

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Karla Aparecida Guimarães Gusmão

**Sequenciamento, síntese, atividade biológica, estudos
biofísicos e estudos estruturais por RMN de três
peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro
*Leptodactylus labyrinthicus***

Belo Horizonte
2016

UFMG/ICEX/DQ. 1.185^a
T. 536^a

Karla Aparecida Guimarães Gusmão

**Sequenciamento, síntese, atividade biológica, estudos
biofísicos e estudos estruturais por RMN de três
peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro
*Leptodactylus labyrinthicus***

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.

Belo Horizonte
2016

Gusmão, Karla Aparecida Guimarães Gusmão
G896s Sequenciamento, síntese, atividade biológica,
2016 estudos biofísicos e estudos estruturais por RMN de
T três peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro
Leptodactylus labyrinthicus [manuscrito] / Karla
Aparecida Guimarães Gusmão. 2016.
xix, 141 f. : il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.
Coorientadora: Dorila Piló Veloso.

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

1. Química Orgânica - Teses 2. Peptídeos - Teses
3. Ressonância Magnética Nuclear - Teses 4. Peptídeos
Síntese - Teses. I. Resende, Jarbas Magalhães
Orientador II. Veloso, Dorila Piló Co-orientadora III.
Título.

CDU 043

"Sequenciamento, Síntese, Atividade Biológica, Estudos Biofísicos e Estudos Estruturais por RMN de Três Peptídeos Isolados da Secreção Cutânea do Anuro *Leptodactylus labyrinthicus*"

Karla Aparecida Guimarães Gusmão

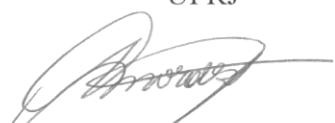
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador
UFMG


Prof. Dorila Piló Veloso - Coorientadora
UFMG


Prof. Roberto Kopke Salinas
USP


Prof. Anderson de Sá Pinheiro
UFRJ


Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva
UFMG


Prof. Tiago Antônio da Silva Brandão
UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2016.

**Dedico este trabalho a minha mãe, Alda Maria, que
travou uma batalha e saiu vencedora. Que tem fé inabalável
e amor infinito por seus filhos.**

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar aqui, com saúde e muitas conquistas.

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Jarbas Magalhães Resende, pelos anos de orientação, compreensão e amizade. Serei sempre grata.

A Professora Dr. Dorila Piló-Veloso, exemplo de profissional, pela orientação, contribuição científica e por todas as palavras de apoio.

Ao Dr. Daniel Santos e a Prof.^a Maria Elena Lima pela colaboração e por todo o apoio na execução desse trabalho. Ao Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA-ICB/UFMG), em especial aos integrantes Pablo, Joaquim e Natália, pela contribuição na realização de algumas etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly pelas contribuições e por todas as vezes que fui recebida no Laboratório de Síntese e Estrutura de Biomoléculas (LASEB – UFVJM), onde todos sempre foram muito solícitos e acolhedores.

Ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN/UFRJ), em especial aos professores Fábio Almeida e Ana Paula Valente, pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao Departamento de Química (DQ/UFMG) por toda infraestrutura disponibilizada, em especial ao Laboratório de Espectroscopia UV-Vis, onde grande parte dos dados experimentais foi obtida.

As professoras Maria Esperanza Cortes Segura e Vera Lúcia dos Santos pela contribuição com os experimentos em microbiologia.

Aos companheiros e amigos do LASEP: Breno, Filipe, Marco, Virgílio e Lídia. A companhia de vocês tornou essa jornada bem mais alegre e leve. Levarei saudades...

Ao Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pelo apoio e compreensão durante a finalização desse trabalho.

Aos amigos, Natália, Vanessa Taveira, Clináscia, Vanessa e Bruno. Cada um de vocês me ajudou muito e estarão sempre em meu coração.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq, FAPEMIG e CAPES. Em especial a CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a meus pais, José e Alda, que sempre me apoiaram e mesmo de longe estiveram sempre presentes com suas orações e todo amor. Vocês são meu grande exemplo...

Aos meus irmãos, Fabiano, Kelly, Kamila e Rafael, pelo carinho. Sou grata por ter vocês em minha vida, perto ou longe.

Agradeço ao meu companheiro Eduardo, pelo apoio irrestrito, todo carinho e amor. Minha maior conquista é ter você comigo.

A todos que torceram e torcem por mim,

Muito Obrigada!

Resumo

Os mecanismos de ação e o potencial biológico de peptídeos antimicrobianos sugerem que esses compostos podem ser utilizados como alternativas aos antibióticos comumente utilizados, para o desenvolvimento de novas terapias. A disponibilidade de tais compostos em diferentes fontes naturais estabeleceu uma alternativa para a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas. Até o ponto em que sabemos, apenas dois peptídeo isolados do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*, chamados pentadactilina e ocellatina-F1, têm demonstrado atividades antimicrobianas. Dessa forma, a fim de explorar o potencial antimicrobiano dos compostos/peptídeos dessa espécie, foram caracterizados três peptídeos, isolados a partir da secreção de pele desse anuro, assim como foram investigadas as suas atividades antimicrobianas, interações com membranas e estruturas tridimensionais de alta resolução.

Três estruturas primárias foram determinadas por degradação automática de Edman e, para a obtenção dos três peptídeos em maior escala, utilizou-se a metodologia de síntese em fase sólida. Os peptídeos obtidos foram submetidos a ensaios de susceptibilidade antimicrobiana, contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas e contra cepas de fungos. As propriedades hemolíticas dos peptídeos também foram investigadas em ensaios com eritrócitos de sangue de coelho. As preferências conformacionais dos peptídeos e as suas interações com membranas foram investigadas por espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN) e dicroísmo circular (CD), além de ensaios de extravasamento de marcador químico incorporado em lipossomas.

As composições de aminoácidos das três ocellatinas foram determinadas e as sequências exibem 100% de homologia para os primeiros 22 resíduos de aminoácidos (sequência da ocellatina-LB1). A ocellatina-LB2 apresenta um resíduo extra de Asn, enquanto a ocellatina-F1 apresenta resíduos extras de Asn-Leu-Lys na porção C-terminal. A ocellatina-F1 apresenta maior potencial antimicrobiano e um espectro de atividade mais amplo, em comparação com os outros peptídeos. As capacidades de interações com membranas e de formação de poros dos peptídeos estão diretamente correlacionadas com as suas atividades antimicrobianas, *i.e.*, ocellatina-F1 > ocellatina-LB1 > ocellatina-LB2. As espectroscopias de CD e RMN revelam que todos os peptídeos adquirem um elevado conteúdo helicoidal na presença de meios miméticos de membrana e fortes interações de peptídeo-membrana. Os três peptídeos, apesar da

elevada homologia, têm diferentes graus de estrutura próximo da extremidade C-terminal. A ocellatina-F1 mostra, em média, maiores conteúdos helicoidais e, maior definição estrutural na região C-terminal, especialmente em relação à ocellatina-LB2, certamente, devido à presença de resíduos extra Asn-23, Lys-24, e Leu-25.

Os resultados obtidos indicam que os três resíduos de aminoácidos extras na porção C-terminal da ocellatina-F1, desempenham um papel importante na promoção de interações peptídeo-membrana mais fortes, nas propriedades antimicrobianas e na estruturação da região C-terminal. O resíduo adicional de Asn-23 presente na sequência de ocellatina-LB2 parece diminuir o seu potencial antimicrobiano e a força das interações peptídeo-membrana.

PALAVRAS CHAVE: *Leptodactylus labyrinthicus*, Ocellatinas, Peptídeos antimicrobianos, Interações peptídeo-membrana, Ressonância magnética nuclear.

Abstract

The mechanisms of action and the biological potential of antimicrobial peptides suggest that these compounds can be used as alternatives for new therapies. The availability of these compounds from several different natural sources has opened an avenue for the discovery of new biologically active molecules. Up to our knowledge, only two peptides isolated from the frog *Leptodactylus labyrinthicus*, namely pentadactylin and ocellatin-F1, have shown antimicrobial activities, therefore, in order to explore the antimicrobial potential of this species, we have characterized three novel peptides isolated from the anuran skin secretion, as well as investigated their antimicrobial activities, membrane interactions and high-resolution three-dimensional structures.

Three peptide sequences were determined by automated Edman degradation and higher amounts of these compounds were prepared by solid-phase synthesis. The antimicrobial activity was tested using *Gram*-positive and *Gram*-negative bacteria and two fungal strains. The haemolytic properties of the peptides was also investigated in assays with rabbit blood erythrocytes. The conformational preferences of the peptides and their membrane interactions have been investigated by nuclear magnetic resonance (NMR) and circular dichroism (CD) spectroscopy and liposome dye release assays.

The amino acid compositions of three ocellatins were determined and the sequences exhibit 100 % homology for the first 22 residues (Ocellatin-LB1 sequence). Ocellatin-LB2 carries an extra Asn residue and Ocellatin-F1 extra Asn-Lys-Leu residues at C-terminus. Ocellatin-F1 presents a stronger antibiotic potential and a broader spectrum of activities compared to the other peptides. The membrane interactions and pore formation capacities of the peptides correlate directly with their antimicrobial activities, *i.e.*, Ocellatin-F1 > Ocellatin-LB1 > Ocellatin-LB2. Both CD and NMR spectroscopies reveal that all peptides acquire high helical contents in membrane environments and stronger peptide-membrane interactions. Despite the high sequence homology, the structural stabilities near the C-terminus are different for the three peptides. Ocellatin-F1 shows in average stronger helical propensities and a higher structural degree near the C-terminus, especially when compared to Ocellatin-LB2.

The obtained results indicate that the three extra amino acid residues at the Ocellatin-F1 C-terminus play an important role in promoting stronger peptide-membrane interactions, antimicrobial properties and the structural stability of the

peptide C-terminus. The extra Asn-23 residue present in Ocellatin-LB2 sequence seems to decrease its antimicrobial potential and the strength of the peptide-membrane interactions.

KEY WORDS: *Leptodactylus labyrinthicus*, ocellatins Antimicrobial peptides, Peptide-membrane interactions, Nuclear magnetic resonance.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Espécie <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> , popularmente conhecida como rã pimenta ou gia (Foto de R. J. Sawaya,).	4
Figura 1.2: Principais classes estruturais de peptídeos: (A) α -hélices, magainina-2 (PDB 2MAG); (B) fitas- β , polifemusina (PDB 1RKK); (C) estendidos, indolicidina (PDB 1G89); (D) Dímero da homotarsinina (Verly, <i>et al.</i> , 2017).	6
Figura 1.3: Ilustração da membrana biológica de acordo com o Modelo de mosaico fluido. Figura retirada de Collawn & Bebök (2008). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO A).....	7
Figura 1.4: A estrutura geral de um glicerofosfolípido.	8
Figura 1.5: Estruturas dos glicerofosfolípidos: Fosfatidilcolina, Fosfatidilserina, e Fosfatidiletanolamina. Representação da cabeça polar e da cauda hidrofóbica.	9
Figura 1.6: Estrutura da esfingomielina. Em verde está representada a estrutura principal da esfingosina.	10
Figura 1.7: Estrutura química dos esteróis: colesterol, ergosterol e β -sitosterol.....	11
Figura 1.8: Modelo barril de aduelas. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).	14
Figura 1.9: Modelo Carpete. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).	14
Figura 1.10: Modelo detergente. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).	15
Figura 1.11: Reações envolvidas no processo de Degradação de Edman.	17
Figura 1.12: Resina de material polimérico, Rink Amide MDHA. Na figura “P” representa o suporte polimérico.....	20
Figura 1.13: Representação esquemática da estratégia Fmoc de SPFS por etapas. Adaptado de Wilken & Kent (1998). Na figura os retângulos representam o grupo protetor Fmoc, os círculos os resíduos de aminoácidos, os losangos os grupos protetores das cadeias laterais e o grupo OXt corresponde à carboxila ativada pela formação do éster ativo (éster –OXt). Adaptado de Barbosa, 2016.	21
Figura 1.14: Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas E_R e E_L . (A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação plano polarizada; (B) componentes de magnitudes diferente que resultam em uma luz elipticamente	

polarizada. (C) Elipse θ , cuja tangente é obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Figura adaptada de Kelly <i>et al.</i> , (2005). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).....	26
Figura 1.15: (A) Perfis de espectros de dicroísmo circular característicos de peptídeos em conformação em α -hélice (círculos a cheio), em conformação em folha- β (círculos vazios) e sem conformação preferencial (losangos) e (B) os comprimentos de onda de absorção e das principais transições eletrônicas, representativos de cada tipo de motivo de estrutura secundária. Figura (A) retirada de Fändrich & Dobson (2002). Reprodução autorizada pela John Wiley and Sons (Anexo D).....	27
Figura 1.16: Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas. Figura adaptada de https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/ , Acessado em 24/09/2016.....	29
Figura 1.17. Identificação dos sistemas de <i>spins</i> padrão no mapa de contornos TOCSY, dos resíduos de aminoácido alanina (sinais em vermelho) e aspartato (sinais em azul). Figura adaptada de Wüthrich, 1986.....	32
Figura 1.18: Representação das correlações de NOE típicas de estruturas do tipo α -hélice. Figura adaptada de Wüthrich, 1986.	33
Figura 1.19: Representação das correlações de NOE típicas de estruturas do tipo Fita- β . Figura adaptada de Wüthrich, 1986.....	33
Figura 1.20: Representação dos ângulos de torção dos resíduos de aminoácido.	34
Figura 1.21: Índice de deslocamento químico – CSI, derivado de deslocamentos químicos de $^1\text{H}\alpha$. Valores negativos indicam estruturas helicoidais e os valores positivos conformações- β	35
Figura 1.22: Representação das mudanças conformacionais sofridas por uma molécula durante o processo de cálculo por recozimento simulado. Figura retirada de Agostini <i>et al.</i> (2006). Reprodução autorizada pela John Wiley and Sons (ANEXO E).	36
Figura 2.1: Representação esquemática das etapas da estratégia Fmoc de SPFS. Retirado de Barbosa, 2016.	41
Figura 2.2: Estrutura molecular dos detergentes e fosfolipídios utilizados para preparação de membranas mimética: (A) DPC – Dodecil Fosfocolina, (B) SDS – Dodecil sulfato de sódio, (C) POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina, (D) POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol.	47

- Figura 3.1: Perfil de CLAE – FR da purificação da secreção da pele de *L. labyrinthicus*, coluna C8 preparativa (Discovery Supelco - 4,6 x 250 mm), injeção de 4 mL, concentração 1 mg.mL⁻¹, fluxo 1mL.min⁻¹. Eixo da esquerda representa a concentração de acetonitrila ao longo do gradiente. A seta indica as frações que foram sequenciadas por degradação de Edman automatizada..... 53
- Figura 3.2: Cromatogramas resultantes (a) da calibração do sequenciador com mistura padrão de aminoácidos-PTH; (b) do primeiro ciclo de degradação da ocellatina-LB1 e (c) do segundo ciclo de degradação da ocellatina-LB1. Condições de operação: detector de UV em $\lambda=269$ nm, fluxo isocrático de 1 mL/min com acetonitrila a 37 % como fase móvel, temperatura da coluna 40°C, coluna de fase reversa WAKOSIL-PTH (4.6 mm x 250 mm, Wako, Osaka, Japão)..... 54
- Figura 3.3: Espectros de massas (MALDI-ToF-EM) e expansões das frações correspondentes a (A, A') ocellatina-LB1, (B, B') ocellatina-LB2 e (C, C') ocellatina-F1. Massas monoisotópicas observadas: 2191,18; 2304,95 e 2546,52 Da, respectivamente, para ocellatina-LB1, -LB2 e F1..... 55
- Figura 3.4: Predição da hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos das sequências peptídicas ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. Valores descritos segundo escala de Eisenberg *et al.* (1984)..... 59
- Figura 3.5: Projeções em hélice dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. Os resíduos hidrofílicos e neutros são representados como círculos, resíduos hidrofóbicos como quadrados, resíduos negativamente carregados como triângulos e resíduos positivamente carregados como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores: o resíduo apolar mais hidrofóbico é apresentado em verde, e o menos hidrofóbico em amarelo. Os resíduos não carregados mais hidrofílicos são apresentados em vermelho (sem carga). As linhas vermelhas e azul delimitam as faces hidrofóbicas das ocellatinas, considerando o perímetro da hélice. Simulado em <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>, acessado em 07/08/2016..... 61
- Figura 3.6: Perfil de CLAE do produto bruto da síntese da ocellatina-F1. Amostra injetada (5mL de uma solução a 1 mg.mL⁻¹) em coluna C18 Vydac (250 X 4,6 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1 % em um fluxo de 2 mL.min⁻¹. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214$ nm..... 65
- Figura 3.7: Perfis de CLAE das amostras purificadas das sínteses dos peptídeos (A) ocellatina-LB1, (B) ocellatina-LB2 e (C) ocellatina-F1. Amostras injetadas (200

