a inserção dos resíduos de fenilalanina (F1, F2 e F3) no meio fosfolipídico se dá de maneira mais efetiva do que para a L-Phe, em que o resíduo F1 (considerando as orientações IV, Fig. 3.58, p. 131 e II, Fig. 3.60, p. 132, para a L-Phe e D-Phe, respectivamente) não estaria sequer em contato com a

região hidrofóbica da bicamada, considerando a estrutura estática utilizada para a simulação orientacional. Esses resultados sugerem um melhor ancoramento na bicamada por parte da D-Phes em comparação com a L-Phes. Essa interação diferencial da D-Phes com o meio mimético de membrana muito possivelmente deve-se ao estereoisômero D do resíduo F2, que induziria uma conformação da extremidade *N*-terminal mais propensa a se inserir de forma mais efetiva no interior hidrofóbico de agrupamentos fosfolipídicos. Ancoramentos como esse são normalmente bastante importantes para o exercício da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos, uma vez que eles promovem uma interação mais forte com a membrana bacteriana. De fato, esses resultados são coerentes com os testes antimicrobianos realizados com ambos os peptídeos (de Magalhães, 2012), em que se observa uma atividade bactericida maior por parte da D-Phes em relação à L-Phes. Esse ancoramento mais efetivo teria um papel importante nessa diferença de atividade.

No entanto, a configuração do C_{α} do resíduo de F2 na D-Phes não teria uma influência na extremidade *N*-terminal apenas, mas também na própria orientação da hélice. Isso é evidente tanto pelas imagens relativas às orientações mais prováveis quanto pelo próprio espectro de ^2H . Enquanto os resultados dos experimentos de RMN de ^{15}N indicam ângulos de inclinação relativamente próximos entre os peptídeos, a diferença dos valores de desdobramento quadrupolar de deutério aponta que os peptídeos adotam ângulos polares de rotação interna significativamente diferentes quando da interação deles com a bicamada fosfolipídica. Uma análise das Figuras 3.58 (p. 131) e 3.60 (p. 132) realmente mostra que a interação da região helicoidal da D-Phes com o meio mimético de membrana se dá de forma mais efetiva em comparação com a mesma região do peptídeo L-Phes. Por fim, uma outra característica geométrica interessante é a ligeira distorção da hélice apresentada nas estruturas da D-Phes. Essa distorção aparentemente promove uma maior inserção da cadeia lateral da L17 na bicamada, fazendo, ao mesmo tempo, com que o resíduo T18 fique em contato com a interface aquosa, e não com o interior hidrofóbico. Nos modelos para a L-Phes, em que tal distorção não é encontrada, o resíduo T18 encontra-se inserido no meio apolar da bicamada. Essa característica possivelmente influencia a melhor interação da D-Phes em relação a seu homólogo.

Além disso, analisando as larguras de linha dos sinais nos respectivos espectros de RMN de ^2H de L-Phes e de D-Phes, verifica-se que elas são diferentes, se apresentando maior para o primeiro peptídeo. Isso pode ser devido a diferenças de mobilidade de cada peptídeo no meio utilizado. Sendo assim, poder-se-ia inferir que, enquanto D-Phes apresentaria basicamente uma orientação majoritária, devido à menor largura de linha dos sinais (Fig. 3.56b, p. 129), L-Phes

interagiria com a bicamada em grande parte seguindo a orientação calculada, mas haveria uma população considerável de moléculas interagindo com a bicamada seguindo outras orientações. Essa inferência está em concordância com os dados de ensaios biológicos (de Magalhães et al., 2012), que mostram maior atividade antimicrobiana para a D-Phes, uma vez que interações peptídeo-membrana mais fortes refletem a adoção de uma orientação preferencial das moléculas do peptídeo em relação à bicamada fopsfolipídica. Por outro lado, a maior mobilidade de L-Phes, revelada pelos sinais de RMN mais largos, devidos à maior população de orientações moleculares, resulta em interações peptídeo-membranas mais fracas, sendo condizente com a menor atividade biológica verificada para este epímero.

3.4. Caracterização Termodinâmica do Processo de Interação Peptídeo/Membrana por Calorimetria de Titulação Isotérmica

Neste trabalho, o processo de interação dos peptídeos HSP2 com membranas miméticas de POPC:POPG (modelo de membrana bacteriana) foi estudado por calorimetria de titulação isotérmica, com o objetivo de determinar os parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔS , ΔG e K_p), o grau de interação X_b e o coeficiente estequiométrico da interação (n).

3.4.1 Determinação da entalpia de interação peptídeo-membrana

As curvas mostradas na Figura 3.61 (A e B), p. 135, representam o tipo de titulação descrito na introdução, com baixas razões P:L para o peptídeo HSP2 e lipossomas de POPC/POPG.

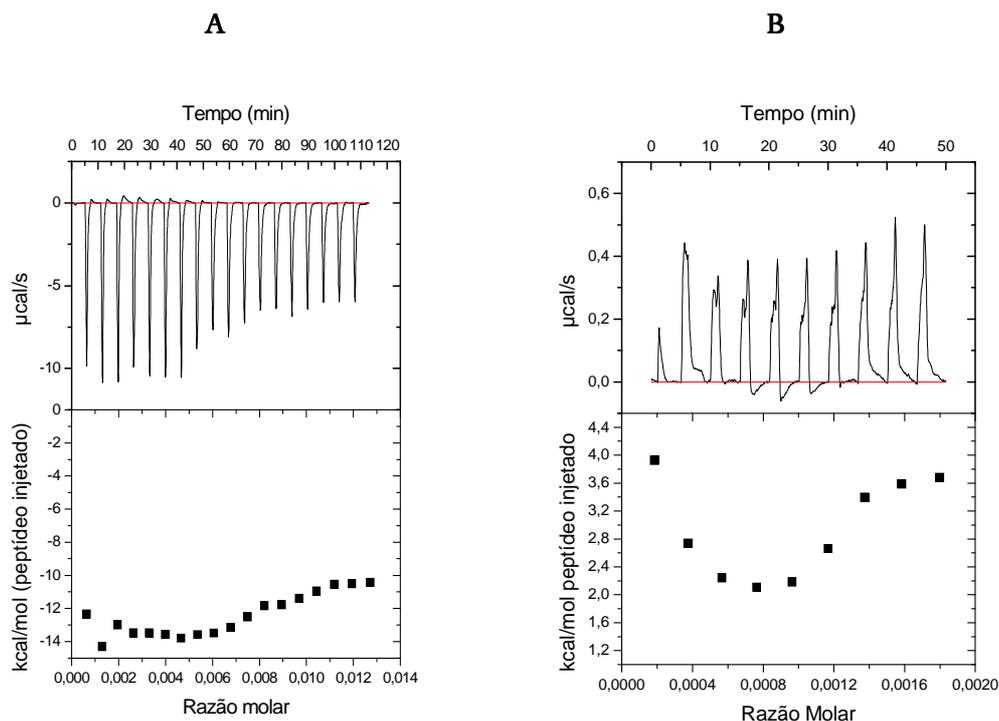


Figura 3.61. Curvas da titulação calorimétricas do lipossoma de POPC:POPG (3:1, mol:mol) (35 mM) com o peptídeo HSP2. **A:** injeção de 16 µL do peptídeo HSP2 na concentração 2 mM. **B:** injeção de 27 µL HSP2 na concentração 340 µM.

Tanto na Figura 3.61A quanto na Figura 3.61B a concentração do lipídeo na célula era 35 mM com volume a igual a 1,4244 mL (volume efetivo). Entretanto, observa-se que a interação depende da concentração de HSP2.

Na Figura 3.61A em que a concentração de HSP2 era 2 mM e o volume injetado 16 µL, a razão P:L variou de 1:1,548 (primeira injeção) a 1:78 (última injeção) com a entalpia de interação exotérmica. Na Figura 3.61B, esta mesma razão variou de 1:5,383 a 1:556, com a concentração do peptídeo de 340 µM e injeções de 27 µL e entalpia de interação endotérmica. Na Tabela 3.15 (p. 136) são mostrados os valores da variação de entalpia de interação obtidos.

O valor positivo para a variação da entalpia, quando a concentração do peptídeo é 340 µM pode ser justificada pela baixa razão P:L. A energia envolvida na dessolvatação do peptídeo é maior do que a energia de interação e inserção do peptídeo na membrana, não sendo, neste caso, entalpicamente favorável (Tabela 3.15). O processo endotérmico que se observa sugere um processo de agregação do peptídeo na superfície da membrana.

Tabela 3.15. Entalpia de interação de HSP2 com POPC:POPG 3:1(mol:mol)

Peptídeo/carga	Concentração do peptídeo	$\Delta_{exp}H$ (KJ/mol de peptídeo)
		POPC:POPG (3:1)
HSP2/+1	2 mM	-52,14
HSP2/+1	340 μ M	+12,32

De acordo com a Tabela 3.15, os valores das entalpias obtidas indicam uma interação peptídeo/lipídeo entalpicamente favorável. Numa primeira aproximação, estes valores representam a interação eletrostática entre o peptídeo e o lipídeo negativo da membrana e têm a magnitude dependente da carga do peptídeo HSP2.