μL de uma solução a 1 mg.mL^{-1}) em coluna C18 Vydac (250 mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 3 mL.min^{-1} . A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214 \text{ nm}$. Os Espectros de Massas (EM-MALDI-ToF) das amostras purificadas são apresentados em painéis ao lado dos respectivos cromatogramas: (A') ocellatina-LB1, (B') ocellatina-LB2 e (C') ocellatina-F1..... 66

Figura 3.8: Atividade hemolítica das ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 em eritrócitos de coelhos. Maior concentração testada de $1000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e máximos de hemólise de 6 % para a ocellatina-LB1 (vermelho), 1 % para a ocellatina-LB2 (azul) e de 12 % para a ocellatina-F1 (preto)..... 70

Figura 3.9: Espectros de CD da ocellatina-LB1 em (A) diferentes proporções de TFE/H₂O, (B) na presença de micelas de DPC, (C) SDS a 20 °C, (D) SDS a 30 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (E) POPC e de (F) POPC:POPG (3:1). 72

Figura 3.10: Espectros de CD da ocellatina-LB2 em (A) diferentes proporções de TFE/H₂O, na presença de micelas de (B) DPC, (C) SDS a 20 °C, (d) SDS a 30 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (E) POPC e de (F) POPC:POPG (3:1). 73

Figura 3.11: Espectros de CD da ocellatina-F1 em (a) diferentes proporções de TFE/H₂O, na presença de micelas de (b) DPC, (c) SDS a 20 °C, (d) SDS a 50 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (e) POPC e de (f) POPC:POPG (3:1). 74

Figura 3.12: Percentuais de conteúdo helicoidal dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 obtidos a partir de dados de espectroscopia de dicroísmo circular para soluções dos peptídeos em (a) diferentes proporções de TFE/H₂O, (b) na presença de micelas de DPC, (c) na presença de micelas de SDS a 20°C, (d) na presença de micelas de SDS a 20°C, (e) na presença de LUVs de POPC e (f) na presença de LUVs de POPC:POPG (3:1). 80

Figura 3.13: Liberação de calceína incorporada em vesículas de POPC, a 37 °C, induzida por diferentes concentrações de (a) ocellatina-LB1, (b) ocellatina-LB2 e (c) ocellatina-F1; (d) variação do percentual de liberação em função das concentrações dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1..... 82

Figura 3.14: Espectros de RMN de ^1H parciais da região de H amídicos das ocellatinas em diferentes meios e temperaturas.....	86
Figura 3.15: Mapas de contornos parciais (A) NOESY e (B) TOCSY da ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40).....	87
Figura 3.16: Mapas de contornos parciais (a) NOESY e (b) mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC, da ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40).	88
Figura 3.17: (A-C) Mapas de contornos TOCSY parciais e (D-E) mapas de contornos ^1H - ^{15}N HMQC parciais das ocellatina-LB1 (A, D), -LB2 (B, E) e -F1 (C, F) a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).....	90
Figura 3.18: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).	91
Figura 3.19: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 2 mM em solução micelar 400 mmol.L $^{-1}$ de DPC- d_{38}	92
Figura 3.20: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 2 mM em solução micelar 400 mmol.L $^{-1}$ de SDS- d_{25}	93
Figura 3.21: Valores de RCI obtidos pelo software TALOS+ para os peptídeos ocellatina-LB1, ocellatina-LB2 e ocellatina-F1, respectivamente, em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L $^{-1}$ e solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L $^{-1}$. Todos os valores de S^2 para o RCI obtidos são superiores a 0,5.	100
Figura 3.22: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de <i>annealing</i> simulado para soluções dos peptídeos a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção <i>N</i> -terminal aponta para a parte inferior da Figura.	101
Figura 3.23: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de <i>annealing</i> simulado para soluções dos peptídeos a 2,0 mM na presença de solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L $^{-1}$. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção <i>N</i> -terminal aponta para a parte inferior da Figura.	102

- Figura 3.24: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para soluções dos peptídeos a 2,0 mM na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24. Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção *N*-terminal aponta para a parte inferior da Figura. 103
- Figura 3.25: Representação com a face de caráter mais hidrofóbico evidenciada para frente, para os três peptídeos a 2,0 mM, na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24. Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção *N*-terminal aponta para a parte inferior da Figura. 105
- Figura 3.26: Conformações de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para ocellatina-F1 (A) a 1,5 mM em TFE- d_2 :H₂O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM, (B) a 2,0 mM na presença de solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L⁻¹ e (C) a 2,0 mM na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹. Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. 107
- Figura 3.27: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-LB1 em (a) TFE- d_2 :H₂O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c) solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996). 108
- Figura 3.28: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-LB2 em (a) TFE- d_2 :H₂O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c) solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996). 109
- Figura 3.29: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-F1 em (a) TFE- d_2 :H₂O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c)

solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996). 110

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Peptídeos antimicrobianos isolados das peles de rãs pertencentes ao género <i>Leptodactylus</i>	3
Tabela 1.2: Denominações e abreviaturas para os glicerofosfolípidos comuns.....	8
Tabela 1.3: Principais componentes fosfolipídicos de organismos ilustrativos.....	12
Tabela 3.1: Sequências primárias dos peptídeos obtidas por degradação de Edman	56
Tabela 3.2: Alinhamento das sequências das ocellatinas com peptídeos antimicrobianos	57
Tabela 3.3: Propriedades das sequências de resíduos de aminoácidos dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1	57
Tabela 3.4: Dados do acompanhamento da síntese dos peptídeos ocellatina-LB1, ocellatina-LB2 e ocellatina-F1	63
Tabela 3.5: Concentração Inibitória mínima (CIM), μM	67
Tabela 3.6: NOEs característicos de estrutura secundária, ocellatina-LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em TFE- d_2 :H ₂ O (60:40).....	95
Tabela 3.7: NOEs característicos de estrutura secundária, ocellatina-LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L^{-1}	96
Tabela 3.8: NOEs característicos de estrutura secundária: ocellatina- LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L^{-1}	97
Tabela 3.9: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H ₂ O (60:40) a 20°C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L^{-1} ; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L^{-1}	111
Tabela 3.10: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-LB2 a: 1,5 mM em TFE- d_2 :H ₂ O (60:40) a 20 °C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L^{-1} ; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L^{-1}	112
Tabela 3.11: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-F1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H ₂ O (60:40) a 20 °C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L^{-1} ; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L^{-1}	113

Lista de abreviaturas e siglas

1D	uni-dimensional
2D	bi-dimensional
ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ATZ	anilinoiazolinona
CD	dicroísmo circular, do inglês <i>circular dichroism</i>
CL	Fosfatidilglicerol
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	espectroscopia de correlação, do inglês <i>correlation spectroscopy</i>
CSI	Índice de deslocamento químico, do inglês <i>chemical shift index</i>
DCM	diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> - diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPC	dodecilsfosfocolina, 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-LB1-sulfonato de sódio
EDT	etanoditiol
EM	espectrometria de massas
FID	decaimento livre da indução, do inglês <i>free induction decay</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
FT	transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform</i>
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-LB2-etanossulfônico)
HMQC	Correlação heteronuclear de múltiplo quantum, do inglês <i>heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HR-MAS	Giro no ângulo mágico com alta resolução, do inglês <i>high resolution magic angle spinning</i>
HSQC	coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
Hz	hertz
IPA	Álcool isopropílico, nome usual propan-2-ol
ITC	calorimetria de titulação isotérmica, do inglês <i>isothermal titration</i>

	<i>calorimetry</i>
<i>J</i>	constante de acoplamento escalar
LUVs	vesículas grandes unilamelares, do inglês <i>large unilamellar vesicles</i>
MALDI	dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MIC	concentração inibitória mínima, do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
MLVs	vesículas multi-lamelares, do inglês <i>multi lamellar vesicles</i>
m/z	razão entre a massa e a carga
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PA	Ácido Fosfatídico
PAM	peptídeos antimicrobianos
PC	Fosfatidilcolina
PDB	banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PIPE	4-metil-piperidina
PG	Fosfatidilglicerol
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol
PS	
PTH	feniltio-hidantoína
RMSD	raiz quadrada dos desvios médios quadrados, do inglês <i>root of mean square deviation,</i>
SA	arrefecimento simulado do inglês <i>simulated annealing</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPFS	síntese de peptídeos em fase sólida
SUVs	vesículas unilamelares pequenas, do inglês <i>small unilamellar vesicles</i>
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TFA	ácido trifluoroacético
TIS	tri-isopropilsilano

TOCSY	espectroscopia de correlação total, do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
t_r	tempo de retenção
δ	deslocamento químico

Sumário

Resumo	iii
Abstract	v
Lista de Figuras	vii
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas e siglas.....	xv
1. Introdução	1
1.1 Peptídeos antimicrobianos	1
1.1.1 Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de Anuros.....	2
1.1.2 Membranas Biológicas: Funções e composição química	6
1.1.3 Mecanismo de ação.....	13
1.2 Sequenciamento de peptídeos	15
1.2.1 Sequenciamento automático por Edman.....	16
1.3 Síntese de Peptídeos	19
1.3.1 Estratégia Fmoc	19
1.3.2 Teste de Kaiser.....	23
1.4 Testes Biológicos	23
1.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	25
1.6 Extravasamento de marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas.....	28
1.7 Determinação estrutural de PAMs por Ressonância Magnética Nuclear	30
1.8 Objetivos	37
2 Metodologia.....	38
2.1 Sequenciamento dos peptídeos	38
2.2 Síntese dos peptídeos	39
2.2.1 Acoplamentos	39
2.2.2 Clivagem do peptídeo da peptidil-resina.....	43
2.2.3 Purificação dos peptídeos.....	43
2.3 Testes biológicos.....	44
2.3.1 Atividade antimicrobiana	44
2.3.2 Atividade hemolítica.....	45
2.4 Dicroísmo circular	46

2.5	Extravasamento marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas.....	48
2.6	Experimentos de RMN	49
2.7	Processamento, análise e tratamento dos dados de RMN.....	52
3	Resultados e discussão.....	53
3.1	Sequenciamento dos peptídeos	53
3.2	Síntese dos peptídeos	61
3.3	Testes biológicos.....	66
3.3.1	Atividade antimicrobiana	66
3.3.2	Hemólise	69
3.4	Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	71
3.5	Extravasamento marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas.....	82
3.6	Determinação das estruturas tridimensionais dos peptídeos por RMN ...	84
4	Conclusão	115
5	Referências bibliográficas.....	118
6	Anexos.....	136
6.1	Anexo A.....	136
6.2	Anexo B.....	137
6.3	Anexo C.....	138
6.4	Anexo D.....	139
6.5	Anexo E.....	140

1. Introdução

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são peptídeos endógenos produzidos por organismos multicelulares, a fim de proteger o hospedeiro de uma variedade de microrganismos patogênicos. PAMs são definidos como peptídeos de defesa por causa do seu papel fundamental na constituição do sistema de imunidade inata (Seo *et al.*, 2012), uma vez que são moléculas de defesa, que podem proteger o hospedeiro de invasores como bactérias, vírus ou fungos (Xu & Lai, 2015; Kang *et al.*, 2012). Devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas essas substâncias estão sendo estudadas, com o objetivo de poderem ser utilizadas como uma nova classe de agentes antimicrobianos (Hancock & Lehrer, 1998; Wang *et al.*, 2016). Embora existam, em vários casos, antibióticos mais potentes, há vantagens concretas para a utilização dos PAMs, dentre as quais estão incluídas a capacidade de matar rapidamente células-alvo, um amplo espectro de atividade contra vários alvos (incluindo bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, fungos, parasitas, vírus envelopados e células tumorais), atividade contra alguns dos mais graves patógenos resistentes a antibióticos comuns e uma propensão reduzida para a indução de resistência bacteriana (Ilić *et al.*, 2013). Além disso, os PAMs são facilmente degradados *in vivo* e seus metabólitos secundários são aminoácidos livres, o que minimiza os efeitos colaterais (Wang *et al.*, 2012).

A resistência das bactérias aos antibióticos pode ser alcançada por diversas vias, incluindo-se a inibição da interação de droga-alvo, a modificação do sítio de ligação de drogas nas proteínas alvo, bem como o influxo do fármaco nas células alvo. Microrganismos também podem alterar seus padrões genéticos em resposta às mudanças ambientais (Kang *et al.*, 2012). Se comparados a vários antibióticos convencionais, boa parte dos PAMs apresenta significativa citotoxicidade, principalmente devido a suas interações com bicamadas lipídicas da membrana, o que leva à perturbação da integridade da barreira celular. Dessa forma, os microrganismos apresentam muita dificuldade para desenvolverem resistência a essa classe de substâncias (Wang *et al.*, 2012), sendo que essas características dos PAMs oferecem possibilidades excitantes em face da diminuição da eficácia dos antibióticos convencionais, devido ao surgimento de organismos resistentes aos antibióticos comuns (Machado *et al.*, 2016).

Embora peptídeos e proteínas possam exercer funções bem distintas, vários desses são conhecidos por apresentarem alta seletividade com relação a alvos específicos (Davies *et al.*, 2000). Tais especificidades podem ser, em grande parte dos casos, correlacionadas ao complexo arranjo estrutural e conformacional desses compostos, bem como dos seus alvos internos. Dessa forma, a perda total ou parcial da eficácia desses agentes pode ser associada, em diversas circunstâncias, a modificações conformacionais e topológicas devido a fatores como variações de pH, força iônica, ambiente químico, dentre outros (Brogden 2005; Matsuzaki *et al.*, 1997; Verly *et al.*, 2016). Tais constatações indicam que estudos estruturais, conformacionais e da dinâmica desses compostos são essenciais ao entendimento dos seus mecanismos de ação.

1.1.1 Peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de Anuros

Anuros (sapos, rãs e pererecas) possuem um sistema de defesa eficiente, à base de compostos farmacologicamente ativos presentes nas secreções de suas peles. As glândulas cutâneas presentes na pele dos anfíbios desempenham um papel essencial na respiração, reprodução, defesa contra predadores, proteção contra a dessecação e proliferação de microrganismos na superfície do corpo (Calderon *et al.*, 2011). Até o momento, inúmeros peptídeos já foram isolados da secreção cutânea de anuros (Xu and Lai, 2015; Calderon *et al.*, 2011). Essas substâncias são agrupadas em diversas famílias com base na sua estrutura química, afinidade e espectro de atividade biológica.

Historicamente o primeiro peptídeo antimicrobiano, isolado de um anuro, relatado foi a bombinina, a partir da *Bombina variegata*, por Csordas e Michl, em 1969. Posteriormente, foram isoladas as magaininas, a partir da *Xenopus laevis*, por Zasloff em 1987. Dos inúmeros PAMs já isolados e caracterizados a partir da secreção da pele de anfíbios, a maioria dos estudos concentra-se em membros dos gêneros *Rana*, *Bombina*, *Phyllomedusa* e *Litoria* (Nascimento *et al.*, 2004).

O gênero de rãs *Leptodactylus* contém 75 espécies espalhadas entre o sul da América do Norte e a América do Sul, principalmente no Brasil e nas Antilhas (Frost, 2013, Marani *et al.*, 2015; Libério *et al.*, 2011, Sousa *et al.*, 2009; King *et al.*, 2005; Dourado *et al.*, 2007; Rollins-Smith *et al.*, 2005). Os primeiros PAMs caracterizados partir desse gênero foram isolados a partir de *Leptodactylus ocellatus* (Nascimento *et*

al., 2004) e foram nomeados de ocellatinas. Foi proposto que todos os peptídeos obtidos a partir do gênero *Leptodactylus* devem ser descritos como "ocellatinas" (Conlon, 2008). Como apresentado na Tabela 1.1, diversas ocellatinas já foram isoladas. Contudo, apenas algumas das 75 espécies do gênero *Leptodactylus* tiveram suas secreções cutâneas estudadas, como *L. ocellatus*, *L. pustulatus*, *L. knudseni*, *L. fallax*, *L. pentadactylus* e *L. siphax*.

Tabela 1.1: Peptídeos antimicrobianos isolados das peles de rãs pertencentes ao gênero *Leptodactylus*.

<i>Ocellatina</i>	<i>Espécie</i>	<i>Referência</i>
Ocellatina-PT1		
Ocellatina-PT2		
Ocellatina-PT3		
Ocellatina-PT4	<i>L. pustulatus</i>	Marani <i>et al.</i> , 2015
Ocellatina-PT5		
Ocellatina-PT6		
Ocellatina-PT7		
Ocellatina-PT8		
Ocellatina-1		
Ocellatina-2		Nascimento <i>et al.</i> , 2004
Ocellatina-3	<i>L. ocellatus</i>	
Ocellatina-4		Nascimento <i>et al.</i> , 2007
Ocellatina-5		Leite <i>et al.</i> , 2010
Ocellatina-K1	<i>L. knudseni</i>	Cardozo-Filho <i>et al.</i> , 2010
Ocellatina-F1	<i>L. fallax</i>	Rollins-Smith <i>et al.</i> , 2005
Ocellatina-L1	<i>L. laticeps</i>	Conlon <i>et al.</i> , 2006
Ocellatina-P1	<i>L. pentadactylus</i>	King <i>et al.</i> , 2005
Ocellatina-S1	<i>L. siphax</i>	Dourado <i>et al.</i> , 2007
Ocellatina-V1		
Ocellatina-V2	<i>L. validus</i>	King <i>et al.</i> , 2008
Ocellatina-V3		

O anuro da espécie *Leptodactylus labyrinthicus* (Figura 1.1, p. 4) é uma rã de grande porte, popularmente conhecida como rã-pimenta, que ocorre nos cerrados e caatingas das regiões Central e Sudeste do Brasil, na costa da Venezuela, leste do Paraguai, Bolívia e norte da Argentina (Frost, 2013). A secreção cutânea desse anuro foi

caracterizada no trabalho de tese, “Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases” (Libério, 2008, Libério et al., 2014). Até ao nosso conhecimento, dois peptídeos isolados da rã *Leptodactylus labyrinthicus*, nomeados Ocellatina-P1 e Ocellatina-F1, demonstraram atividades antimicrobianas. Ocellatina-P1 foi isolado das espécies de rã *L. pentadactylus* e *L. labyrinthicus* e apresentou também atividade anticâncer e baixa atividade hemolítica contra eritrócitos (Libério et al., 2011). A ocellatina-F1, um peptídeo antimicrobiano que foi encontrado originalmente na secreção da pele da rã *Leptodactylus fallax* (Rollins-Smith et al., 2005), também foi recentemente isolada da secreção da pele de *Leptodactylus labyrinthicus* por Neto e colaboradores (Neto et al., 2015). A presente tese de doutorado proporciona continuidade aos estudos envolvendo o potencial biológico de peptídeos encontrados na secreção da pele da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, por meio da caracterização biológica e estrutural de três peptídeos isolados desta rã.



Figura 1.1: Espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, popularmente conhecida como rã pimenta ou gia (Foto de R. J. Sawaya,).

Peptídeos antimicrobianos isolados de secreções da pele de anuros, normalmente possuem de 10 a 48 resíduos de comprimento (Nascimento et al., 2003) e abrangem uma ampla variedade de motivos estruturais (Costa et al., 2012). Muitos desses peptídeos apresentam uma carga líquida positiva, uma conformação anfipática em hélice e/ou um significativo momento hidrofóbico (Xu and Lai, 2015; Nascimento et al., 2003; Hancock & Lehrer, 1998). No padrão helicoidal anfipático, uma face da

hélice é carregada positivamente (principalmente devido a resíduos de lisina, arginina e histidina), enquanto que a face oposta é composta por uma proporção considerável de resíduos hidrofóbicos (Seo *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2003). Acredita-se que esses fatores são importantes para a atividade antimicrobiana elevada de PAMs, uma vez que a cationicidade promove a interação com a membrana microbiana carregada negativamente, ao passo que a hidrofobicidade facilita a permeabilização e a ruptura da membrana. Estruturas de α -hélice anfipáticas normalmente permitem uma ótima interação dos peptídeos com a estrutura anfifílica da membrana biológica (Bi *et al.*, 2013; Dathe & Wieprecht, 1999).

Os PAMs podem ser divididos em vários subtipos de acordo com sua composição de aminoácidos e sua estrutura. Além de serem classificados em catiônicos ou aniônicos, esses peptídeos podem ainda ser agrupados em diferentes classes estruturais (Figura 1.2, p. 6), como α -hélices, fitas- β em grampo, peptídeos estendidos e peptídeos com alça (*loop*) (Kang *et al.*, 2012; Pereira, 2006). Os peptídeos α -helicoidais constituem a classe mais representativa de PAMs e são os que têm a relação estrutura-atividade mais bem estabelecida. Esse grupo de peptídeos é geralmente não estruturado em solução aquosa, mas em grande parte dos casos formam hélices anfipáticas nas membranas ou em ambientes que as mimetizam (Kang *et al.*, 2012; Pereira, 2006). A classe dos peptídeos fitas- β normalmente engloba os peptídeos que contêm resíduos de cisteína e formam ligações dissulfeto, o que resulta em uma estrutura relativamente rígida e estável. Os peptídeos estendidos não têm elementos de estrutura secundária e os peptídeos com alça adotam uma formação com um “*loop*”, normalmente devido à presença de uma ligação dissulfeto. Uma nova classe de peptídeos que tem despertado bastante interesse na comunidade científica são os peptídeos diméricos, os quais têm duas cadeias helicoidais conectadas através de uma ligação dissulfeto intercadeia, como o caso dos peptídeos distinctina e homotarsinina, isolados de espécies de anuros (Prates, 1999; Batista *et al.*, 2001). Resultados de testes biológicos, bem como várias técnicas biofísicas e espectroscópicas, têm mostrado que as duas cadeias conectadas pela ligação dissulfeto possibilitam interações, bem como atividades mais pronunciadas para os dímeros, em relação a suas cadeias monoméricas (Verly *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2009).

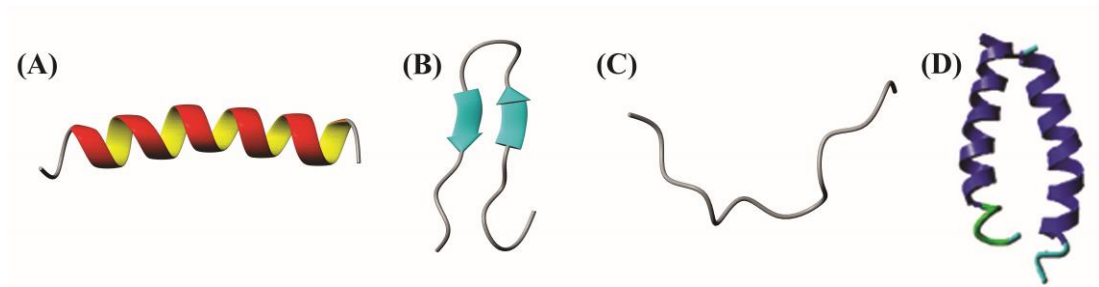


Figura 1.2: Principais classes estruturais de peptídeos: (A) α -hélices, magainina-2 (PDB 2MAG); (B) fitas- β , polifemusina (PDB 1RKK); (C) estendidos, indolicidina (PDB 1G89); (D) Dímero da homotarsinina (Verly, *et al.*, 2017)

1.1.2 Membranas Biológicas: Funções e composição química

Estudos demonstram que a atividade dos PAMs resulta da interação entre os peptídeos e as membranas lipídicas. De acordo com a resposta da membrana a essa associação, os PAMs tendem a ser divididos em duas classes: os que apresentam e os que não apresentam propriedade disruptiva de membrana.

As membranas biológicas são barreiras naturais e complexas que isolam o conteúdo das células do ambiente extracelular, enquanto controlam as trocas com o meio externo. Todos os sistemas de membrana são compostos de uma bicamada lipídica que contém complexos protéicos que facilitam a permeabilidade, transporte e sinalização (Stillwell, 2016). As membranas biológicas são descritas pelo Modelo de Mosaico Fluido proposto por Singer e Nicholson em 1972 (Figura 1.3, p. 7). O modelo prevê que há uma distribuição aleatória de componentes moleculares na membrana que têm movimento lateral e rotacional livre (Singer e Nicolson, 1972).

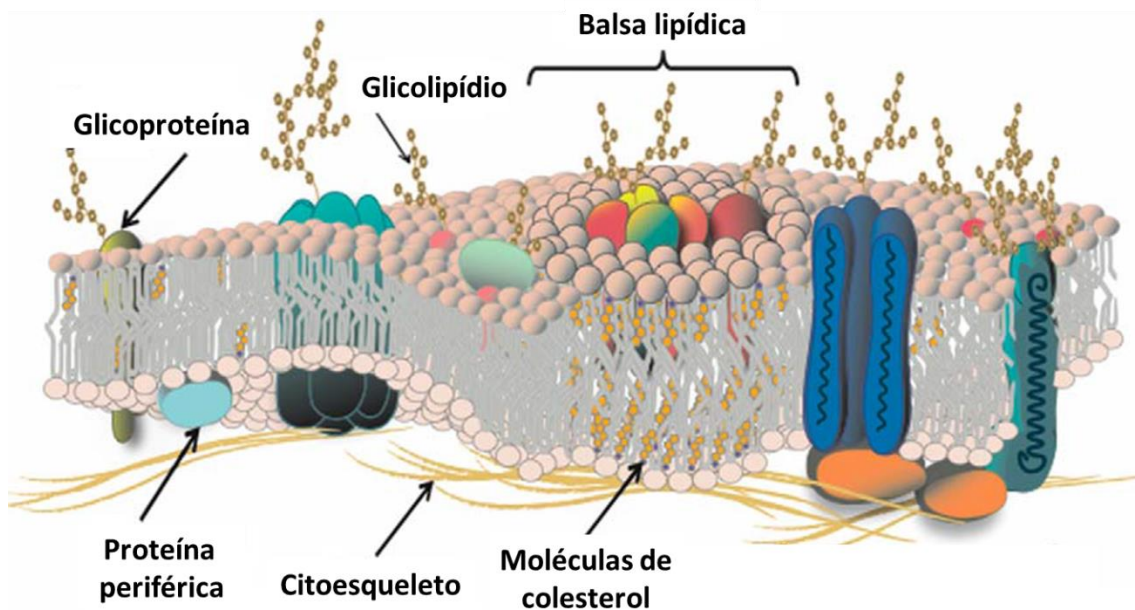


Figura 1.3: Ilustração da membrana biológica de acordo com o Modelo de mosaico fluido. Figura retirada de Collawn & Bebök (2008). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO A).

Os componentes das membranas podem ser caracterizados como estáticos e dinâmicos. Enquanto estático descreve a composição, dinâmico descreve como os componentes interagem para gerar a função biológica (Collawn & Bebök, 2008). Os principais componentes são os lipídios e as proteínas, sendo a principal função dos lipídeos de natureza estrutural, por meio da formação de uma bicamada estável, enquanto as proteínas são os componentes mais ativos bioquimicamente, conferindo as propriedades funcionais características de cada tipo de membrana, contribuindo assim, para a diversidade bioquímica das membranas (Escribá *et al.*, 2015).

Ainda que sua função mais evidente seja separação do conteúdo celular do ambiente extracelular, uma membrana biológica deve ser seletivamente permeável, possuindo a capacidade de distinguir muitos solutos quimicamente diferentes. As membranas apresentam caráter hidrofóbico que impede a difusão passiva de moléculas mais polares, solúveis em água, permitindo a manutenção das concentrações de íons intracelulares, bem como a identidade e a função das organelas (Stillwell, 2016).

Os lipídios são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos não polares. Essa característica é devida a estrutura molecular lipídica, que apresenta grandes regiões da superfície composta de hidrocarbonetos com muito poucos grupos polares. As membranas biológicas são majoritariamente constituídas por três tipos de

lipídios, os fosfolipídios, os glicolipídios e os esteróis (Lehninger, Nelson *et al.* 1997), todos eles anfipáticos, ou seja, contêm porções hidrofóbicas e hidrofílicas.

Entre as diferentes classes lipídicas que formam os diversos tipos de membranas celulares, os mais comuns nas membranas biológicas são os fosfolipídios e os esteróis. Os fosfolipídios podem ter como estrutura principal o glicerol, no caso dos glicerofosfolipídios, ou a esfingosina, no caso dos esfingofosfolípidos (Stillwell, 2016). Os glicerofosfolipídios são os mais comuns e são compostos por um glicerol, um fosfato, dois ácidos graxos e um álcool. A estrutura geral de um glicerofosfolipídio está representada na Figura 1.4.

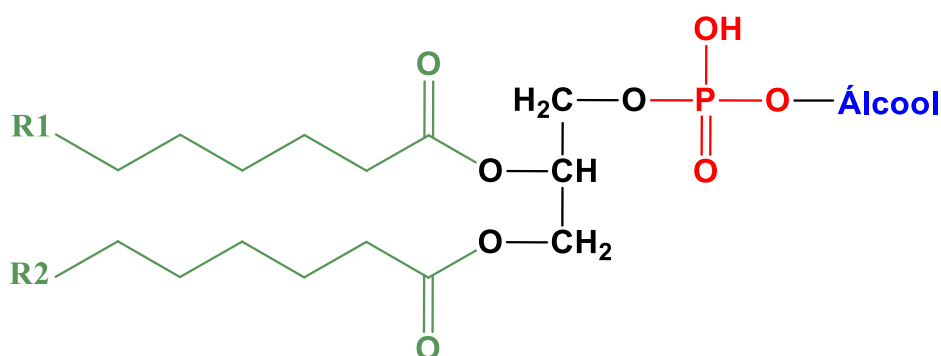


Figura 1.4: A estrutura geral de um glicerofosfolipídio.

O nome do fosfolipídio é derivado do álcool polar ligado ao grupo fosfato, sendo que, em animais, existem sete classes principais de fosfolipídios, como apresentado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Denominações e abreviaturas para os glicerofosfolípidos comuns.

<i>Grupo polar ligado ao fosfato</i>	<i>Nome genérico</i>	<i>Abreviatura</i>
Hidrogénio	Ácido Fosfatídico	PA
Colina	Fosfatidilcolina	PC
Etanolamina	Fosfatidiletanolamina	PE
Serina	Fosfatidilserina	PS
Glicerol	Fosfatidilglicerol	PG
Inositol	Fosfatidilinositol	PI
Cardiolipina	Fosfatidilglicerol	CL

O grupo polar mais comum nos glicerofosfolípidos é a fosfatidilcolina - PC, na qual o álcool polar ligado ao grupo fosfato é a colina, como apresentado na Figura 1.5.

Os grupos polares fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina (Fig. 1.5) também são encontrados nos glicerofosfolípidos e são compostos, respectivamente, pelos álcoois polares serina e etanolamina.

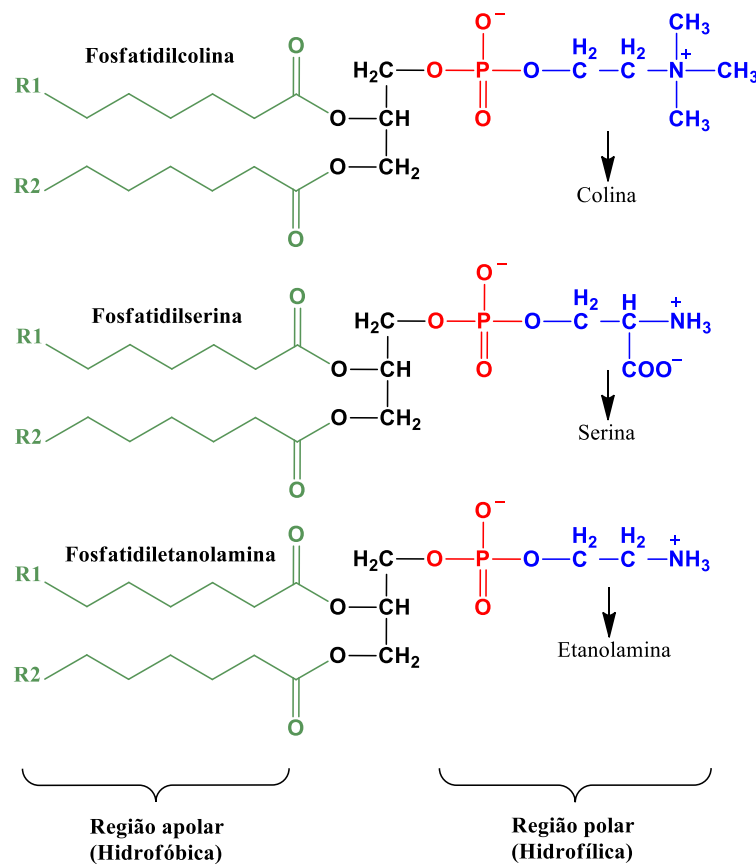


Figura 1.5: Estruturas dos glicerofosfolípidos: Fosfatidilcolina, Fosfatidilserina, e Fosfatidiletanolamina. Representação da cabeça polar e da cauda hidrofóbica.