As curvas de titulação obtidas das experiências em que o peptídeo está na célula e é titulado com lipídeo são mostradas nas Figuras 3.62A e 62-B.

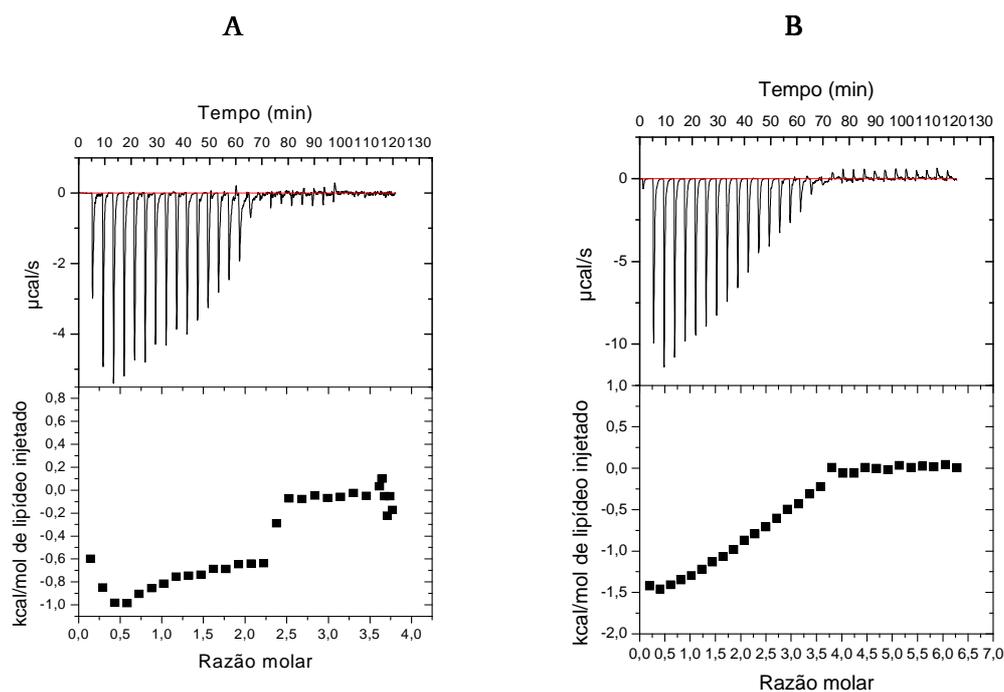


Figura 3.62. Curvas calorimétricas da titulação do peptídeo HSP2 850 μ M com com injeções de 6 μ L de lipossomas de POPC:POPG (3:1, mol:mol) (35 mM). **A:** T= 25 °C; **B:** T= 35 °C.

Nos experimentos de titulação mostrados nas Figuras 3.62 A e B, a razão P:L variou de 1:0,2 (início da titulação) a 1:6.3 (final da titulação). A razão peptídeo/lipídeo é baixa ao longo de

toda a titulação, verificando-se, neste caso, a saturação do lipossoma injetado na célula de titulação. A estequiometria da reação (n), calculada a partir da razão molar no ponto de inflexão da curva de titulação, é aproximadamente 2,5, indicando que cada molécula de peptídeo está envolvida por 2,5 moléculas de lipídeo no lipossoma. É de se notar a influência da temperatura na interação peptídeo-membrana. Tanto a 25 °C (Figura 3.62a, p. 136) quanto a 35 °C (Figura 3.62B, p. 136), a saturação ocorre com o mesmo número de injeções, já que a concentração do peptídeo utilizada em ambas as titulações é a mesma. No entanto, observa-se uma melhor interação na titulação efetuada a 35 °C tanto pelo formato da curva de titulação, quanto pela quantidade de calor liberada, a qual foi maior na titulação a 35 °C. Esta observação pode ser explicada pela maior flexibilidade das cabeças e mobilidade das cadeias carbonadas na temperatura de 35 °C, facilitando a interação e inserção do peptídeo na membrana.

O valor da entalpia experimental $\Delta_{exp}H^0$, que neste caso representa a entalpia do processo de interação (partição), é obtido pelo somatório dos calores q_i , de cada injeção (após descontada a contribuição da diluição no processo, que neste caso foi obtida como o valor médio dos q_i dos últimos picos, tomados quando o valor de q_i , estabiliza num valor positivo) dividido pelo número de mols de peptídeo total na célula (n_{pep}), de acordo com a Equação 3.1, apresentada a seguir:

$$\Delta H^0 = \frac{\sum_{k=1}^i \delta q_i}{n_{pep}} \quad (\text{Eq.3.1})$$

A partir do cálculo da variação de entalpia pela equação 3.3 e com o conjunto de equações 3.5 e 3.6 (Quadro 3.1, p. 139) calcula-se a constante de partição K_p (após a correção dos efeitos eletrostáticos, que afetam a concentração de peptídeo na membrana). Com o valor de K_p calculado foram obtidos os valores da variação da energia livre (ΔG^0) e da variação de entropia ΔS^0 . Os valores destes parâmetros, obtidos para o peptídeo HSP2 são mostrados na Tabela 3.16 (p. 143).

O processo de interação do peptídeo HSP2 em lipossomas de POPC:POPG foi avaliado considerando-se o efeito global (contribuição dos efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos em simultâneo) refletido no calor liberado por injeção (processo de partição simples), já que tanto o peptídeo quanto os lipossomas têm cargas.

A distribuição do peptídeo entre a fase aquosa e a fase lipídica é governada pela energia de transferência, isto é, pela variação de energia de Gibbs (ΔG^0) na passagem de uma fase para a outra. (White & Wimley, 1999; Wieprecht & Seelig, 2002; Seelig, 2004). A exata localização do peptídeo na membrana é influenciada fundamentalmente pela natureza das interacções electrostáticas, polares e apolares que se estabelecem.

A variação de energia de Gibbs (Eq. 3.2) de todo o processo pode ser obtida através do coeficiente de partição, K_p :

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K_p \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Numa situação de equilíbrio, onde $\Delta G = 0$; tem-se a Equação 3.3 então:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_p \text{ ou } \Delta G^0 = -RT \ln 55.5 K_p \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Na Equação 3.3 pode-se incluir o factor 55.5 que representa a contribuição translacional (entrópica) das moléculas de água para a energia livre do processo de partição (Hoffman, 1974; Holtzer, 1995).

A partir dos valores de ΔG^0 , obtém-se os valores de ΔS^0 , pela Equação 3.4:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad (\text{Eq. 3.4})$$

A variação da entalpia ΔH^0 , relacionada com o processo de partição, pode ser calculada de acordo com a Equação 3.1, a partir dos dados experimentais obtidos por ITC (Seelig, 1997; Wieprecht *et al.*, 1999),

$$X_{pep}^i = \frac{n_{pep}^i}{n_{pep}} \quad (3.5)$$

$$X_{pep}^i = \sum_{k=1}^i \delta q_i / \Delta H^0 n_{pep} \quad (3.6)$$

$$C_{pep,aq}^i = f_{dil}^i \left(\frac{n_{pep}}{V_{cel}} \right) (1 - X_{pep}^i) \quad (3.7)$$

$$f_{dil}^i = \frac{V_{cel}}{(V_{cel} + iV_{inj})} \quad (3.8)$$

$$n_{lip}^i = V_{inj} C_{lip}^i \quad (3.9)$$

$$X_b = \frac{n_{pep}^i}{n_{lip}^i} \quad (3.10)$$

$$X_b = K_p C_{pep,aq}^i \quad (3.11)$$

Quadro 3.1. Conjunto de equações usadas no cálculo de K_p a partir dos dados experimentais de titulação calorimétrica isotérmica, em que δq_i é o calor envolvido em cada injeção (já subtraído do calor de diluição) e n_{pep} é o número total de mols de peptídeo na célula do calorímetro.

No decurso da titulação, a fração de peptídeo ligado, à membrana, X_{pep}^i é dada pela Equação 3.5 do Quadro A, onde n_{pep}^i é a quantidade, em mols, de peptídeo ligado após a i ésima injeção. Se em cada injeção temos uma quantidade de calor trocada, δq_i , pode-se combinar as Equações 3.1. e 3.5 e expressar a fração ligada em função da entalpia do processo de interação, conforme a equação 3.6.

A partir do valor de X_{pep}^i pode-se estimar a quantidade de peptídeo que permanece livre na solução aquosa, após o equilíbrio de partição a qual pode ser calculada pela Equação 3.7.