Os esfingolípídios, como os fosfolípidos, apresentam um grupo de cabeça polar que interage com água e duas caudas hidrofóbicas. Contudo, nos esfingolípídios uma das cadeias hidrofóbica, a esfingosina, não é nem variável e nem hidrolisável, como nos fosfolípidos. Uma grande variedade de grupos de cabeças polares pode estar presente, resultando em diferentes famílias de esfingolípídios. Nos humanos o esfingolípídio mais abundante é a esfingomiéline (SM), que possui a fosfocolina como cabeça polar, como apresentado na Figura 1.6 (p. 10).

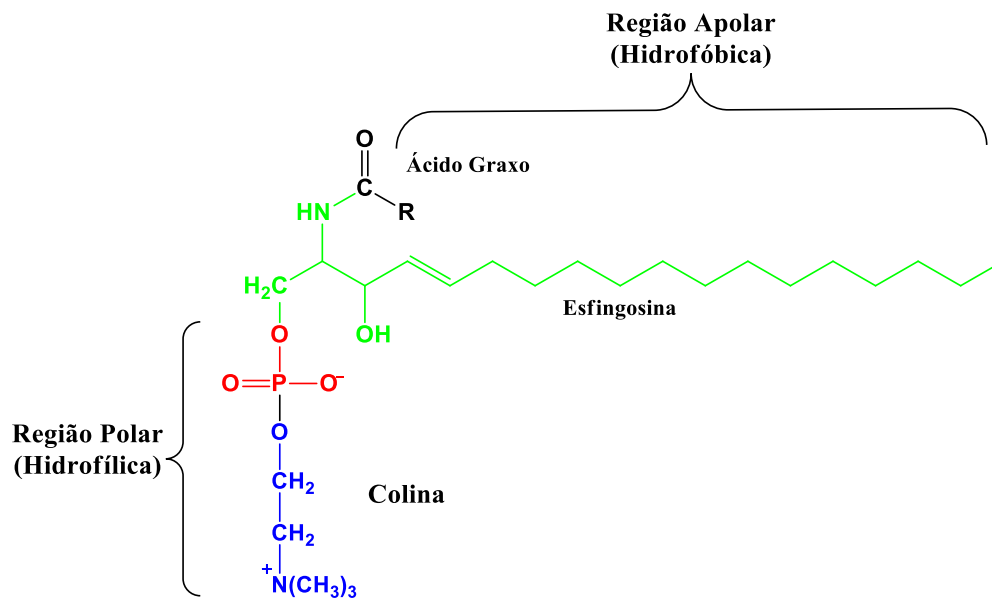


Figura 1.6: Estrutura da esfingomiéline. Em verde está representada a estrutura principal da esfingosina.

Os esteróis são um tipo de lípidios estruturalmente diferentes dos outros já relatados e são abundantes em muitas membranas animais, vegetais e fúngicas, estando ausentes em células procariotas. Nos animais o principal esterol é o colesterol, nos fungos o ergosterol, e nas plantas o β -sitosterol. Estruturalmente os três esteróis são similares, diferindo apenas por pequenas modificações nas suas caudas flexíveis, como apresentado na Figura 1.7 (p. 11).

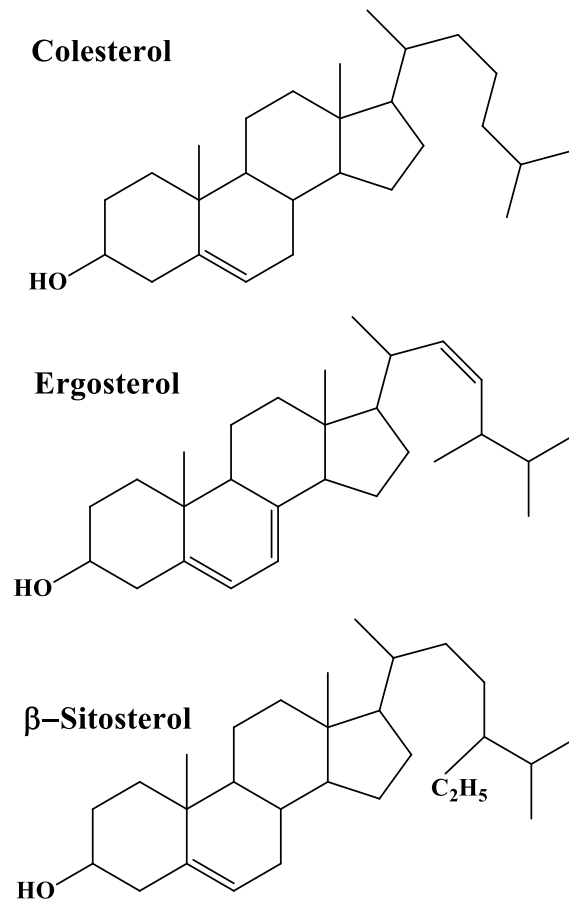


Figura 1.7: Estrutura química dos esteróis: colesterol, ergosterol e β -sitosterol.

Em relação à composição, as membranas de células procarióticas e eucarióticas diferem significativamente. A Tabela 1.3 (p. 12) apresenta os principais componentes de fosfolípidos de alguns organismos. A carga líquida de uma membrana resulta da sua composição fosfolípídica. Quando as membranas são compostas predominantemente de PG, CL ou PS apresentam carga líquida negativa, como em muitos patógenos bacterianos. Enquanto as bicamadas constituídas majoritariamente de fosfolípidos zwitteriônicos como PE, PC ou SM são comuns em membranas citoplasmáticas de mamíferos e apresentam a carga líquida neutra.

Tabela 1.3: Principais componentes fosfolipídicos de organismos ilustrativos.

	Zwiteriônico			Carregado negativamente			
	PE	PC	SM	PS	PG	CL	LPG
<i>E. coli</i> (Bactéria Gram-negativa)	82				6	12	
<i>S. aureus</i> (Bactéria Gram-positiva)					57	5	38
<i>C. albicans</i>	70	4	15	11			
<i>C. neoformans</i>	29	51		16		4	
Eritrócitos		50	50				

PE, Fosfatidiletanolamina; PC, Fosfatidilcolina; SM, esfingomielina; PS, Fosfatidilserina; PG, Fosfatidilglicerol; CL Fosfatidilglicerol; LPG, lisofosfatidilglicerol. Retirado de Blondelle *et al.* (1999).

A interação dos peptídeos com as células alvo ocorre, inicialmente, via atração eletrostática, devido ao caráter catiônico dos peptídeos e à presença de fosfolipídios aniônicos nas membranas dos microrganismos. A variação na composição da membrana também é observada entre as bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas. As paredes das bactérias *Gram*-positivas consistem de uma única membrana lipídica rodeada por um envelope de peptidoglicano espesso, ao qual está ligado o ácido teicóico (polímeros fosforados de ribitol ou glicerol) ou ácido teicurônico (ácido glicurônico contendo polissacarídeos), que são moléculas negativamente carregadas (Wang *et al.*, 2012). As bactérias *Gram*-negativas possuem um envoltório externo composto de lipopolissacarídeos carregados negativamente, que consistem de uma cadeia de polissacarídeos covalentemente ligada ao fosfolipídio (Cabrera, 2006).

Diante de um sistema tão complexo como as membranas biológicas, que podem apresentar uma variada composição, tanto de lipídios, como de proteínas, os estudos em sistemas modelo de biomembranas têm grande utilidade, pois constituem uma simplificação dos parâmetros a investigar com a possibilidade de controle de algumas das inúmeras variáveis que uma membrana biológica apresenta (Warschawski *et al.*, 2011). Os meios miméticos de membrana são geralmente preparados utilizando lipídios ou detergentes, que formam lipossomas e vesículas, respectivamente. A variação da composição dos modelos influencia efetivamente diversas propriedades físicas, tais como a forma, a curvatura, a espessura, a constante dielétrica e também pode modular a estrutura e a atividade dos peptídeos (Warschawski *et al.*, 2011). Ainda que alguns modelos se aproximem mais das características estruturais das biomembranas, como os lipossomas, os modelos são extremamente simplificados, principalmente em relação à composição com os sistemas que pretendem mimetizar.

1.1.3 Mecanismo de ação

Embora os PAMs afetem as bactérias de muitas formas diferentes, incluindo-se a inibição da síntese da parede celular, de DNA, de RNA e de proteínas, bem como de atividade enzimática (Machado *et al.*, 2017), o principal modo de ação dos PAMs é ruptura das membranas bacterianas (Schmidtchen, Pasupuleti & Malmsten, 2013; Hale & Hancock, 2007). Com base nos dados disponíveis, alguns modelos que explicam o modo de ação de PAMs foram propostos, sendo três importantes, barril de aduelas, detergente e carpete.

O modelo do barril descreve a formação de canais ou poros transmembrana por feixes de peptídeos, dispostos de forma similar a aduelas em um barril. Esse mecanismo envolve inicialmente a ligação paralela e a posterior inserção perpendicular de monômeros em α -hélice anfipática na membrana, tendo-se a formação de poros, de modo que sua superfície hidrofóbica interaja com o núcleo lipídico da membrana e a sua face hidrofílica revista o centro, formando-se um poro aquoso (Figura 1.8, p. 14) (Zhao, 2003). A orientação perpendicular dos peptídeos na membrana só ocorre após o aumento da proporção entre peptídeos/lipídios, que conduz a um tamanho de poro cada vez maior. O vazamento de componentes intracelulares através desses poros provoca, subsequentemente, a morte celular (Libério, 2008; Shai, 2002). A etapa crucial para a formação dos poros requer que os peptídeos reconheçam um ao outro, quando ligados à membrana. Os peptídeos podem se ligar à membrana como uma única hélice anfipática, porém é energeticamente desfavorável para uma única hélice atravessar a membrana como um monômero, tendo-se então a formação de dímeros e oligômeros após interação dos monômeros com a bicamada (Teixeira, Feio & Bastos, 2012; Costa *et al.*, 2015).

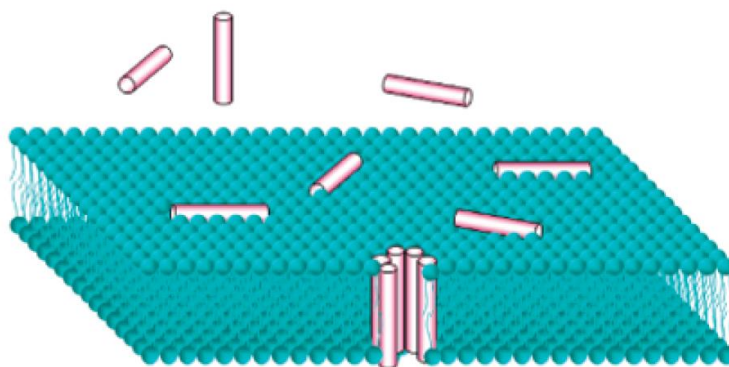


Figura 1.8: Modelo barril de aduelas. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).

De acordo com o modelo do tapete, os peptídeos se ligam inicialmente à superfície da membrana, até que a bicamada esteja coberta por um aglomerado de peptídeos, como um “tapete” (Lazarev & Govorun, 2010; Reddy, Yedery & Aranha, 2004). Em um segundo passo, após uma concentração limiar ser atingida, os peptídeos permeiam a membrana, que se rompe em pedaços, caracterizando-se a lise da célula microbiana (Figura 1.9) (Zhao, 2003; Costa *et al.*, 2015).

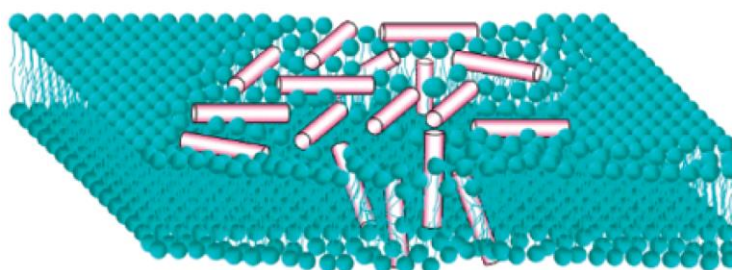


Figura 1.9: Modelo Tapete. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).

O mecanismo de detergente (*detergent-like*) se baseia na intercalação de peptídeos em bicamadas lipídicas e representa um mecanismo mais geral para a atividade de moléculas anfipáticas. Nesse modelo, efeitos de difusão lateral dos peptídeos podem causar aumentos localizados da concentração de peptídeos na membrana, o que gera uma perturbação do empacotamento da bicamada, levando à dissipação do gradiente eletroquímico da membrana, o que pode acarretar na formação de estruturas micelares, permitindo então a perda de material citoplasmático (Bechinger, 1999). Ao serem atingidas concentrações maiores de peptídeo, a membrana pode se desintegrar por mecanismos como o do tapete (Bechinger & Lohner, 2006). Ao agir

como detergentes, os peptídeos se agregam em oligômeros, que interagem com as membranas, adsorvem algumas moléculas de fosfolipídios e podem ainda formar um agregado micelar na própria bicamada (Figura 1.10).

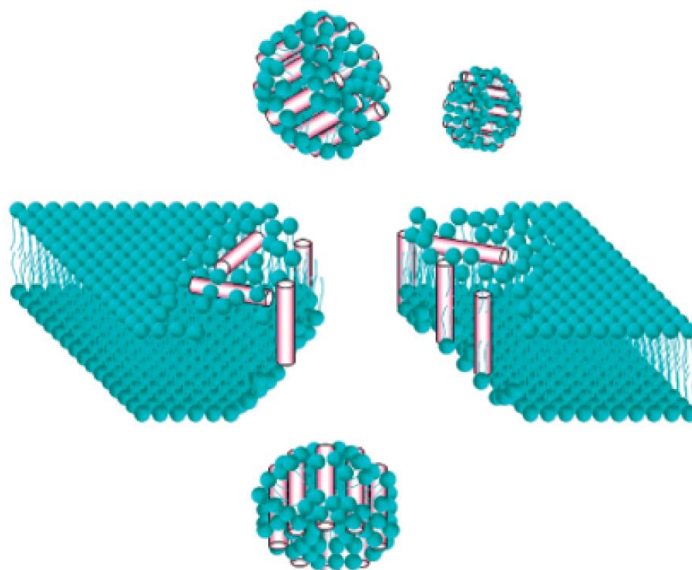


Figura 1.10: Modelo detergente. Figura retirada de Wimley (2010). Reprodução autorizada pela ACS Chemical Biology (ANEXO B).

Diante de tantos modelos e possibilidades de atividade antimicrobiana para os PAMs, muitas questões devem ser respondidas para elucidar o mecanismo de ação antimicrobiana de um dado peptídeo. É necessário elucidar, entre outras questões, a estrutura desta molécula e as mudanças conformacionais na presença de lipídios; interações específicas com membranas lipídicas, carregadas e zwitteriônicas, e a topologia do peptídeo na superfície da bicamada (Haney & Vogel, 2009).

1.2 Sequenciamento de peptídeos

A sequência do peptídeo se refere à ordem pela qual os resíduos de aminoácido, conectados através de ligações peptídicas, encontram-se dispostos em uma cadeia peptídica. Na sequência peptídica está descrita todas as conectividades entre os átomos na estrutura, portanto é descrita a estrutura primária do peptídeo (Nelson & Cox, 2002). O sequenciamento é a determinação da sequência de aminoácidos que constitui um peptídeo. As sequências primárias dos PAMs e as características das extremidades *N*- e *C*-terminais definem aspectos físico-químicos como carga líquida, anfipaticidade, hidrofobicidade e sua estruturação tridimensional. Assim, alterações na sequência primária podem ter fortes influências na estrutura peptídica como um todo, afetando a interação com membranas, bem como o perfil de atividades biológicas.

As estruturas primárias dos PAMs não são definidas por meio de parâmetros que podem ser relacionados com atividades antibacteriana e citotóxica. Tem sido um grande desafio alterar padrões estruturais, de modo a se otimizar a atividade antibacteriana e manter ou reduzir baixos níveis de citotoxicidade (Ilić *et al.*, 2013). Contudo, alguns resíduos de aminoácidos possuem importantes funções na estrutura dos PAMs, como resíduos de lisina e triptofano, que compartilham especial importância na interação dos PAMs com a membrana microbiana (Gopal *et al.*, 2011). A distribuição de resíduos hidrofóbicos ao longo de uma sequência peptídica pode também afetar sua seletividade (*e.g.* diferenças da citotoxicidade a classes distintas de células).

Alguns estudos avaliaram a atividade de peptídeos sintetizados com a sequência natural invertida, que seriam, teoricamente, semelhantes aos naturais em propriedades físicas e estruturais (comprimento, carga líquida e proporção de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos). Os resultados, entretanto, indicam que a modificação do perfil de atividade antimicrobiana depende da sequência do peptídeo e a composição da membrana bacteriana ou fúngica (Gopal *et al.*, 2011), sendo que nem sempre a inversão da sequência resulta em aumento ou diferenciação da atividade antimicrobiana. Modificações nas sequências de peptídeos naturais por deleção, adição ou substituição de um ou mais resíduos, normalmente alteram as propriedades físico-químicas dos peptídeos, podendo causar efeitos marcantes sobre as atividades biológicas, de forma a modular tanto a potência quanto o espectro de atividade e seletividade (Zelezetsky & Tossi, 2006).

1.2.1 Sequenciamento automático por Edman

O sequenciador de proteína é um instrumento para a determinação automática da sequência de resíduos de aminoácidos em proteínas e peptídeos. Até a apresentação do método proposto por Edman (1950), as técnicas de elucidação de estruturas primárias de proteínas demandavam muito tempo e trabalho. O sequenciamento por degradação de Edman foi, então, apresentado como uma tentativa para criar um método mais favorável (Edman & Begg, 1967). Entretanto esse método, utilizado a mais de 50 anos, tem desvantagens, que incluem baixa sensibilidade, o requisito de amostras com alto grau de pureza e a necessidade de longos tempos de ciclo para a caracterização de cada resíduo de aminoácido (Reid *et al.*, 2001). O método é baseado na reação da porção *N*-terminal

com feniltiosocianato (Edman & Begg, 1967), sendo que, teoricamente, a metodologia poderia ser utilizada independente do tamanho da cadeia.

Na degradação de Edman, cada resíduo de aminoácido é individualmente removido da extremidade *N*-terminal do peptídeo. Para tanto, o fenilisotiocinato (PTIC, reagente de Edman) reage com o grupo amino *N*-terminal do peptídeo. Posteriormente, esse PTC-Peptídeo é submetido a tratamento com ácido, para que ocorra a remoção do resíduo *N*-terminal como um derivado anilintiazolinona (ATZ). O derivado ATZ instável é convertido para um derivado feniltio-hidantoína (PTH), o qual é separado e identificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), utilizando-se detectores de ultravioleta (Walk *et al.*, 1999). Os tempos de retenção das substâncias eluídas são então comparados com os perfis de eluição de padrões conhecidos, a fim de se identificar o aminoácido em determinada posição na sequência. O restante da cadeia é submetido a outra série dessas reações, permitindo-se a identificação dos novos resíduos *N*-terminais, até que se determine a sequência do peptídeo (Lobas *et al.*, 2013). As reações envolvidas no processo de degradação são apresentadas na Figura 1.11.

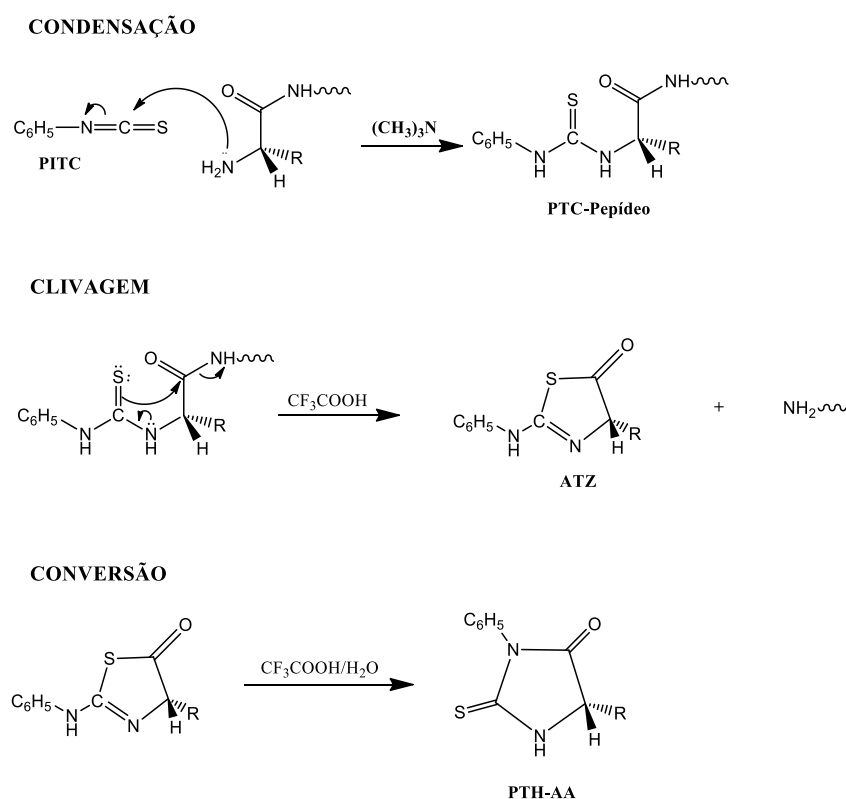


Figura 1.11: Reações envolvidas no processo de Degradação de Edman.

Os vários aminoácidos não diferem muito em reatividade durante o processo de degradação, sendo possível encontrar um conjunto de condições reacionais que abranja todos os resíduos. A degradação de um peptídeo pode então ser reduzida para uma repetição de um padrão estabelecido de condições reacionais (Edman & Begg, 1967).

Atualmente, os sequenciadores de proteína automatizados são desenvolvidos para a determinação rotineira de sequências que contenham os 20 aminoácidos essenciais. No entanto, as limitações inerentes à química de Edman muitas vezes causam resultados ambíguos para pequenas quantidades de amostra. Portanto, a técnica é de baixa sensibilidade e exige um alto grau de pureza da amostra (Kellner *et al.*, 1995). O sinal do primeiro resíduo de aminoácido está muitas vezes sobreposto a sinais de fundo. Em particular, os resíduos de triptofano e cisteína são dificilmente detectados, enquanto que a extremidade C-terminal de um peptídeo pode não ser identificada devido à queda de rendimento da reação (Zhanga *et al.*, 2011). Assim, a degradação de Edman não permite se caracterizarem traços de peptídeos, ou peptídeos com a extremidade N-terminal bloqueada, bem como uma mistura de peptídeos (Reid *et al.*, 2001).

Ainda que, teoricamente, a técnica possa ser aplicada a qualquer tamanho da cadeia, não é o que se observa. Efetivamente, com o aumento da cadeia de aminoácidos o rendimento da reação diminui e a sobreposição de muitas etapas oculta gradualmente os resultados em virtude do surgimento de sinais equivocados, gerados por reações incompletas de clivagem ou acoplamento, encobrendo o sinal do derivado do resíduo N-terminal, inviabilizando a utilização dessa metodologia para peptídeos maiores que 30 resíduos ou proteínas, a menos que sejam previamente tratados com agentes proteolíticos (Edman & Begg, 1967; Chen *et al.*, 2008).

Com uma aplicação limitada do método de degradação de Edman e com a evolução da tecnologia e instrumentação, a espectrometria de massas (EM) se tornou uma ferramenta alternativa muito útil, sensível e de alto rendimento, para o sequenciamento de peptídeos (Zhanga *et al.*, 2011). A informação da massa molecular a partir de análise do espectro de massas pode ser usada, tanto para se confirmarem os resultados do sequenciamento de Edman, quanto para se decidir sobre possíveis ambiguidades no processo (Kellner *et al.*, 1995). O sequenciamento de peptídeos por EM apresenta diversas vantagens em relação aos métodos químicos, incluindo rapidez e alta sensibilidade. Contudo, existe uma limitação para a diferenciação dos resíduos isobáricos (Ile e Leu), que é solucionada por meio de fragmentação adicional nas

ligações entre carbonos β e γ , uma vez que os aminoácidos Ile e Leu geram íons de diferentes massas, em decorrência das suas diferenças estruturais (Johnson *et al.*, 1987).

1.3 Síntese de Peptídeos

Devido ao enorme interesse pelos PAMs, bem como às complicações nas metodologias para isolamento, análise, purificação, identificação e quantificação desses, percebeu-se a necessidade de sintetizar essas substâncias, bem como seus análogos, em escalas variadas (miligramas, gramas e até quilogramas). O interesse é maximizado já que esses compostos são encontrados normalmente em baixas concentrações nos tecidos e secreções dos organismos vivos (Machado *et al.*, 2004). A síntese enzimática e a síntese química são os métodos utilizados para a produção de peptídeos em maiores escalas, sendo que a síntese química engloba métodos clássicos em solução, bem como a síntese na presença de um suporte polimérico, que é conhecida como Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, SPFS. A metodologia de SPFS, introduzida por Merrifield (1963), é eficiente para obtenção de peptídeos em escalas variadas e apresenta vantagens como um melhor rendimento global e menor formação de subprodutos, quando comparada com a síntese em solução (Pires, Bemquerer & Nascimento, 2013). Na SPFS, a lavagem e a filtração da peptidil-resina em questão são efetuadas no final de cada etapa do processo, de forma que o excesso de reagentes, solventes e quaisquer outros compostos não ligados à resina sejam removidos do meio reacional. Esse processo impede reações indesejadas, possibilitando uma produção mais limpa e rendimentos mais elevados. Entre as estratégias para a síntese de peptídeos em de fase sólida, a Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila) e a Boc (*tert*-butoxicarbonila) são as mais utilizadas. Neste trabalho, utilizou-se a estratégia Fmoc para as SPFS.

1.3.1 Estratégia Fmoc

A estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida se baseia na combinação adequada de grupos protetores, aliada a um método de ativação do grupo carboxila (Góngora-Benítez *et al.*, 2013). A estratégia geral inclui o uso do grupo Fmoc como protetor do grupo amino (proteção temporária), bem como o uso de grupos protetores de cadeias laterais (proteção permanente) e uma resina contendo um ligante ("*handles*" ou "*linkers*"). A grande vantagem dessa estratégia reside no fato que, após cada acoplamento, é utilizada uma solução básica para se remover o grupo Fmoc, a qual

não causa a clivagem de peptídeo da resina ou a remoção dos grupos protetores laterais, pois essas ligações são apenas lábeis em meio ácido (Chang & White, 2000; Caprino & Han, 1972), o que torna o método uma estratégia ortogonal de síntese.

Uma grande variedade de suportes funcionalizados por "handles" ou "linkers" está disponível no mercado, sendo que o uso de diferentes suportes pode demandar o emprego de condições distintas para reações de clivagem e possibilita a obtenção de peptídeos com diferentes tipos de funcionalização na porção C-terminal (Góngora-Benítez *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2004). A Figura 1.12 representa a resina de material polimérico, Rink Amide MDHA, que é um exemplo de uma resina que resulta em porção C-terminal amidada. Como os peptídeos estudados nesta tese são amidados na fração C-terminal, decidiu-se utilizar esta resina do tipo amida.

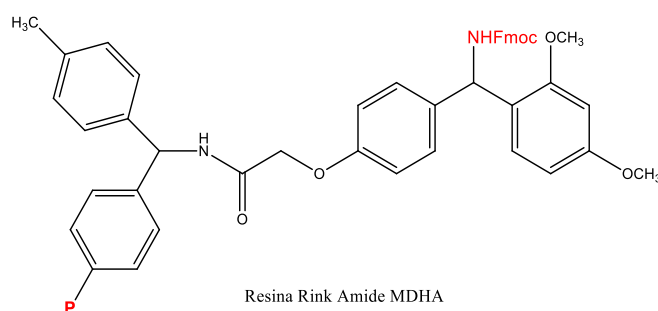


Figura 1.12: Resina de material polimérico, Rink Amide MDHA. Na figura “P” representa o suporte polimérico.

O ligante pode ser considerado como um produto químico bifuncional, que liga um segmento molecular a um suporte sólido. O ligante deve ser inerte às condições reacionais de crescimento da cadeia peptídica, de forma a evitar a clivagem prematura durante ciclos de acoplamento e desproteção, bem como deve apresentar a propriedade de ser clivado em meio ácido, para se garantir a liberação do peptídeo do suporte quando desejado (Góngora-Benítez *et al.*, 2013).

A seguir é apresentada a Figura 1.13 (p. 21), que descreve de forma esquemática a estratégia Fmoc de síntese de peptídeos em fase sólida. O processo se inicia pela remoção do grupo Fmoc da resina, através do tratamento com uma solução básica. Para se realizar o acoplamento do primeiro Fmoc-aminoácido à resina, esse deve ser inicialmente ativado, a fim de se ter um grupo mais reativo que a carboxila ácida convencional. Uma vez ativado o Fmoc-aminoácido, procede-se então a reação de acoplamento na resina com auxílio de agitação mecânica, obtendo-se o aminoácido protegido ligado à resina. Sucessivas etapas de desproteção do grupamento N-terminal,

seguidas por etapas de acoplamento são repetidas alternadamente, até que a sequência peptídica de interesse seja obtida. Na etapa final, a peptil-resina é tratada com solução ácida na presença de sequestradores de carbocátions, tendo-se a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, bem como a liberação do peptídeo do suporte sólido.

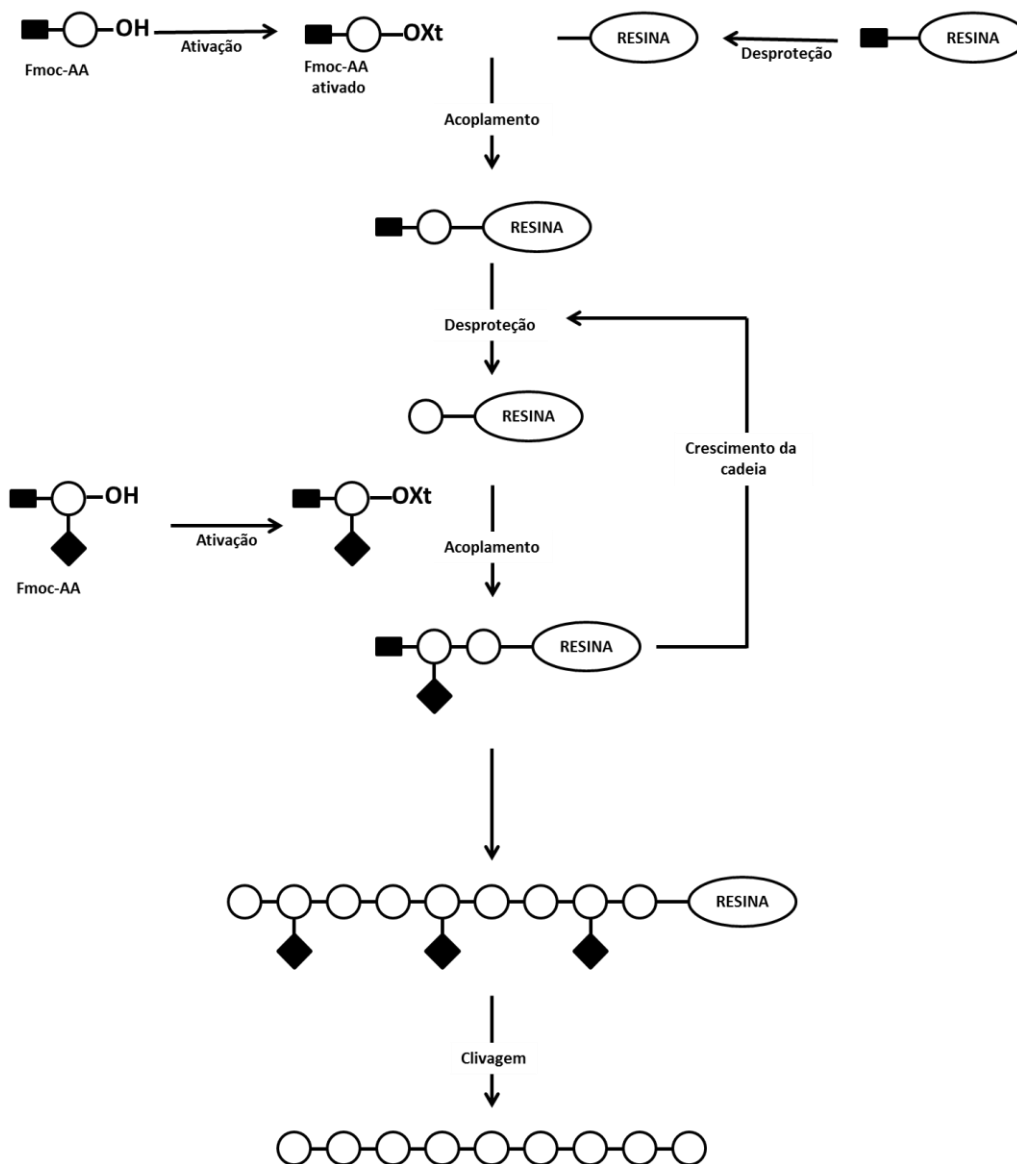


Figura 1.13: Representação esquemática da estratégia Fmoc de SPFS por etapas. Adaptado de Wilken & Kent (1998). Na figura os retângulos representam o grupo protetor Fmoc, os círculos os resíduos de aminoácidos, os losangos os grupos protetores das cadeias laterais e o grupo **OXt** corresponde à carboxila ativada pela formação do éster ativo (éster -OXt). Adaptado de Barbosa, 2016.