A concentração $C_{pep,aq}^i$ deve ser corrigida por um factor de diluição f_{dil}^i (Equação 3.8) no caso de se usar o VP-ITC, porque o volume efetivo da célula (1.4244 mL) mantém-se, mas há uma diluição do peptídeo pela quantidade injetada (volume esse que é expulso da célula). O volume efetivo da célula calorimétrica é V_{cel} , i é o número da injeção e V_{inj} é o volume injetado.

À medida em que a titulação prossegue, a quantidade de lipídeo injetada na célula calorimétrica aumenta. A quantidade de lipídeo, n_{lip}^i , presente na célula, e a concentração C_{lip}^i , em mol, do lipídeo na seringa na injeção i são contabilizados de acordo com a equação 3.9.

Pode-se calcular a fração de partição peptídeo/lipídeo, X_b , da Equação 3.10, pela razão entre a quantidade, em mol, de peptídeo ligado n_{pep}^i e a quantidade, em mol, de lipídeo n_{lip}^i , após cada injeção.

Se a interação do peptídeo com a membrana corresponder a um processo de partição simples (em que se considera que o peptídeo, ou está na solução, ou está na membrana lipídica), a curva da fração de partição X_b em função da concentração do peptídeo em solução aquosa $C_{pep, aq}^i$ deve ser linear e o declive desta curva fornece o valor da constante de partição, K_p , conforme a Equação 3.11 (Breukink *et al.*, 2000). Neste caso, os efeitos de carga (eletrostáticos) e hidrofóbicos são considerados em conjunto.

A representação gráfica da fração de peptídeo HSP2 ligada (X_b) à membrana mimética de POPC:POPG em função da concentração do peptídeo livre na fase aquosa, ($C_{pep, aq}$) é apresentada nas Figuras 3.63 (A e B, p. 142). A Figura 3.63 A (p. 142) representa os dados obtidos na titulação calorimétrica isotérmica a 25°C e a Figura 3.63 B (p. 142) representa os mesmos dados, obtidos a 35°C. Na Tabela 3.16 (p. 143) estão mostrados os valores dos parâmetros termodinâmicos da interação peptídeo/membrana, obtidos por ITC.

Observa-se uma relação linear entre X_b e $C_{pep, aq}$ com um bom coeficiente de correlação nos dois casos. Os valores de K_p (Tabela 3.16, p. 143) obtidos através das inclinações das retas tem valores semelhantes para o mesmo peptídeo, tanto a 25°C, quanto a 35°C. Este resultado sugere que, no processo de partição há uma significativa contribuição do efeito hidrofóbico e que a interação electrostática não é dominante. De fato, a carga nominal do peptídeo HSP2 é +1 e este peptídeo tem uma conformação bastante anfipática (Figuras 1.9, p. 15 e 3.46, p. 127), o que facilita a sua inserção na membrana lipídica.

Nos valores negativos encontrados para o ΔH^0 (Tabela 3.16, p. 143) estão somadas as interações eletrostáticas e hidrofóbicas do peptídeo HSP2 com os lipídeos da membrana. Estes valores também contabilizam as ligações de H intramoleculares da estrutura em hélice do peptídeo formada no momento da interação com a membrana. A magnitude desta interação foi influenciada pela temperatura, já que o maior valor ΔH^0 foi obtido a 35°C. Como descrito

anteriormente, o aumento da temperatura aumenta a mobilidade das cabeças e das cadeias carbonadas do lipídeo, facilitando a inserção do peptídeo.

Em relação aos valores de $T\Delta S^0$ observa-se na Tabela 3.16, p. 143, que os valores são positivos, indicando a contribuição da componente entrópica no processo de partição do peptídeo para a membrana. Esta observação está de acordo com o processo de interação e inserção do peptídeo na membrana que envolve algumas etapas: inicialmente o peptídeo é atraído para a superfície da membrana por efeito eletrostático e esta interação é geralmente dirigida pela entalpia. Em seguida, o peptídeo que se encontrava desestruturado, na fase aquosa, estrutura-se em α -hélice ou folha- β (este processo é, geralmente, entalpicamente favorável).

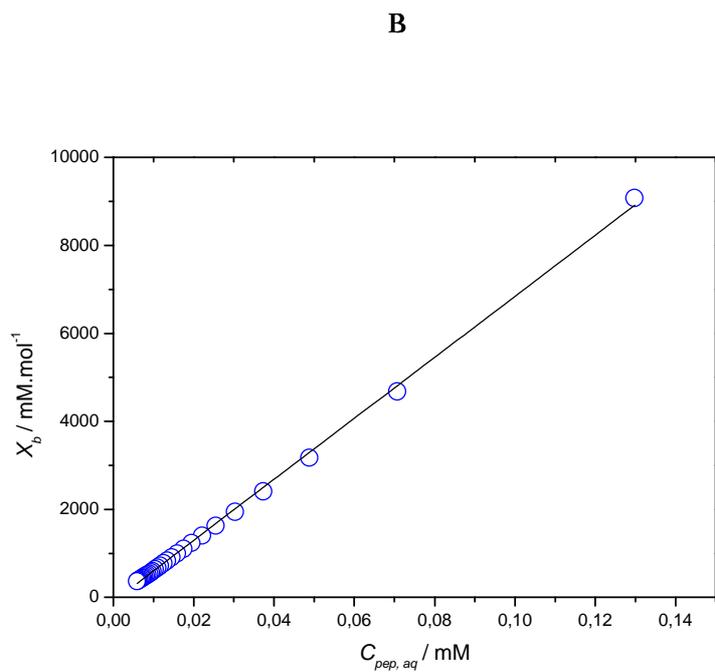
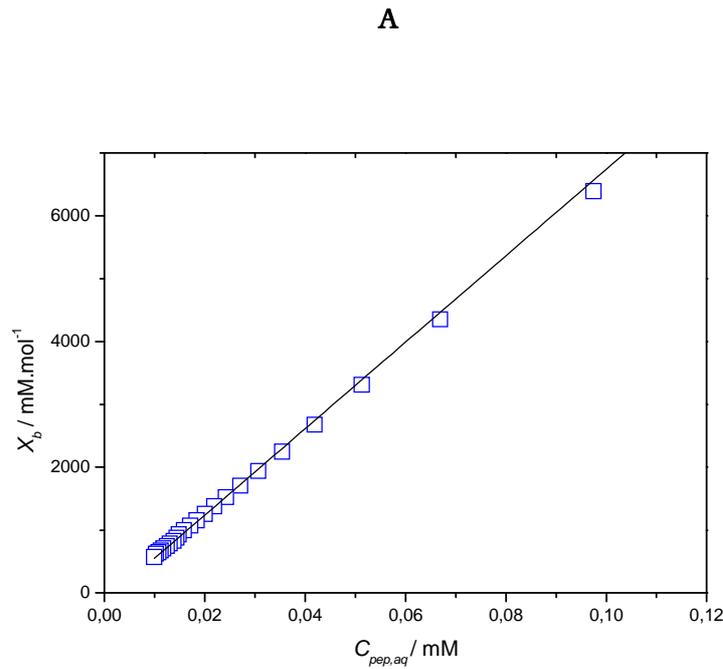


Figura 3.63. Representação gráfica da fração ligada do peptídeo em função da concentração do peptídeo livre em fase aquosa para o HSP2 a $850 \mu\text{M}$ em membranas lipídicas de POPC:POPG (3:1) 35 mM. **A:** titulação a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; valor de $R^2 = 0,9993$. **B:** A: titulação a $35 \text{ }^\circ\text{C}$; valor de $R^2 = 0,9989$. Os valores de K_p foram obtidos a partir das inclinações das curvas.

Tabela 3.16. Valores dos parâmetros termodinâmicos experimentais obtidos por ITC para HSP2

Peptídeo	Concentração do peptídeo (μM) <hr/> (P:L)	K_p	ΔH^0 (kJ/mol de peptídeo)	$T\Delta S^0$ (kJ/mol de peptídeo)	ΔG^0 (kJ/mol de peptídeo)
HSP2 25 °C	850 (1:0,2-1:5,2)	$6,88 \times 10^4$	-6,76	30,80	-37,56
HSP2 35 °C	850 (1:0,2-1:5,2)	$6,94 \times 10^4$	-13,64	25,20	-38,64

Por último, o peptídeo insere-se no núcleo hidrofóbico da membrana e esta inserção pode ser entalpicamente dirigida pelas ligações de H e as interações de van der Waals formadas, mas também pode ser governada entropicamente por efeito hidrofóbico (Seelig, 1997; Seelig, 2004). A entropia do processo inclui a mudança conformacional do peptídeo e a perda de água da camada de solvatação (aumento dos graus de liberdade rotacional e translacional das moléculas de água) durante a inserção. Desta maneira o balanço entálpico e entrópico do processo de interação peptídeo/membrana pode favorecer a entropia.

A maior componente entrópica ($T\Delta S^0$) na interação com a membrana foi verificada à temperatura de 25 °C. A diferença encontrada é justificada pelo menor valor da entalpia, em relação à temperatura de 35 °C.

Os valores negativos da energia de Gibbs (ΔG^0) confirmam que o processo partição é energeticamente favorável, indicando que o peptídeo particiona espontaneamente para a membrana.

4. Conclusão

No trabalho apresentado nesta tese, foram realizados experimentos de naturezas distintas e complementares para elucidar aspectos estruturais e termodinâmicos de três peptídeos antimicrobianos (Distinctina, Hilaseptina P2, abreviada como HSP2, [L-Phe²]-Fenilseptina e [D-Phe²]-Fenilseptina, abreviados como L-Phes e D-Phes, respectivamente). As metodologias empregadas foram Dicroísmo Circular (CD), RMN em solução, RMN em fase sólida e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e todas forneceram informações valiosas e complementares entre si para se entender de forma mais completa as propriedades dessas substâncias que possibilitam o exercício de suas atividades biológicas que, no caso, são atividades antimicrobianas.

4.1. *Distinctina e Cadeias 1 e 2*

Em relação à distinctina, os estudos de CD mostraram que ambos os monômeros (Cadeias 1 e 2) estruturam-se em meios miméticos de membrana, embora nenhuma estruturação significativa possa ser identificada em água. Resultado semelhante foi obtido para o heterodímero distinctina, que se estrutura consideravelmente bem em meio vesicular. Entretanto, diferenças foram observadas quando se comparou o conteúdo de estruturas α -hélice obtido em experimentos em 2,2,2-trifluoretol (TFE). Tais resultados podem indicar que a interação do heterodímero com meios miméticos de membrana (no caso, vesículas fosfolipídicas) em solução pode ser melhor descrita como um equilíbrio envolvendo mais de uma espécie termodinâmica, devido à ausência de um ponto isobélicos (ou isodicroico). Embora os resultados de RMN em fase sólida descritos em Magalhães e colaboradores em 2009 mostrem que a distinctina interage com bicamadas fosfolipídicas com as cadeias orientadas *quasi*-paralelamente entre si, esse estudo não leva em conta o equilíbrio termodinâmico dessa interação e esse caráter está refletido nos resultados obtidos por CD. O conjunto de modelos obtido a partir de dados de RMN em solução da distinctina em TFE reflete de certa maneira esse dinamismo estrutural, mostrando grande variabilidade da orientação de uma cadeia em relação à outra. Além disso, não foram observadas correlações NOE de longo alcance entre as duas cadeias. Embora a ausência dessas correlações não implique necessariamente que o peptídeo adote uma conformação com as cadeias

monoméricas orientadas paralelamente entre si, esses resultados evidenciam que não há interações intercadeia suficientemente fortes para estabilizar uma estrutura quaternária tal qual a observada para a distinctina em água (Raimondo *et al.*, 2005). Comportamento semelhante foi observado para o peptídeo homodimérico Homotarsinina (Verly, 2010), em que espectros obtidos com a substância em água mostram correlações intercadeia bem definidas que refletem uma estruturação do tipo *coiled coil*, ou super-hélice, mas espectros deste peptídeo em DPC não mostram tais NOEs intercadeia, levando a um modelo cuja orientação das unidades monoméricas não é bem definida.

Por fim, os resultados de RMN em solução da distinctina mostram que a melhor estratégia a ser tomada para o estudo deste peptídeo em solução seria utilizar meios que induzam a uma ordenação da sua molécula, como, por exemplo, bicelas. Dessa forma, seria possível obter valores de orientação entre as cadeias levando em conta, ainda, o aspecto dinâmico da conformação molecular quando em solução. Esses resultados ajudariam na descrição da interação peptídeo-membrana bacteriana, especialmente se aliados aos dados estruturais pré-existentes. No momento da redação deste trabalho, estão, ainda, em curso, estudos termodinâmicos por ITC da distinctina e de suas cadeias monoméricas quando interagem com lipossomas. Estes estudos podem não só fornecer informações extremamente relevantes das interações em si, mas também da termodinâmica envolvida na mudança conformacional dos peptídeos quando passam de um meio totalmente aquoso para outro meio rico em fosfolípidos. Além disso, seria possível estudar o papel da ligação dissulfeto sobre a atividade antimicrobiana, bem como a possível sinergia entre as Cadeias 1 e 2 da distinctina no que diz respeito à sua atividade bactericida.

Todas estas observações mostram que, embora se tenha informações definidas a respeito das estruturações da distinctina e das Cadeias 1 e 2 em meios miméticos aos quais elas exercem suas atividades biológicas, a elucidação do mecanismo relativo às suas propriedades antimicrobianas ainda necessita de diversos outros estudos, e é de importância significativa para a compreensão da natureza dessa nova classe de antibióticos à qual pertencem os peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anuros.

4.2. *Hilseptina P2 (HSP2)*

Para este peptídeo, os experimentos de CD mostraram que, embora o peptídeo seja majoritariamente desestruturado em meio totalmente aquoso, ele apresenta conteúdo elevado de α -hélice quando se encontra em meio fosfolipídico. Este tipo de comportamento, como já comentado, é bastante comum em peptídeos antimicrobianos, especialmente com de hélices anfipáticas, que propiciam interações mais efetivas com membranas bacterianas. De fato, os resultados obtidos por RMN na presença de TFE mostram que o peptídeo tem maior propensão em adotar a forma α -helicoidal e que esta estrutura é bastante anfipática, o que é coerente tanto com os resultados de CD quanto com as características estruturais de outros peptídeos antimicrobianos isolados da pele de anuros. Os estudos de RMN em fase sólida permitiram determinação da orientação mais provável (orientação VI, Fig 3.53, p. 132) desse peptídeo no meio de bicamada fosfolipídica e mostraram que a estruturação adotada por HSP2 tem papel importante na interação entre este peptídeo e fosfolipídeos.

Os estudos por ITC forneceram informações complementares a respeito da interação entre HSP2 e lipossomas, podendo-se extrair conclusões a respeito da estequiometria dessa interação, bem como os parâmetros termodinâmicos envolvidos. Interessantemente, os resultados mostraram que a eficácia dessa interação depende bastante da concentração do peptídeo, ou melhor, da razão peptídeo:lipídeo. Em situações em que essa razão é baixa, a interação não é entalpicamente favorecida e a análise desses dados parece sugerir que a capacidade de agregação da HSP2 tem um papel significativo no exercício de sua atividade biológica. Outro dado interessante que pôde ser extraído é a respeito da natureza dessa interação que é majoritariamente de natureza hidrofóbica, considerando a anfipaticidade da hélice, embora interações de natureza eletrostáticas tenham papel importante em uma interação preliminar entre a HSP2 e o lipossoma, responsável pela aproximação inicial do peptídeo ao meio fosfolipídico.

Agrupando-se os resultados obtidos para a HSP2, pode-se chegar a uma imagem mais geral a respeito da maneira pela qual o peptídeo interage com a membrana. A presença de resíduos carregados positivamente em meio fisiológico, como a lisina, na sequência de aminoácidos de HSP2 teria papel fundamental na aproximação inicial do peptídeo com a membrana bacteriana, porém, após essa aproximação inicial, a interação seria mantida por fatores relativos à hidrofobicidade e relacionados diretamente à face hidrofóbica da hélice. Essas

observações são bastante coerentes tanto com os resultados de RMN em solução, que mostrou uma estruturação em α -hélice anfipática, quanto com a topologia da orientação determinada por RMN em fase sólida, que mostra que o modelo obtido experimentalmente pode ser utilizado com sucesso para descrever a relação estrutura-atividade dessa substância.

Apesar de algumas características que podem levar à atividade antimicrobiana de HSP2 terem sido elucidadas por estes experimentos, o estudo do mecanismo pelo qual se dá essa atividade ainda está no início. Primeiramente, deve-se levar em conta que os experimentos de RMN em solução foram realizados com o peptídeo na presença de TFE. Embora os resultados obtidos nesse meio possam ser a princípio utilizados para explicar estruturações em membranas, a utilização de resultados obtidos com o peptídeo na presença de micelas de DPC pode fornecer modelos mais precisos para serem submetidos às restrições orientacionais obtidas por estudos de RMN em fase sólida e, por fim construir-se uma imagem mais completa da interação do peptídeo com a membrana. A utilização de meios que não sejam o TFE é importante pelo fato de se ter uma melhor noção da presença ou ausência de uma estruturação definida nas extremidades da cadeia polipeptídica, bem como da natureza dessa estrutura, uma vez que este solvente pode de certa maneira forçar a estruturação em α -hélice dessas extremidades quando, em meio fisiológico, elas não possuem tal conformação. A determinação mais precisa da geometria dessas terminações é importante devido ao fato de elas muitas vezes interagirem com o interior hidrofóbico das membranas, agindo como se fossem “âncoras” e potencializando a capacidade de interação do peptídeo. No entanto, pode-se considerar que os resultados obtidos em TFE fornecem informações extremamente relevantes a respeito do papel da estrutura secundária em questão (que foi observada nos experimentos de CD) na atividade biológica da HSP2. No momento da escrita dessa conclusão, os experimentos em DPC já haviam sido realizados, mas ainda não analisados e atribuídos.