O grupo Fmoc deve ser removido, para que haja um grupo amino livre, que irá reagir com o grupo carboxila ativado, tendo-se assim a formação da ligação peptídica. A etapa de desproteção pode ser realizada numa solução de piperidina ou de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF) (Chang & White, 2000).

Considerando-se que, quando se mistura uma amina e um ácido carboxílico, primeiramente ocorre uma reação ácido-base para formar um sal estável, a formação da ligação amídica é termodinamicamente desfavorável. A condensação direta do sal pode ser realizada a temperatura elevada (160-180°C), a qual normalmente é incompatível com a presença de outros grupos funcionais (Montalbetti & Falque, 2005). Portanto, a ativação do ácido, através da ligação de um grupo abandonador eficiente ao carbono carbonílico, é necessária. Existe uma variedade de reagentes de acoplamento, estando entre eles a *N, N'*-di-isopropilcarbodiimida (DIC). A DIC reage com o ácido carboxílico para formar um anidrido misto *O*-acilisouréia, intermediário bastante reativo, que pode reagir diretamente com a amina para produzir a amida desejada e a uréia como subproduto. Contudo, muitas vezes reações laterais podem ocorrer no intermediário, sendo que a adição de um nucleófilo que reage rapidamente com essa espécie leva a outro intermediário ainda ativo o suficiente para acoplar com a amina, impedindo as reações colaterais (Montalbetti & Falque, 2005). Essa técnica é conhecida como síntese de ésteres OXt. Um dos nucleófilos mais utilizados na síntese peptídica é o hidroxibenzotriazol (HOBt).

Depois de se realizarem todos os acoplamentos de Fmoc-aminoácidos condizentes com a sequência peptídica alvo, o passo seguinte consiste de uma última reação de desproteção, seguida pelo processo de clivagem, que consiste na remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, bem como da liberação do peptídeo da resina. Como o grupo protetor Fmoc é lábil em meio básico, é possível se realizarem todos os acoplamentos sem que o peptídeo seja clivado da resina e sem que haja a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais. Isso porque as respectivas ligações são estáveis em meio básico, sendo apenas lábeis em meio ácido.

Normalmente, uma solução contendo ácido trifluoroacético (TFA), na presença de capturadores de carbocátions, como 1,2-etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS), é utilizada como reagente de clivagem. A remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, pelo emprego da solução ácida, libera intermediários catiônicos reativos e os capturadores de carbocátions minimizam as reações colaterais, que podem ocorrer com cadeias laterais de resíduos como triptofano, tirosina, metionina e cisteína (que podem atuar como nucleófilos) (Chang & White, 2000). Os principais grupos utilizados para proteção das cadeias laterais dos Fmoc-aminoácidos são o 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonila (Pbf), o trifenilmetila (Trt), o *terc*-butila (*t*-Bu) e o *terc*-butoxicarbonila (Boc).

1.3.2 Teste de Kaiser

Para verificar a eficiência das etapas de desproteção e de acoplamento ao logo da síntese, realiza-se um teste colorimétrico para a detecção da presença do grupo amino, conhecido como teste da ninidrina, ou teste de Kaiser. A uma pequena quantidade de peptidil-resina, adicionam-se uma gota de solução de ninidrina a 5 % em etanol, duas gotas de solução de 80 % de fenol em etanol e uma gota de solução de KCN/água em piridina (2 mL de solução 0,001 mol/L de KCN em 98 mL de piridina). Aquece-se então o tubo da solução teste a 100 °C entre 4 a 6 minutos (Chan & White, 2000).

A reação de uma amina com a ninidrina produz um composto azul escuro para aminas primárias, conhecido como azul da Ruhemann, ou um composto marrom correspondente aos produtos para reações com aminas secundárias. A mudança de coloração dos grãos de resina de um amarelo fraco para azul ou castanho indica, portanto, a presença de um grupo amino livre. Espera-se resultado positivo para uma etapa de desproteção eficiente e resultado negativo para uma etapa de acoplamento bem sucedida. Caso o resultado não seja o esperado, é necessária a repetição da respectiva etapa de acoplamento ou desproteção.

1.4 Testes Biológicos

Entre as considerações envolvidas na seleção de um agente antimicrobiano apropriado para se tratar uma infecção, a quantidade necessária para inibir ou matar o organismo *in vitro* é de extrema importância. Faz-se necessário, portanto, a avaliação do perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados aos fármacos antimicrobianos. Para a determinação do perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos, várias metodologias estão disponíveis, como a diluição em ágar e a microdiluição em meio de cultura, que fornecem resultados quantitativos (concentração inibitória mínima – CIM), bem como a metodologia do disco difusão, uma técnica qualitativa, que, apesar de ser de fácil execução, não é capaz de prever valores de CIM (Campana *et al.*, 2011).

Os procedimentos para a avaliação do perfil de susceptibilidade dos microrganismos são realizados segundo o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), que é uma organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, educacional e de desenvolvimento de normas/padrões, que promove o desenvolvimento e uso de normas/padrões (NCCLS, 2002; NCCLS, 2006).

No teste para susceptibilidade microbiana de drogas por disco difusão (também conhecido como o teste de Kirby–Bauer), no qual discos de papel impregnados com o fármaco são colocados sobre uma placa de Agar, tendo-se então a difusão do fármaco. A atividade do fármaco contra o microrganismo se correlaciona ao diâmetro da zona de inibição em torno do disco de crescimento, sendo esse medido em milímetros. Nesse teste, a dimensão da zona de inibição se relaciona ao grau de susceptibilidade microbiana. Quanto maior a zona, mais susceptível a bactéria ou o fungo é ao fármaco. O tamanho da zona de inibição tem uma correlação inversa à CIM, mas o tamanho da zona não deve ser utilizado para se obter um valor de CIM. Os resultados do teste de disco difusão são qualitativos, isto é, ele determina apenas se o microrganismo é resistente ou sensível ao fármaco, em vez de fornecer informações quantitativas como a CIM.

A diluição em caldo utiliza meio de crescimento líquido, que contém concentrações crescentes (normalmente, uma série de diluições) do agente antimicrobiano, o qual é inoculado com um número definido de células de microrganismos. Após a incubação, a presença de turbidez ou de sedimento indica o crescimento do organismo. A CIM é definida como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano, que impede o crescimento visível de um microrganismo sob condições definidas (Wiegand *et al.*, 2008). As CIMs são determinadas, usando-se concentrações derivadas, tradicionalmente, de diluições em série (ex., 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL, etc.). A CIM, entretanto, não representa um valor absoluto. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste.

Métodos de diluição são considerados como métodos de referência para testes de susceptibilidade *in vitro* e também são utilizados para avaliar o desempenho de outros métodos de testes de sensibilidade. Diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de diluição e de difusão. Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado dos organismos e não devem conter substâncias contrárias à atividade antimicrobiana em estudo. Por exemplo, dentre os muitos meios disponíveis, o ágar Mueller-Hinton é considerado o melhor para testes de sensibilidade contra bactérias não fastidiosas, por apresentar alta reprodutibilidade, por conter baixos teores de inibidores e por produzir crescimento satisfatório da maioria dos patógenos. A disponibilidade de oxigênio pode influenciar na multiplicação do microrganismo, dependendo do seu tipo de metabolismo, *i.e.*, aeróbico, anaeróbico ou facultativo. A

padronização do inóculo e da quantidade inoculada é importante, visto que a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos é dependente da quantidade do inóculo (Wiegand *et al.*, 2008).

A lise de eritrócitos é uma técnica utilizada na avaliação da toxicidade de compostos químicos, sendo que muitos peptídeos estudados têm suas aplicações limitadas, devido a suas altas atividades hemolíticas, que limitam o uso sistêmico de uma terapia com PAMs. A hemólise consiste na quebra de eritrócitos no sangue, que provoca a liberação de hemoglobina e do conteúdo intracelular para o plasma (hemo = sangue, lise = quebra). A membrana eritrocitária é formada por duas camadas protéicas envolvendo uma camada de lipídios e possui composições diferentes na sua parte interna, com lipídios negativos e neutros e, na parte externa, com lipídios neutros somente. A hemólise se torna claramente visível em amostras contendo porcentagem de lise tão baixa como 0,5 % de eritrócitos lisados, o que corresponde aproximadamente a 0,50 g/L de hemoglobina livre (Dolci & Panteghini, 2013). A liberação de hemoglobina é monitorada através da medição da absorbância do sobrenadante a 405 nm. Controles para nenhuma hemólise (branco) e 100 % de hemólise consistem de células vermelhas do sangue em suspensão, sem a presença do PAM, e em Triton X-100, respectivamente. Quando não há atividade hemolítica por parte do PAM, tem-se mais uma evidência da seletividade desse frente a membranas de microrganismos, o que reforça a idéia de que a presença de cargas negativas na superfície das membranas deve ser fundamental para a atuação do peptídeo como antimicrobiano (Archilha, 2009).

1.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) se baseia na absorção preferencial da luz circularmente polarizada, sendo uma técnica valiosa para se estudar a formação de estrutura secundária de proteínas e peptídeos em solução, pois permite a determinação dos percentuais de estrutura secundária de peptídeos e proteínas. Para isso, as amostras devem possuir unidades opticamente ativas, que, ao interagirem com a luz circularmente polarizada, provocam uma alteração na luz incidente. Na região do UV próximo (240-320 nm), o método é utilizado para identificar pequenas alterações estruturais, enquanto que, na região de UV distante (190-260 nm), o método é usado para caracterizar as alterações na estrutura secundária de peptídeos e proteínas (Karabancheva-Christova *et al.*, 2013).

A espectroscopia de CD consiste na absorção de radiação eletromagnética composta de dois componentes circularmente polarizados de igual magnitude, um em sentido anti-horário (\mathbf{E}_L) e outro no sentido horário (\mathbf{E}_R) (Figura 1.14). A espectroscopia de CD se baseia na diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à esquerda e a luz circularmente polarizada à direita: $\mathbf{CD} = \mathbf{E}_L - \mathbf{E}_R$, em moléculas opticamente ativas. Duas situações podem ocorrer quando essa luz passa pela amostra: as componentes não são absorvidas ou são igualmente absorvidas e nenhum sinal de CD é gerado, ou ocorre uma diferença na absorção das duas componentes, o que faz com que o sinal de CD seja diferente de zero (Kelly *et al.*, 2005).

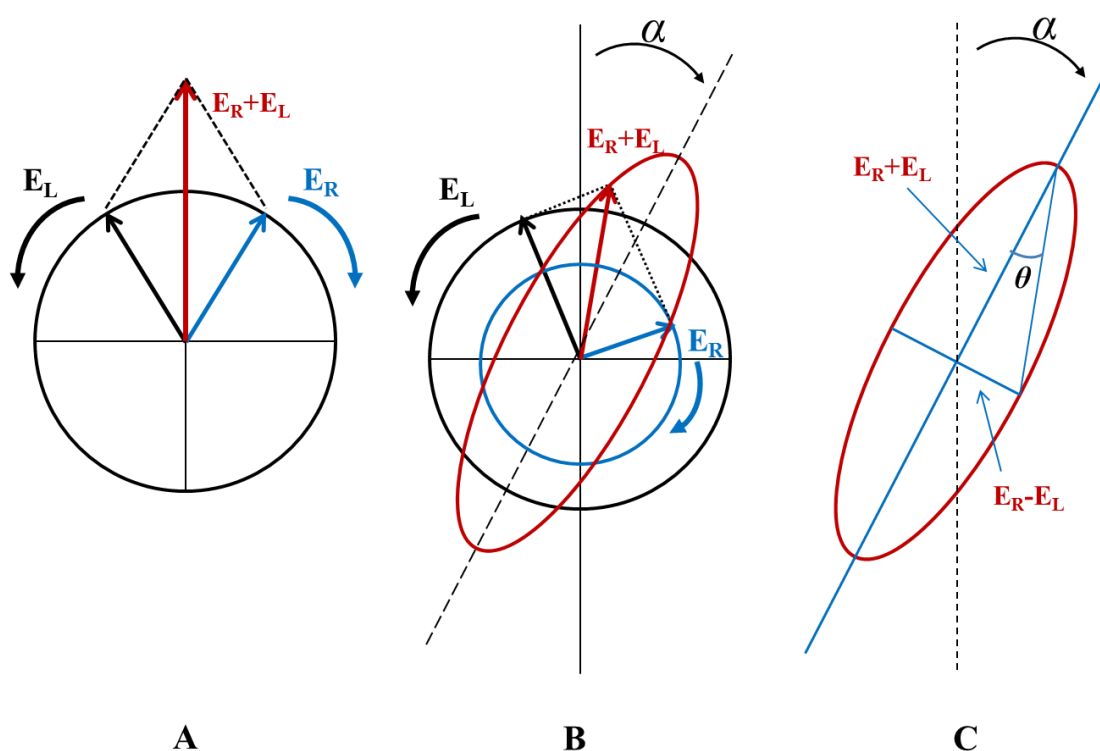


Figura 1.14: Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas \mathbf{E}_R e \mathbf{E}_L . (A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas, geram radiação plano polarizada; (B) componentes de magnitudes diferentes que resultam em uma luz elípticamente polarizada. (C) Elipse θ , cuja tangente é obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Figura adaptada de Kelly *et al.*, (2005). Reprodução autorizada pela Elsevier (ANEXO C).

As componentes de luz se tornam elípticamente polarizadas após passarem através de um meio opticamente ativo e, a luz circularmente polarizada a direita e a esquerda apresentam intensidades desiguais. Na Figura 1.13 o ângulo α é a rotação óptica, sendo o ângulo entre o maior eixo da elipse e o plano de polarização da luz inicialmente

plano polarizada. A elipticidade é o ângulo θ , cuja tangente é obtida da razão entre a menor e o maior eixo da elipse, conforme a Equação 1.1:

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad \text{Equação 1.1}$$

A análise dos dados de CD é feita por base no dicroísmo das ligações peptídicas e, dependendo da orientação destas ligações no esqueleto peptídico, as transições eletrônicas que podem dar origem ao sinal de CD são as $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. Os comprimentos de onda e as intensidades das transições podem variar, devido à influência da geometria local dos esqueletos peptídicos. Como consequência, os motivos característicos de estrutura secundária, tais como α -hélice e folhas- β , têm espectros de CD muito característicos (Figura 1.15) (Greenfield, 1996; Whitmore & Wallace, 2007).

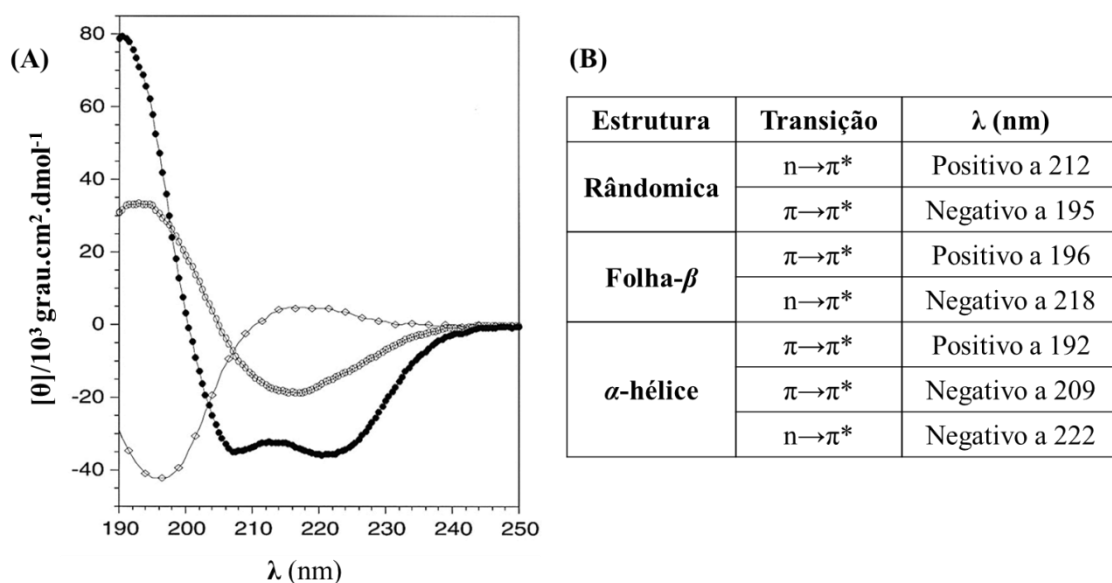


Figura 1.15: (A) Perfis de espectros de dicroísmo circular característicos de peptídeos em conformação em α -hélice (círculos a cheio), em conformação em folha- β (círculos vazios) e sem conformação preferencial (losangos) e (B) os comprimentos de onda de absorção e das principais transições eletrônicas, representativos de cada tipo de motivo de estrutura secundária. Figura (A) retirada de Fändrich & Dobson (2002). Reprodução autorizada pela John Wiley and Sons (Anexo D).