4.3. [L-Phe²]-Fenilseptina (L-Phes) e [D-Phe²]-Fenilseptina (D-Phes)

Os resultados obtidos para as fenilseptinas permitiram não só chegar a conclusões a respeito de alguns aspectos envolvidos em seus mecanismos de ação, mas também analisar a influência de uma epimerização perto de uma das extremidades da cadeia peptídica sobre a

estrutura e interação com fosfolipídeos. Resultados obtidos por RMN em solução mostraram que ambos os peptídeos adotam estruturas ricas em α -hélice, mas exceto por uma estruturação ligeiramente maior da D-Phes, não foram observadas diferenças significativas entre os modelos para cada peptídeo. Os resultados de RMN em fase sólida, no entanto, mostram que há diferença considerável na orientação desses peptídeos quando de suas interações com bicamadas fosfolipídicas. Aplicando-se as restrições orientacionais sobre os modelos obtidos por RMN em solução na presença de micelas de DPC, pôde-se observar que, embora ambas as estruturas satisfaçam o critério de que a face hidrofóbica de suas hélices anfipáticas interaja com o interior alifático da bicamada, a inserção da extremidade *N*-terminal da D-Phes, que apresenta o motivo Phe-Phe-Phe característico das fenilseptinas, é maior, sugerindo um melhor ancoramento do peptídeo na bicamada lipídica. Esse melhor ancoramento seria devido ao fato de o segundo resíduo de Phe ser o estereoisômero D e é bastante coerente com o fato de a D-Phes apresentar maior atividade antimicrobiana que seu epímero, a L-Phes, sugerindo também, um melhor empilhamento aromático na D-Phes que na L-Phes

Futuramente, seria interessante descobrir aspectos adicionais relativos a essa interação diferenciada a partir de experimentos como ITC e simulações de Dinâmica Molecular, que podem fornecer informações complementares em relação à termodinâmica da interação e também detalhes a nível atômico e a variação temporal de certas propriedades. Entretanto, os resultados de RMN puderam com sucesso conciliar as características estruturais de ambos os peptídeos com os dados de atividade biológica existentes.

4.4. Considerações Finais

Com base no arsenal de métodos existentes para o estudo estrutural e termodinâmico dos peptídeos, foi possível elucidar alguns aspectos a respeito da estruturação e atividade biológica dessas substâncias. A determinação geométrica de peptídeos antimicrobianos tem se mostrado bastante importante no entendimento de suas respectivas atividades biológicas. Entretanto, é cada vez mais necessário o uso de outras técnicas para se construir um melhor modelo de mecanismo de atividade para as substâncias que apresentem grande potencial de aplicação farmacológica. A utilização de RMN no estado sólido de amostras orientadas, em especial, pode fornecer resultados extremamente importantes em relação à maneira pela qual essa interação

ocorre e que dificilmente poderia ser obtida experimentalmente por outra técnica. Embora ainda haja certas limitações no que tange a RMN, sua utilização tem-se mostrado fundamental para a compreensão de diversos aspectos relativos a peptídeos e proteínas no geral. Essa capacidade da RMN é ainda mais potencializada quando utilizada em conjunto com outras técnicas como ITC, que fornece informações termodinâmicas, as quais aliadas às informações estruturais permitem a construção de modelos mais precisos e completos sobre a atividade biológica dessas substâncias.

5. Referências Bibliográficas

- Aisenbrey, C. & B. Bechinger (2004). "Tilt and rotational pitch angle of membrane-inserted polypeptides from combined ^{15}N and ^2H solid-state NMR spectroscopy." *Biochemistry* **43**(32): 10502-10512.
- Aisenbrey, C., P. Bertani, et al. (2010). "Solid-state NMR investigations of membrane-associated antimicrobial peptides." *Methods Mol Biol* **618**: 209-233.
- Arseniev, A. S., V. I. Kondakov, et al. (1984). "NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I5A." *FEBS Lett* **165**.
- Batista, C. V., L. R. da Silva, et al. (1999). "Antimicrobial peptides from the Brazilian frog *Phyllomedusa distincta*." *Peptides* **20**(6): 679-686.
- Batista, C. V., A. Scaloni, et al. (2001). "A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*." *FEBS Lett* **494**(1-2): 85-89.
- Bechinger, B. (1996). "Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides." *J Mol Biol* **263**(5): 768-775.
- Bechinger, B. (1999). "The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 157-183.
- Bechinger, B., R. Kinder, et al. (1999). "Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy." *Biopolymers* **51**(3): 174-190.
- Bechinger, B. & J. Seelig (1991). "Conformational changes of the phosphatidylcholine headgroup due to membrane dehydration. A ^2H -NMR study." *Chem Phys Lipids* **58**(1-2): 1-5.
- Bevins, C. L. & M. Zasloff (1990). "Peptides from frog skin." *Annu Rev Biochem* **59**: 395-414.
- Bierbraum, G. & H.-G. Sahl (1985). "Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotic pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes." *Arch Microbiol* **141**.
- Bloch Jr., B. (2011) Transmissão oral.

- Boman, H. G. (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity." Annu Rev Immunol **13**: 61-92.
- Braun, W., C. Bosch, et al. (1981). "Combined use of proton-proton Overhauser enhancements and a distance geometry algorithm for determination of polypeptide conformations. Application to micelle-bound glucagon." Biochim Biophys Acta **667**(2): 377-396.
- Braun, W. & N. Go (1985). "Calculation of protein conformations by proton-proton distance constraints. A new efficient algorithm." J Mol Biol **186**(3): 611-626.
- Breukink, E., P. Ganz, et al. (2000). "Binding of nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry." Biochemistry **39**(33): 10247-10254.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1997). "New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR." Structure **5**(3): 325-336.
- Brunger, A. T., A. Krukowski, et al. (1990). "Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing." Acta Crystallogr A **46 (Pt 7)**: 585-593.
- Cantor, C. R. T., S.N. (1982). Optical Spectroscopy of Proteins. The Proteins. H. N. R. H. Editors. New York, Academic Press. **5**: 145-306.
- Cavanagh, J., W. J. Fairbrother, et al. (2006). Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. Oxford, Elsevier Academic Press.
- Cavanagh, J., W. J. Fairbrother, et al. (2006). Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice. New York, Academic Press.
- Chan, W. C. & P. D. White (2000). Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press.
- Chan, W. C. W., P.D. (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Clore, G. M. & A. M. Gronenborn (1991). "Two-, three-, and four-dimensional NMR methods for obtaining larger and more precise three-dimensional structures of proteins in solution." Annu Rev Biophys Biophys Chem **20**: 29-63.

Clore, G. M., M. Nilges, et al. (1986). "The three-dimensional structure of alpha1-purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics." EMBO J **5**(10): 2729-2735.

Clore, G. M., M. R. Starich, et al. (1999). "Impact of Residual Dipolar Couplings on the Accuracy of NMR Structures Determined from a Minimal Number of NOE Restraints." J Am Chem Soc **121**.

Cordier, F. & S. Grzesiek (1999). "Direct observation of hydrogen bonds in proteins by interresidue $3h/NC'$ scalar couplings." J Am Chem Soc **121**: 1601-1602.

Cordier, F., M. Rogowski, et al. (1999). "Observation of through-hydrogen-bond $2h/JHC'$ in a perdeuterated protein." J Magn Reson **140**(2): 510-512.

Cornilescu, G., F. Delaglio, et al. (1999). "Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology." J Biomol NMR **13**(3): 289-302.

Cross, T. A. (1997). "Solid-state nuclear magnetic resonance characterization of gramicidin channel structure." Methods Enzymol **289**: 672-696.

Csordas, A. & H. Michl (1970). "The isolation of bombinin." Monatshefte für Chemie **101**.

de Magalhães, M. T. Q. P., M.V.; Verly, R.M.; Munhoz, V.H.O.; Barbosa, E.A.; Silva, L.P.; de Araujo, I.E.; Bloch Jr, C. (2012). "Phenylseptin: Peptides with structural diversity and new biological insights." Artigo submetido.

Delaglio, F., S. Grzesiek, et al. (1995). "NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes." J Biomol NMR **6**(3): 277-293.

Delaglio, F., Z. Wu, et al. (2001). "Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra." J Magn Reson **149**(2): 276-281.

Duer, M. J. (2004). Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.

Fletcher, D. M., D. N. M. Jones, et al. (1996). "Treatment of NOE constraints involving equivalent or nonstereoassigned protons in calculations of biomolecular structures." J Biomol NMR **8**: 292-310.

Gil, V. M. S. G., C.F.G.C. (1987). Ressonância Magnética Nuclear - Fundamentos, Métodos e Aplicações. Coimbra, Portugal, Fundação Calouste Gulbenkian.

Griesinger, C., O. W. Sorensen, et al. (1985). "Two-dimensional correlation of connected NMR transitions." J Am Chem Soc **107**.

Guntert, P. (1998). "Structure calculation of biological macromolecules from NMR data." Q Rev Biophys **31**(2): 145-237.

Güntert, P. (1998). "Structure calculation of biological macromolecules from NMR data." Quarterly Reviews of Biophysics **31**: 145-237.

Guntert, P., W. Braun, et al. (1991). "Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA." J Mol Biol **217**(3): 517-530.

Havel, T. F. & K. Wüthrich (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." Bull Math Biol **46**.

Hoffman, A. S. (1974). "Principles governing biomolecule interactions at foreign interfaces." Journal of Biomedical Materials Research **8**(3): 77-83.

Hoffmann, W., K. Richter, et al. (1983). "A novel peptide designated PYLa and its precursor as predicted from cloned mRNA of *Xenopus laevis* skin." EMBO J **2**(5): 711-714.

Holtzer, A. (1995). "The cratic correction and related fallacies." Biopolymers **35**(6): 595-602.

Hooft, R. W., C. Sander, et al. (1997). "Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot." Comput Appl Biosci **13**(4): 425-430.

Huang, H. W. (2000). "Action of antimicrobial peptides: two-state model." Biochemistry **39**: 8347-8352.

Ishibashi, N. K., T.; Chino, M.; Fukui, H.; Shinoda, I.; Kikuchi, E.; Okai, H.; Fukui, S. (1988). "Role of the Hydrophobic Amino Acid Residue in the Bitterness of Peptides." Agricultural and Biological Chemistry **52**(1): 91-94.

Jacobson, B., W. A. Anderson, et al. (1954). "A Proton Magnetic Resonance Study of the Hydration of Deoxyribonucleic Acid." Nature **173**.

Johnson, B. A. B., R.A. (1994). "NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data " J Biomol NMR **4**: 603-614.

Kaiser, E., R. L. Colescott, et al. (1970). "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides." Anal Biochem **34**(2): 595-598.

Karplus, M. (1959). "Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments." J Chem Phys **30**: 11-15.

Ketchum, R. R., W. Hu, et al. (1994). "Structure and dynamics from solid state NMR spectroscopy." Structure **2**(8): 699-701.

Kim, H. O. L.-C., E.C. (2006). "Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Bitter Peptides." J Agric Food Chem **54**: 10102-10111.

Kline, A. D., W. Braun, et al. (1986). "Studies by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the alpha-amylase inhibitor tendamistat." J Mol Biol **189**(2): 377-382.

Konrat, R., M. Tollinger, et al. (1999). "NMR techniques to study hydrogen bonding in aqueous solution." Monatshefte für Chemie **130**.

Koradi, R., M. Billeter, et al. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." J Mol Graph **14**(1): 51-55, 29-32.

Kragol, G., S. Lovas, et al. (2001). "The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding." Biochemistry **40**(10): 3016-3026.

Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, et al. (1996). "AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR." J Biomol NMR **8**(4): 477-486.

Laws, D. D., H. M. Bitter, et al. (2002). "Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry." Angew Chem Int Ed Engl **41**(17): 3096-3129.

Lelj, F. T., T.; Temussi, P.A.; Toniolo, C.; (1980). "Interaction of alpha-L-aspartyl-D-phenylalanine methyl ester with the receptor site of the bitter taste." Farmaco Sci. **35**: 988-996.

Linge, J. P., M. Habeck, et al. (2003). "ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation." Bioinformatics **19**(2): 315-316.

Linge, J. P., M. A. Williams, et al. (2003). "Refinement of protein structures in explicit solvent." Proteins **50**(3): 496-506.

Lipsitz, R. S. & N. Tjandra (2004). "Residual dipolar couplings in NMR structure analysis." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 387-413.

MacArthur, M. W. & J. M. Thornton (1996). "Deviations from planarity of the peptide bond in peptides and proteins." J Mol Biol **264**(5): 1180-1195.

Maehashi, K. H., L. (2009). "Bitter peptides and bitter taste receptors " Cell Mol Life Sci **66**: 1661-1671.

Markley, J. L., A. Bax, et al. (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." J Biomol NMR **12**(1): 1-23.

Matsuzaki, K. (1999). "Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes." Biochim. Biophys. Acta **1462**: 1-10.

Matsuzaki, K. (1999). "Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 1-10.

Moraes, C. M. & B. Bechinger (2004). "Peptide-related alterations of membrane-associated water: deuterium solid-state NMR investigations of phosphatidylcholine membranes at different hydration levels." Magn Reson Chem **42**(2): 155-161.

Morris, A. L., M. W. MacArthur, et al. (1992). "Stereochemical quality of protein structure coordinates." Proteins **12**(4): 345-364.

Mujeeb, A., N. B. Ulyanov, et al., Eds. (1999). Conformational Ensemble Calculations: Analysis of Protein and Nucleic Acid NMR Data. Biological Magnetic Resonance. New York, Kluwer Academics/Plenum Publishers.

Munster, C., A. Spaar, et al. (2002). "Magainin 2 in phospholipid bilayers: peptide orientation and lipid chain ordering studied by X-ray diffraction." Biochim Biophys Acta **1562**(1-2): 37-44.

Nabuurs, S. B., E. Krieger, et al. (2005). "Definition of a new information-based per-residue quality parameter." J Biomol NMR **33**(2): 123-134.

Nabuurs, S. B., C. A. Spronk, et al. (2003). "Quantitative evaluation of experimental NMR restraints." J Am Chem Soc **125**(39): 12026-12034.

Nabuurs, S. B., C. A. Spronk, et al. (2004). "Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation." Concepts in Magnetic Resonance **22A**(2): 90-105.

New, R. R. C. (1990). Liposomes: A practical approach. New York, Oxford University Press.

Nilges, M., Ed. (2001). Applications of Molecular Modeling in NMR Structure Determination. Computational Biochemistry and Biophysics. New York, M. Dekker, Inc.

Nilges, M., G. M. Clore, et al. (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." FEBS Lett **239**(1): 129-136.

Otagiri, K. N., Y.; Shinoda, I.; Fukui, H.; Okai, H. (1985). "Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. I. Bitter taste of di- and tripeptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide chain." Agricultural and Biological Chemistry **49**: 1019-1026.

Papo, N. S., Y. (2005). "Host defense peptides as new weapons in cancer treatment." Cell. Mol. Life Sci **62**: 784-790.

Perez, C. A. H., L.; Rong, M.; Kozak, J.A.; Preuss, A.K.; Zhang, H.; Max, M.; Margolskee, R.F. (2002). "A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells." Nature Neuroscience **5**: 1169-1176.

Pflugrath, J. W., G. Wiegand, et al. (1986). "Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the alpha-amylase inhibitor Hoe-467A." J Mol Biol **189**(2): 383-386.

Raimondo, D., G. Andreotti, et al. (2005). "A folding-dependent mechanism of antimicrobial peptide resistance to degradation unveiled by solution structure of distinctin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6309-6314.

Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan, et al. (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." J Mol Biol **7**: 95-99.

Resende, J. M., C. M. Moraes, et al. (2009). "Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16639-16644.

Rice, L. M. & A. T. Brunger (1994). "Torsion angle dynamics: reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement." Proteins **19**(4): 277-290.

Rossler, P. K., C.; Freitag, J.; Noe, J.; Breer, H. (1998). "Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells." Eur J Cell Biol **77**: 253-261.

Saunders, M., A. Wishna, et al. (1957). "The Nuclear Magnetic Resonance of Ribonuclease 1." J Am Chem Soc **79**.

Schwieters, C. D., J. J. Kuszewski, et al. (2003). "The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package." J Magn Reson **160**(1): 65-73.

Seelig, J. (1977). "Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes." Q Rev Biophys **10**(3): 353-418.

Seelig, J. (1997). "Titration calorimetry of lipid-peptide interactions." Biochim Biophys Acta **1331**(1): 103-116.

Seelig, J. (1997). "Titration calorimetry of lipid-peptide interactions " Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes **1331**(1): 103-116

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

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

Shai, Y. (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides." Biochim. Biophys. Acta **1462**: 55-70.

Shai, Y. (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 55-70.