Para a determinação do perfil de estrutura secundária média foram desenvolvidas análises de desconvolução, para se quantificarem as contribuições provenientes dos diferentes motivos de estruturas secundárias presentes na estrutura tridimensional. A partir de bases de dados obtidas de conjuntos de espectros padrão, podem-se utilizar diferentes algoritmos empíricos, que analisam, por combinação dos

perfis registrados no banco de dados, os tipos de contribuições dos diferentes motivos estruturais, para a obtenção de um espectro que se assemelha ao obtido experimentalmente (Whitmore & Wallace, 2007; Sreerama & Woody, 2000; Sreerama & Woody, 2004). Ressalta-se que existem diferentes tipos de base de dados, tendo-se, por exemplo, bases referentes a peptídeos e proteínas de membranas.

1.6 Extravasamento de marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um interior aquoso. Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, sendo que as primeiras residem no compartimento aquoso, enquanto as lipofílicas são inseridas ou adsorvidas na membrana (Ferreira, 2013). Essas vesículas são comumente formuladas a partir de fosfolipídios e esteróis. Os lipídios mais utilizados nas formulações de lipossomas são os que apresentam uma forma cilíndrica, como as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa. A composição da preparação vai determinar as suas propriedades físico-químicas, tais como a temperatura de transição de fase (Toh & Chiu, 2013).

Lipossomas de diversos tamanhos e lamelaridade são formados espontaneamente, quando os componentes lipídicos são introduzidos em um ambiente aquoso. Devido à força hidrofóbica, as moléculas anfifílicas se aglomeram de forma a minimizar o contato entre suas porções hidrofóbicas e o meio aquoso envolvente. Esses agregados podem ser organizados em lipossomas, se fornecida quantidade adequada de energia, na forma de ciclos de aquecimento-resfriamento, seguido de homogeneização (*e.g.*, via extrusão), ou ainda pelo emprego de radiação ultra-sônica (Toh & Chiu, 2013). Os lipossomas devem ser processados para preencher os critérios tais como uma dimensão definida e estreita distribuição de tamanho. Sem qualquer processamento adicional, a dispersão de fosfolipídios em água origina uma população polidispersa denominada vesículas multilamelares (MLVs - "*multilamellar vesicles*"), cujos tamanhos estão, geralmente, compreendidos entre 0,4 e 3,5 μm de diâmetro, podendo-se ter múltiplas camadas lipídicas. Os lipossomas formados por uma única bicamada são denominados vesículas unilamelares, que são consideradas grandes (LUVs - "*large unilamellar vesicles*") se o seu tamanho for igual ou superior a 100 nm, enquanto que as vesículas unilamelares pequenas (SUVs - "*small unilamellar vesicles*") são

caracterizadas por diâmetros aproximados de 25 a 50 nm (Zhao, 2003). A Figura 1.16 ilustra as etapas da preparação de lipossomas.

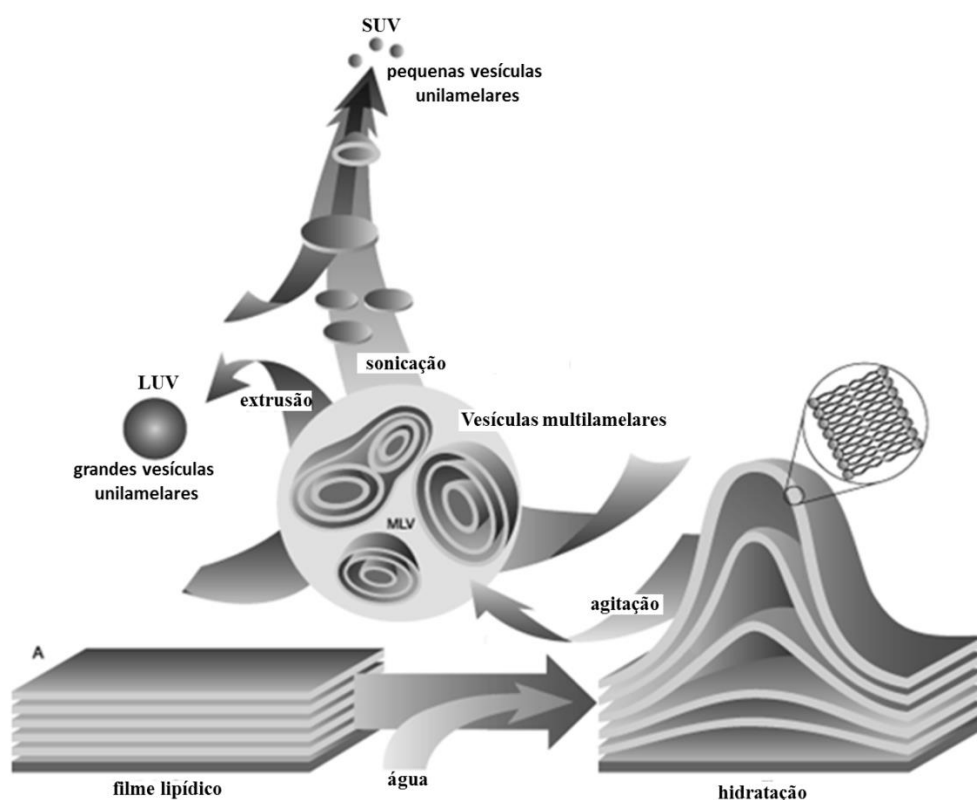


Figura 1.16: Representação esquemática das etapas da preparação dos lipossomas. Figura adaptada de <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>, Acessado em 24/09/2016.

As LUVs representam um sistema modelo importante para estudos envolvendo membranas biológicas. Variando-se a proporção, bem como a composição de fosfolipídios na preparação das vesículas, podem-se modular propriedades físico-químicas e bioquímicas importantes para uma mimetização eficiente do sistema de interesse (Sorkin *et al.*, 2013), o que é muito valioso para estudos de interações de biomoléculas com membranas (Edwards & Baeumner, 2006). A composição lipídica das membranas bacterianas desempenha um papel importante na interação com peptídeos antimicrobianos. É amplamente conhecido que peptídeos antimicrobianos catiônicos tendem a interagir mais fortemente com lipossomas contendo uma quantidade elevada de fosfolipídios aniônicos, do que com membranas miméticas contendo essencialmente fosfolipídios zwitteriônicos (Verly *et al.*, 2008).

Uma forma de se avaliar a perturbação exercida por um peptídeo à membrana fosfolipídica é por meio da realização de experimentos de liberação de marcadores

químicos encapsulados em lipossomas. A calceína, que é uma sonda fluorescente, quando incorporada no compartimento aquoso interno dos lipossomas permite verificar o efeito formador de poros exercido pelos PAMs nas bicamadas lipídicas. Nesses testes, a ação dos peptídeos em modelos de membranas é analisada acompanhando-se o perfil de extravasamento da calceína encapsulada nos lipossomas em função do tempo. Se os PAMs rompem o empacotamento da membrana, o sinal fluorescente aumenta, devido ao extravasamento do marcador químico. Para se obterem informações de porcentagem de extravasamento, é necessário se conhecer a fluorescência máxima, ou seja, a fluorescência quando todas as membranas são rompidas. Para isso é adicionada, ao final do experimento, uma solução de detergente (normalmente 10% m/v de Triton X-100), que promove a ruptura total do empacotamento das membranas.

A porcentagem de vazamento de calceína é determinada, utilizando-se a Equação 1.2:

$$\text{Vazamento (\%)} = \frac{I(t) - I_0}{I_T - I_0} \times 100 \quad \text{Equação 1.2,}$$

onde $I(t)$ é a intensidade de fluorescência no tempo “ t ”, I_0 é a intensidade de fluorescência antes da adição de peptídeo e I_T é a intensidade de fluorescência após a adição de Triton X-100. A velocidade de liberação de calceína é calculada através do ajuste exponencial dos dados de intensidade de fluorescência em função do tempo.

1.7 Determinação estrutural de PAMs por Ressonância Magnética Nuclear

Para o entendimento da relação estrutura/atividade nas biomoléculas é de fundamental importância o conhecimento da suas estruturas. Assim, um dos objetivos principais de estudos estruturais de proteínas e peptídeos é a determinação da estrutura tridimensional em alta resolução. A cristalografia de raios-X e a ressonância magnética nuclear (RMN) são técnicas capazes de fornecer estruturas tridimensionais em alta resolução.

Anteriormente, as estruturas tridimensionais de proteínas poderiam ser determinadas exclusivamente por métodos de cristalografia e difração de raio-X. Contudo, os estudos cristalográficos de proteínas nem sempre são possíveis, pois, um monocristal de alta qualidade é de difícil obtenção (Wüthrich, 1989; Surewicz *et al.*, 1993). Além disso, a determinação da estrutura de forma isolada pode não representar

adequadamente a conformação da proteína no ambiente complexo e dinâmico de células vivas. Em contrapartida, a determinação estrutural por RMN dispensa a cristalização, pois analisa as proteínas em solução, além de possibilitar o estudo estrutural mais amplo, com a utilização de ambientes que mimetizam o meio biológico. Embora, os meios miméticos sejam uma representação muito simplificada, eles possibilitam a análise de diversos parâmetros importantes para o estudo de peptídeos e proteínas, como características de dinâmica, estudos de aspectos estruturais e de interações entre proteínas e membranas (Warschawski *et al.*, 2011). Destacam-se quatro elementos principais que viabilizam a determinação estrutural por RMN: (a) desenvolvimento das técnicas de RMN multidimensionais; (b) metodologias de atribuições sequenciais de ressonâncias; (c) conversão dos sinais de NOE (Efeito Nuclear Overhauser) em restrições conformacionais e, (d) interpretação das restrições conformacionais. A metodologia de atribuição sequencial foi desenvolvida por Wüthrich, (1986) sendo baseada na identificação de sistemas únicos de *spins* em cadeias polipeptídicas e de ácidos nucléicos, possibilitando a extração de informações estruturais dos mapas de contornos de RMN bidimensionais.

As principais técnicas de RMN bidimensionais para a aplicação da metodologia de Wüthrich (1986) são os experimentos de correlação homonuclear: *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (COSY 2D), *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY 2D) e *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY 2D). As informações sobre os prótons pertencentes a um único resíduo de aminoácido, ou seja, correlações intrarresiduais, são obtidas pela análise dos mapas de contornos COSY 2D e TOCSY 2D, nos quais a magnetização de um núcleo de hidrogênio é transferida para outro por meio de ligações químicas (por meio do acoplamento escalar *spin-spin*, J). Como resultado, cada resíduo de aminoácido apresenta um sistema de *spin* característico, como exemplificado na Figura 1.17 (p. 32), que mostra a simulação da identificação dos sistemas de *spin* dos resíduos de alanina e aspartato em um mapa de contornos TOCSY.

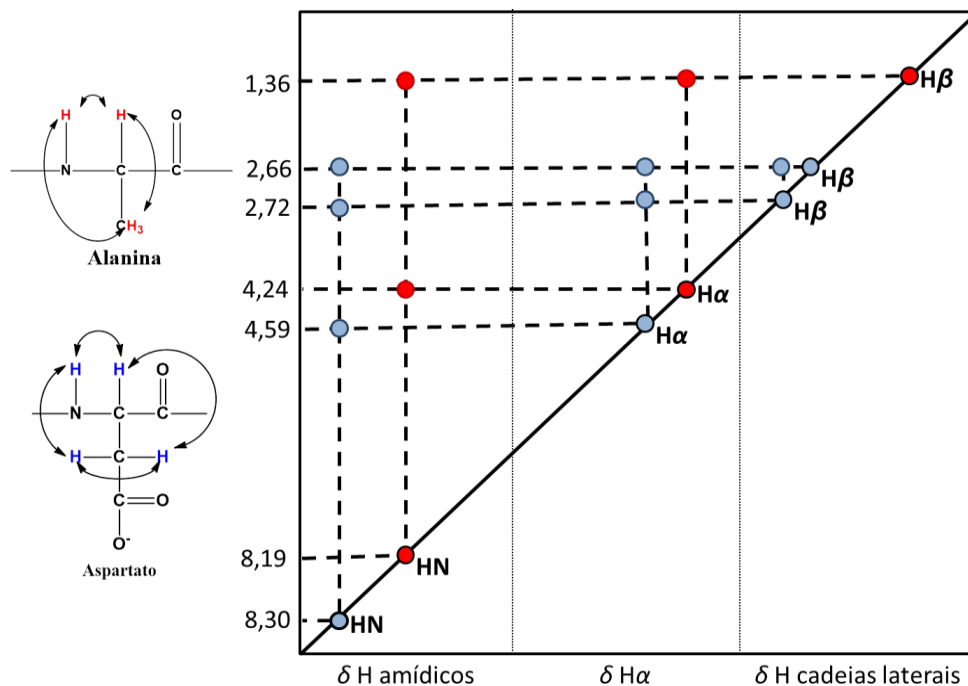


Figura 1.17. Identificação dos sistemas de *spins* padrão no mapa de contornos TOCSY, dos resíduos de aminoácido alanina (sinais em vermelho) e aspartato (sinais em azul). Figura adaptada de Wüthrich, 1986.

Os sinais de NOE são a fonte de informação mais relevante para a obtenção das estruturas tridimensionais. As intensidades dos sinais estão diretamente correlacionadas à distância entre dois hidrogênios, que podem pertencer ao mesmo ou a resíduos de aminoácidos distantes na estrutura primária, mas que estão próximos no espaço. A partir da análise do mapa de contornos NOESY é possível, então, a obtenção de correlações inter-residuais de hidrogênios, especialmente próximos, que se correlacionam por interações de acoplamento dipolar. As distâncias entre os núcleos vizinhos são classificadas em faixas semi-quantitativas, de acordo com as intensidades ou volumes dos sinais de NOE obtidos. As correlações de NOE são indicadores importantes de motivos estruturais e podem ser classificadas como sequenciais, a média e longa distância (Wüthrich, 1986).

Como representado na Figura 1.18 (p. 33), para as estruturas em α -hélice identificam-se uma série de correlações de NOE bem características, incluindo correlações sequenciais NN ($i, i+1$), α N ($i, i+1$) e β N ($i, i+1$), e a média distância NN ($i, i+2$), α N ($i, i+2$), α N ($i, i+3$), $\alpha\beta$ ($i, i+3$) e α N ($i, i+4$). Da mesma forma, motivos estruturais tipo fita- β (Figura 1.19, p. 33) apresentam correlações específicas, em especial as sequenciais, NN ($i, i+1$) e α N ($i, i+1$), e a longa distância, que ocorrem entre os resíduos de fitas adjacentes, α N (i, j), NN (i, j) e $\alpha\alpha$ (i, j).

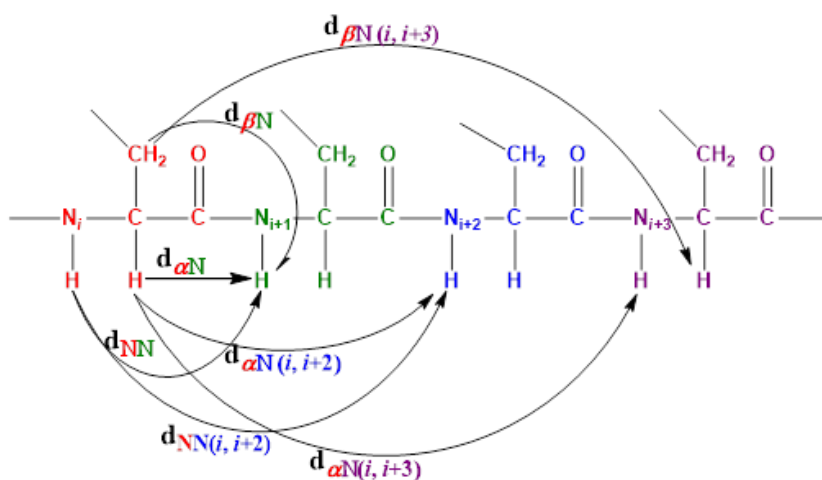


Figura 1.18: Representação das correlações de NOE típicas de estruturas do tipo α -hélice. Figura adaptada de Wüthrich, 1986.