- Shannon, C. E. (1948). "A mathematical theory of communication." The Bell System Technical Journal **27**: 379-423.
- Shen, Y., F. Delaglio, et al. (2009). "TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts." J Biomol NMR **44**(4): 213-223.
- Spronk, C. A., S. B. Nabuurs, et al. (2003). "The precision of NMR structure ensembles revisited." J Biomol NMR **25**(3): 225-234.
- Spronk, C. A. E. M., S. B. Nabuurs, et al. (2004). "Validation of protein structures derived by NMR spectroscopy." Progress Nuc Mag Res Spec **45**: 315-337.
- Sreerama, N. & R. W. Woody (2004). "Computation and analysis of protein circular dichroism spectra." Methods Enzymol **383**: 318-351.
- Sreerama, N. W., R.W. (2000). "Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set." Anal Bioche, **15**(2): 252-260.
- Stein, E. G., L. M. Rice, et al. (1997). "Torsion-angle molecular dynamics as a new efficient tool for NMR structure calculation." J Magn Reson **124**(1): 154-164.
- Tjandra, N. & A. Bax (1997). "Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium." Science **278**(5340): 1111-1114.
- Troll, W. & R. K. Cannan (1953). "A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids." J Biol Chem **200**(2): 803-811.
- Tsai, C. S. (2002). An Introduction to Computational Biochemistry. New York, Wiley-Liss.
- Van Der Spoel, D., E. Lindahl, et al. (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." J Comput Chem **26**(16): 1701-1718.
- Van Gunsteren, W. F. (1998). "Validation of molecular dynamics simulation." J Chem Phys **108**.
- Verly, R. M., C. M. de Moraes, et al. (2009). "Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy." Biophys J **96**(6): 2194-2203.

- Vogt, T. B., B. Bechinger, et al. (1999). "Peptide structural analysis by solid-state NMR spectroscopy." Biopolymers **51**.
- Volke, F., S. Eisenblatter, et al. (1994). "Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipid-bilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR." Chem Phys Lipids **70**(2): 121-131.
- Vranken, W. F. & W. Rieping (2009). "Relationship between chemical shift value and accessible surface area for all amino acid atoms." BMC Struct Biol **9**: 20.
- Vriend, G. (1990). "WHAT IF: A molecular modeling and drug design program." J Mol Graph **8**(52-56).
- Wagner, G. & K. Wuthrich (1982). "Amide proton exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance." J Mol Biol **160**(2): 343-361.
- Weiss, M. S., A. Jabs, et al. (1998). "Peptide bonds revisited." Nat Struct Biol **5**(8): 676.
- Westerhoff, H. V., D. Juretic, et al. (1989). "Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6597-6601.
- White, S. H. & W. C. Wimley (1999). "Membrane protein folding and stability: physical principles." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **28**(1): 319-365.
- White, S. H., W. C. Wimley, et al. (1998). "Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions." Methods Enzymol **295**: 62-87.
- Wieprecht, T., M. Beyermann, et al. (1999). "Binding of Antibacterial Magainin Peptides to Electrically Neutral Membranes: Thermodynamics and Structure†." Biochemistry **38**(32): 10377-10387.
- Wieprecht, T. & J. Seelig (2002). Isothermal titration calorimetry for studying interactions between peptides and lipid membranes. Peptide-lipid interactions. S. A. Simon & T. J. McIntosh. San Diego-USA, Academic Press. **52**: 31-56.
- Williamson, M. P., T. F. Havel, et al. (1985). "Solution conformation of proteinase inhibitor IIA from bull seminal plasma by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry." J Mol Biol **182**(2): 295-315.

Wilson, K. S., S. Butterworth, et al. (1998). "Who checks the checkers? Four validation tools applied to eight atomic resolution structures. EU 3-D Validation Network." J Mol Biol **276**: 417-436.

Wishart, D. S., B. D. Sykes, et al. (1992). "The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy." Biochemistry **31**(6): 1647-1651.

Wright, P. E. (1989). "What can two-dimensional NMR tell us about proteins?" Trends Biochem Sci **14**(7): 255-260.

Wüthrich, K. (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York, Wiley-Interscience.

Wüthrich, K. (1989). "The development of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for protein structure determination." Acc Chem Res **22**.

Yang, L., T. M. Weiss, et al. (2000). "Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin." Biophys J **79**(4): 2002-2009.

Yang, L. W., T.M.; Lehrer, R.I.; Huang, H.W. (2000). "Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin." Biophys. J **79**: 2002-2009.

Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.

Zuiderweg, E. R. P., M. Billeter, et al. (1984). "Spatial arrangement of the three alpha-helices in solution structure in solution structure of *E. coli lac* repressor DNA-binding domain." FEBS Lett **174**.

Anexo A

Tabelas de Deslocamento Químico de L-Phes e D-Phes

Tabela A1. Valores de deslocamento químico de núcleos pertencentes à cadeia principal e à posição β à carbonila para cada resíduo de aminoácido de L-Phes

Resíduo de Aminoácido	Átomo	Deslocamento Químico (ppm)			
F1	HN	×	N8	HN	7,983
	CA	57,629		CA	56,084
	HA	4,453		HA	4,477
	CB	39,352		CB	38,524
	HB1	3,234		HB1	2,962
	HB2	3,063		HB2	2,864
(L-)F2	HN	9,428	L9	HN	8,258
	CA	61,106		CA	58,015
	HA	4,427		HA	4,087
	CB	39,299		CB	42,006
	HB1	3,540		HB1	1,857
	HB2	3,229		HB2	1,625
F3	HN	8,805	A10	HN	8,613
	CA	61,187		CA	55,582
	HA	4,124		HA	3,925
	CB	38,689		CB	18,112
	HB1	3,145		HB#	1,469
	HB2	3,086			
D4	HN	7,918	G11	HN	8,225
	CA	57,289		CA	47,430
	HA	4,314		HA1	4,085
	CB	40,244		HA2	3,787
	HB1	2,738			
	HB2	2,804			
T5	HN	7,901	K12	HN	7,801
	CA	66,281		CA	58,899
	HA	3,980		HA	4,204
	CB	68,465		CB	32,484
	HB	4,208		HB1	2,115
L6	HN	8,022		HB2	1,913
	CA	58,158	V13	HN	8,065
	HA	3,910		CA	66,734
	CB	41,475		HA	3,664
	HB1	1,583		CB	31,774
	HB2	1,535		HB	2,268
K7	HN	8,150	I14	HN	8,457
	CA	60,563		CA	65,147
	HA	3,751		HA	3,689
	CB	32,150		CB	37,758
K7	HB1	1,828		HB	1,948
	HB2	1,749	G15	HN	8,288
				CA	46,985
			G15	HA1	3,936
				HA2	3,836
			A16	HN	7,762
				CA	54,160

	HA	4,273
	CB	18,707
	HB#	1,551
<hr/>		
	HN	7,858
	CA	56,444
L17	HA	4,262
	CB	43,189
	HB1	1,897
	HB2	1,619
<hr/>		
	HN	7,767
	CA	62,286
T18	HA	4,320
	CB	70,301
	HB	4,355
<hr/>		

Tabela A2. Valores de deslocamento químico de núcleos pertencentes à cadeia principal e à posição β à carbonila para cada resíduo de aminoácido de D-Phes

Resíduo de Aminoácido	Átomo	Deslocamento Químico (ppm)				
F1	HN	×	N8	HA	4,303	
	CA	56,854		CB	38,399	
	HA	4,242		HB1	2,978	
	CB	39,638		HB2	2,874	
	HB1	3,375		L9	HN	8,240
	HB2	3,162			CA	58,031
(D-)F2	HN	7,798	HA		4,092	
	CA	5,012	CB		42,091	
	HA	×	HB1		1,864	
	CB	41,516	HB2		1,704	
	HB1	2,564	A10	HN	8,573	
	HB2	2,389		CA	55,605	
F3	HN	9,248		HA	3,933	
	CA	61,546		CB	18,268	
	HA	3,862		HB#	1,499	
	CB	38,480		G11	HN	8,220
	HB1	3,015	CA		47,432	
	HB2	2,911	HA1		3,794	
D4	HN	8,889	HA2		4,086	
	CA	56,925	HN		8,290	
	HA	4,144	CA		58,752	
	CB	38,368	HA	4,222		
	HB1	2,763	K12	CB	32,687	
	HB2	2,658		HB1	2,128	
T5	HN	7,679		HB2	1,921	
	CA	66,054		V13	HN	8,095
	HA	3,974			CA	66,744
	CB	68,915			HA	3,653
	HB	4,044	CB		×	
	L6	HN	7,514		HB	2,272
CA		57,930	I14		HN	8,491
HA		3,967		CA	65,075	
CB		×		HA	3,689	
HB1		1,840		CB	37,798	
HB2		1,780		HB	1,957	
K7	HN	8,280		G15	HN	8,290
	CA	60,459	CA		47,057	
	HA	3,203	HA1		3,947	
	CB	32,168	HA2		3,841	
	HB1	1,852	A16		HN	7,788
	HB2	1,735			CA	54,182
N8	HN	8,109		HA	4,281	
	CA	55,948		CB	18,889	
				HB#	1,557	
				L17	HN	7,881

	CA	56,302
	HA	4,268
L17	CB	43,147
	HB1	1,901
	HB2	1,630
<hr/>		
	HN	7,782
	CA	×
T18	HA	4,341
	CB	×
	HB	×
<hr/>		

Anexo B

Apresentações de Trabalhos em Congressos

1. RESENDE, J. M., MUNHOZ, V. H. O., AISENBERY, C., MORAES, C. M., VERLY, R. M., BERTANI, P., FERREIRA, A. C., PILÓ-VELOSO, D., BECHINGER, B.

Membrane Structure and Conformational Changes During Bilayer-Association of the Antibiotic Heterodimeric Peptide Distinctin by Oriented Solid-State NMR Spectroscopy 12th NMR USERS MEETING-3rd IBEROAMERICAN NMR MEETING, 2009, Angra dos Reis.

EXTENDED ABSTRACT BOOK. Rio de Janeiro: AUREMN, 2009. v.12. p.97 - 98

Keywords: Phyllomedusa distincta, Antimicrobial Peptide, Nuclear Magnetic Resonance

Knowledge areas : Proteins,Spectroscopy,Structure, Conformation and Stereochemistry

Additional references : Brasil/English.

2. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M., RESENDE, J. M., ALMEIDA, F. C. L., PILÓ-VELOSO, D. Structural Determination by NMR of the Antimicrobial Peptide Distinctin In: 12th NMR USERS MEETING-3rd IBEROAMERICAN NMR MEETING, Angra dos Reis.

EXTENDED ABSTRACT BOOK. Rio de Janeiro: Auremn, 2009. v.12. p.169 - 170

Keywords: Phyllomedusa distincta, Antimicrobial Peptide, Nuclear Magnetic Resonance

Knowledge areas : Proteins,Spectroscopy,Structure, Conformation and Stereochemistry

Additional references : Brasil/English.

3. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M., Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F. C.

Structural Determination by NMR Spectroscopy and Conformational Analysis of Chain 2 of Distinctin, an Antimicrobial Peptide from Phyllomedusa distinct Anurans In: EUROMAR Magnetic Resonance Conference, 2008, São Petersburgo.

Book Of Abstracts. São Petersburgo: St. Petersburg State University, 2008. v.1. p.28 - 28

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Antimicrobial Peptide, Phyllomedusa distincta

Knowledge areas : Structure, Conformation and Stereochemistry,Spectroscopy,Proteins

Additional references : Rússia/English. Meio de divulgação: Impresso

4. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M., Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F. C.

Structural Determination by NMR Spectroscopy and Conformational Analysis of Chain 1 of Distinctin, an Antimicrobial Peptide from Phyllomedusa distinct Anurans In: EUROMAR Magnetic Resonance Conference, 2008, São Petersburgo.

Book Of Abstracts. São Petersburgo: St. Petersburg State University, 2008. v.1. p.27 - 27

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Antimicrobial Peptide, Phyllomedusa distincta

Knowledge areas : Structure, Conformation and Stereochemistry,Spectroscopy,Proteins

Additional references : Rússia/English. Meio de divulgação: Impresso

Presentations in Events

1. MUNHOZ, V. H. O., DE PAULA, S. F. C., RESENDE, J. M., PILÓ-VELOSO, D., BECHINGER, B.

Structural and Orientational Determination of the Antimicrobial Peptide Hylaseptin P2 in Membrane-Mimicking Environment, 2011. (Presentation,Presentations in Events)

Keywords: Antimicrobial Peptide, Solid State NMR Spectroscopy

Additional references : Brasil/Portuguese. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis; Evento: 13th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting; Inst.promotora/financiadora: AUREMN

2. MUNHOZ, V. H. O., MAGALHAES, M. T. Q., VERLY, R. M, DE PAULA, S. F. C., AISENBERY, C., RESENDE, J. M., BECHINGER, B., PILÓ-VELOSO, D., BLOCH JR, C.

Structural and Orientational Determination of the Antimicrobial Peptide Phenylseptin in Membrane-Mimicking Environment, 2011. (Congress,Presentations in Events)

Keywords: Antimicrobial Peptide, Nuclear Magnetic Resonance, Solid State NMR Spectroscopy

Knowledge areas : Proteins,Structure, Conformation and Stereochemistry

Additional references : Brasil/Portuguese; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis; Evento: 13th Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting; Inst.promotora/financiadora: AUREMN

3. MUNHOZ, V. H. O., MAGALHAES, M. T. Q., VERLY, R. M, DE PAULA, S. F. C., RESENDE, J. M., AISENBERY, C., PILÓ-VELOSO, D., BLOCH JR, C., BECHINGER, B.

Structural and Orientational Study of Peptide Phenylseptin in Micellar Environment, 2011. (Presentation,Presentations in Events)

Additional references : China/English; Cidade: Beijing; Evento: 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins; Inst.promotora/financiadora: Amino Acids

4. MUNHOZ, V. H. O., ASSUNCAO, B. A., DE PAULA, S. F. C., RESENDE, J. M., PILÓ-VELOSO, D., BECHINGER, B.

Topological Determination of the Antimicrobial Peptide Hylaseptin P2 in Oriented

Bilayers, 2011. (Presentation, Presentations in Events)

Additional references : China/English. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Beijing; Evento: 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins; Inst.promotora/financiadora: Amino Acids

5. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M, RESENDE, J. M., ALMEIDA, F. C. L., PILÓ-VELOSO, D. Structural Determination by NMR of the Antimicrobial Peptide Distinctin, 2009. (Congress, Presentations in Events)

Keywords: Phyllomedusa distincta, Antimicrobial Peptide, Nuclear Magnetic Resonance

Knowledge areas : Proteins, Spectroscopy, Structure, Conformation and Stereochemistry

Additional references : Brasil/English; Local: Hotel do Frade; Cidade: Angra dos Reis, RJ; Evento: 12th NMR USERS MEETING-3rd IBEROAMERICAN NMR MEETING; Inst.promotora/financiadora: AUREMN

6. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M, Bemquerer, M. P., Piló-Veloso, D.

Síntese em fase sólida e caracterização da Distinctina, peptídeo antimicrobiano isolado de Phyllomedusa distincta, 2008. (Congress, Presentations in Events)

Keywords: Síntese de Peptídeos em Fase sólida, Peptídeos Antimicrobianos, Phyllomedusa distincta

Knowledge areas : Organic Synthesis, Cromatografia

Additional references : Brasil/Portuguese. Meio de divulgação: Impresso; Local: Hotel Monte Real Resort; Cidade: Águas de Lindóia; Evento: XXXI Reunião Anual da SBQ; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Química

7. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M, Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F. C.

STRUCTURAL DETERMINATION BY NMR SPECTROSCOPY AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF CHAIN 2 OF PHYLLAMEDUSA DISTINCTA AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM PHYLLAMEDUSA DISTINCTA ANURANS, 2008. (Congress, Presentations in Events)

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Antimicrobial Peptide, Phyllomedusa distincta

Knowledge areas : Structure, Conformation and Stereochemistry, Spectroscopy, Proteins

Additional references : Rússia/English. Meio de divulgação: Impresso; Local: St. Petersburg State University; Cidade: São Petersburgo; Evento: EUROMAR Magnetic Resonance Conference; Inst.promotora/financiadora: EUROMAR

8. MUNHOZ, V. H. O., VERLY, R. M, Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F. C.

STRUCTURAL DETERMINATION BY NMR SPECTROSCOPY AND CONFORMATIONAL ANALYSIS OF CHAIN 1 OF DISTINCTIN, AN ANTIMICROBIAL PEPTIDE FROM PHYLLAMEDUSA DISTINCTA ANURANS, 2008. (Congress, Presentations in Events)

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance, Antimicrobial Peptide, Conformational Analysis

Knowledge areas : Structure, Conformation and Stereochemistry, Proteins, Spectroscopy

Additional references : Brasil/Portuguese. Meio de divulgação: Impresso; Local: St. Petersburg State University; Cidade: São Petersburgo; Evento: EUROMAR Magnetic Resonance Conference; Inst.promotora/financiadora: AMPERE,

Anexo C

Artigos Publicados e Submetidos

Artigos Publicados

Georgescu, J.; Munhoz, V. H. O., Bechinger, B. NMR Structures of the Histidine-Rich Peptide LAH4 in Micellar Environments: Membrane Insertion, pH-Dependent Mode of Antimicrobial Action, and DNA Transfection. *Biophys. J.* (2010) 99, 2507-2515

Resende, J. M., Moraes, C. M., Munhoz, V. H. O., Aisenbrey, C., Verly, R. M., Bertani, P., Cesar, A., Piló-Veloso, D., Bechinger, B. Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Ac. Sci.* (2009), 106, 16639-16644.

Artigos Submetidos

de Magalhães, M. T, Verly, R. M., Munhoz, V. H. O., Prates, M. V., de Araújo, I. E., Bloch Jr., C. Phenylseptins: D- and L-amino acid Containing Peptides that Combine Aversive Gustatory Properties with Antimicrobial Activities Isolated from the Skin Secretion of *Hipsyboas punctatus*. (artigo submetido).