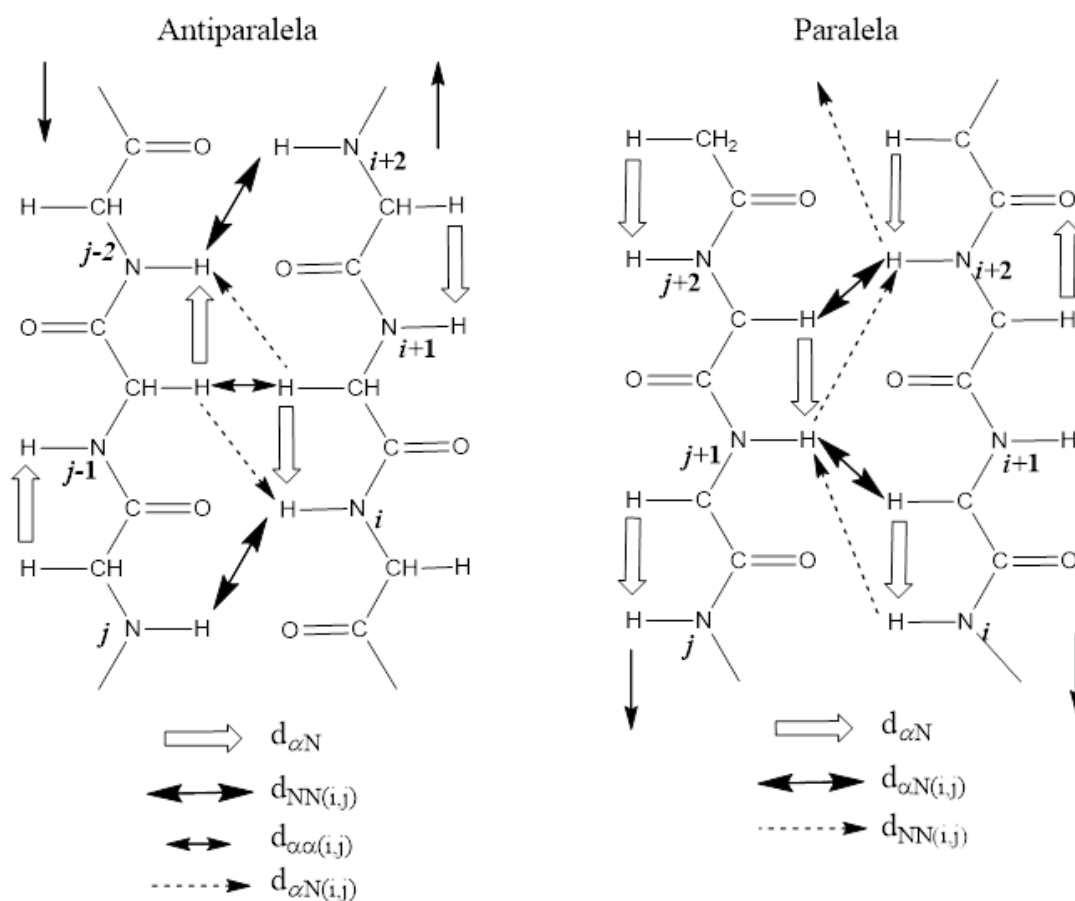


Figura 1.19: Representação das correlações de NOE típicas de estruturas do tipo Fita- β . Figura adaptada de Wüthrich, 1986.

Outra importante fonte de informação estrutural são os valores deslocamento químico. Os deslocamentos químicos (δ) são parâmetros sensíveis ao ambiente, às conformações locais, bem como aos ângulos diedros φ e ψ , em que se encontra o

núcleo. Assim, a estruturação em α -hélice ou fita- β tem uma influência efetiva sobre os valores de deslocamentos químicos dos núcleos, já que a adoção desses diferentes motivos estruturais acontece devido à variação dos ângulos diedros ϕ e ψ (Figura 1.20).

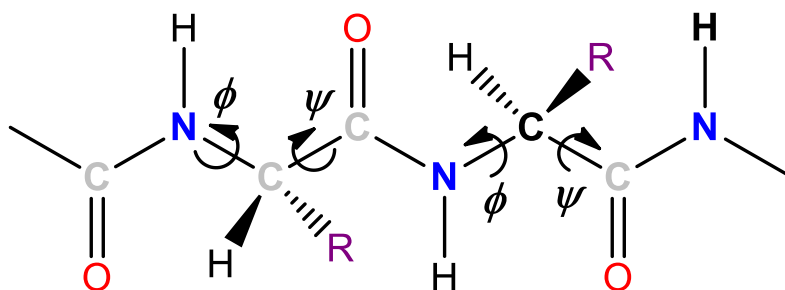


Figura 1.20: Representação dos ângulos de torção dos resíduos de aminoácido.

Alguns métodos empíricos são utilizados para correlacionar deslocamentos químicos com elementos estruturais de proteína e peptídeos. Esses métodos empregam bases de dados de estruturas já determinadas, para prever as características estruturais de novos sistemas. O método Índice de Deslocamento Químico (CSI - *chemical shift index*) calcula desvios característicos dos deslocamentos químicos de alguns dos núcleos de resíduos de aminoácidos em relação aos deslocamentos químicos tabelados para esses núcleos em estrutura randômica de referência (Wishart *et al.*, 1992). Normalmente, utilizam-se os valores de deslocamento químico dos núcleos de $^{13}\text{C}\alpha$ e $^1\text{H}\alpha$, já que esses mostram uma menor influência em relação à sequência de aminoácidos, podendo assim, serem utilizados de forma confiável como indicadores de estrutura secundária (Schwarzinger *et al.*, 2001; Wishart *et al.*, 1995). Para a comparação de valores de deslocamento químico de $^1\text{H}\alpha$, como ilustrado na Figura 1.21 (p. 35), os valores de desvios negativos sugerem estruturas helicoidais, enquanto que, os valores de desvios positivos indicam estruturas em conformações- β .

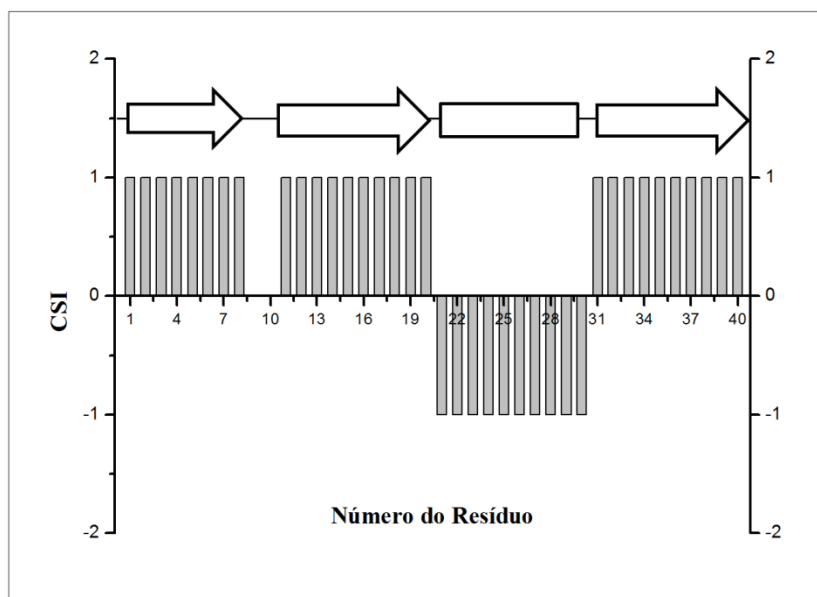


Figura 1.21: Índice de deslocamento químico – CSI, derivado de deslocamentos químicos de $^1\text{H}\alpha$. Valores negativos indicam estruturas helicoidais e os valores positivos conformações- β .

Os valores de deslocamento químico podem ainda fornecer restrições angulares por meio de relação empírica entre estes valores e os ângulos de torção φ e ψ . Essa relação é em geral realizada pelo programa TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999), TALOS+ (Shen *et al.*, 2009) e sua versão mais recente TALOS-N (Shen & Bax, 2015). Esses programas utilizam uma base de dados de deslocamentos químicos de átomos de proteínas já elucidadas e, pelo emprego de diversos cálculos e tratamentos estatísticos, determinam com precisão as restrições angulares.

Como último elemento, para obtenção de estruturas tridimensionais, é realizada a interpretação dos conjuntos de restrições conformacionais obtidas por meio dos dados de RMN. A estrutura é obtida por uma análise quantitativa das informações de restrições estruturais, com o uso de cálculos de *simulated annealing* (SA) (Nilges *et al.*, 1988; Brunger *et al.*, 1997), sendo esse o procedimento mais empregado na determinação de estruturas a partir de dados de RMN.

O SA consiste em um procedimento de minimização de energia para superar barreiras locais por dinâmica molecular, onde a temperatura é aumentada para valores elevados, a fim de proporcionar grande energia cinética para o sistema, seguindo-se da etapa de resfriamento, que leva a um número razoável de conformações de baixa energia (reconhecidas pelos baixos valores da energia potencial restante) (Brunger *et al.*, 1990). A Figura 1.22 (p. 36) mostra um exemplo das mudanças de conformação

sofridas durante um procedimento de SA. Como resultado, são obtidas geometrias com energias próximas ao mínimo global das estruturas estudadas (Nilges *et al.*, 1988).



Figura 1.22: Representação das mudanças conformacionais sofridas por uma molécula durante o processo de cálculo por recozimento simulado. Figura retirada de Agostini *et al.* (2006). Reprodução autorizada pela John Wiley and Sons (ANEXO E).

A elucidação das estruturas dos PAMs ligados a membranas é realizada principalmente por técnicas de RMN em solução, na presença de modelos miméticos, tais como misturas de co-solventes orgânicos e água e soluções aquosas de micelas detergentes (Warschawski *et al.*, 2011). Os solventes orgânicos são muito convenientes para realização dos experimentos, contudo, não se assemelham totalmente do ambiente de membranas biológicas. As micelas de detergentes, tais como dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilmfosfocolina (DPC), são capazes de mimetizar melhor as características das membranas, mas, os melhores modelos miméticos de membrana são as bicamadas lipídicas ou bicelas, que são mais utilizadas para análises por RMN do estado sólido (Hansen *et al.*, 2015), embora o uso de bicelas pequenas tenha possibilitado seu emprego em análises por RMN em solução (Vold *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2008; Al-Abdul-Wahid *et al.*, 2009).

A despeito da grande importância da RMN em solução, a RMN do estado sólido alcançou grande aplicação na investigação de peptídeos de membrana, em particular, a determinação de interações com membranas lipídicas e a caracterização da orientação na membrana (Bechinger & Salnikov, 2012; Hansen *et al.*, 2015). A orientação em relação à superfície da membrana pode ser obtida sob condições estáticas utilizando bicamadas lipídicas alinhadas, ou por técnicas de giro do ângulo mágico (MAS). Os valores de deslocamento químico são altamente dependentes ao alinhamento das moléculas em relação ao campo magnético do espectrômetro (B_0) e isto pode ser usado

para obter informações valiosas sobre a orientação das ligações e moléculas em relação à membrana (Bechinger *et al.*, 2011).

A investigação das características topológicas dos PAMs tem possibilitado a obtenção de muitas informações de dados estruturais, permitindo melhor entendimento da atividade antimicrobiana associada à formação de poros (Bechinger, 1999), como relatado para os peptídeos caerina 1.1 e aureina 1.2 (Laadhari *et al.*, 2016); as filoseptinas-1, -2 e -3 (Resende *et al.*, 2014) e para peptídeos catiônicos seletivos e não seletivos (Fillion *et al.*, 2014). Em todos esses estudos, os resultados mostraram que a estrutura tridimensional do peptídeo influencia grandemente os tipos de perturbação que estes induzem em sistemas lipídicos orientados, permitindo precisar informações sobre os mecanismos de ação dos PAMs.

1.8 Objetivos

Tem-se como objetivo principal deste trabalho, a investigação de três peptídeos isolados do anuro da espécie *Leptodactylus labyrinthicus*, realizando-se estudos quanto:

- à determinação das estrutura primárias dos peptídeos;
- às atividades biológicas associadas aos peptídeos;
- a interações dos peptídeos com membranas
- a aspectos estruturais em sistemas que mimetizam o ambiente de membranas, empregando-se técnicas espectroscópicas como Dicroísmo Circular (CD), a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução, bem como procedimentos teóricos associados a cálculos de estruturas e determinação de parâmetros da RMN.

Para tanto, tem-se como objetivos específicos para o trabalho:

- sequenciamento dos peptídeos isolados, por degradação automatizada de Edman;
- a obtenção em maior escala dos peptídeos por método de síntese em fase sólida;
- a investigação das atividades biológicas associadas aos peptídeos. Serão avaliadas atividades antibacteriana e antifúngica, bem como a ação hemolítica dos peptídeos;
- a realização de estudos estruturais e da afinidade com membranas dos peptídeos por CD. Esses estudos serão realizados em meio aquoso, bem como em diferentes meios miméticos de membranas, *e.g.* misturas de TFE:água, micelas de detergentes e vesículas fosfolipídicas.

- medidas de extravasamento de calceína incorporada a vesículas grandes unilamelares;
- estudos por RMN da estrutura dos peptídeos em misturas de TFE:água e na presença de micelas;
- Determinação da estrutura tridimensional dos peptídeos através de procedimentos de dinâmica molecular, utilizando-se restrições geométricas obtidas de dados de RMN.

2 Metodologia

2.1 Sequenciamento dos peptídeos

Para o sequenciamento automático *N*-terminal dos peptídeos, utilizou-se o sequenciador de proteínas e peptídeos Protein Sequencer PPSQ-31A da SHIMADZU CORPORATION, seguindo-se as instruções do fabricante.

As condições de operação do sequenciador foram: detector de UV em $\lambda=269\text{nm}$, fluxo isocrático de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com acetonitrila 37% como fase móvel, temperatura da coluna 40°C , coluna de fase reversa WAKOSIL-PTH (4.6 mm x 9250 mm, Wako, Osaka, Japão) e fluxo de nitrogênio gasoso para minimizar a produção de bolhas.

A condensação do peptídeo com o reagente de Edman foi feita com solução de fenilisocianato (PITC) em heptano a 5%, na presença de solução de trimetilamina 12%. Para a etapa de clivagem, utilizou-se ácido trifluoroacético e para a conversão do intermediário tiazolina (ATZ) para feniltio-idantoina (PTH), utilizou-se solução de ácido trifluoroacético, 25%. Todos os reagentes foram obtidos da *Wako Pure Chemical Industries* (Osaka, Japão).

Primeiramente, foi feita uma análise da mistura padrão de aminoácidos-PTH para a calibração do sistema de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para executar a calibração do sistema, checkou-se e corrigiu-se o tempo de retenção e a linha de base no cromatograma da mistura padrão de aminoácidos-PTH. Após essa etapa, realizou-se uma ativação do disco de fibra de vidro (*Glass Fiber Disk, TFA Treated*, 12 mm, Wako, Osaka, Japão) com Polibreno (poliamina quaternária que produz um aumento na capacidade de determinar as estruturas de peptídeos)

A fração de interesse obtida na purificação da secreção foi ressuspendida em $30\ \mu\text{L}$ de solução aquosa de TFA 0,1 % e aplicada diretamente em membrana de fibra de vidro (*glass fiber disk, TFA treated*, Wako, Japan). Após configuração das condições do sistema

(fluxo, λ , temperatura e número de ciclos), o sequenciamento foi iniciado. Com uma duração de 47 minutos para cada ciclo, o tempo total das análises dependeu da quantidade de ciclos estabelecidos e, conseqüentemente, da quantidade de aminoácidos presente no peptídeo. Estimativas de seqüências foram geradas automaticamente durante a execução do sequenciamento. A cada ciclo, um cromatograma foi gerado e analisado até que a seqüência de cada amostra foi completada.

2.2 Síntese dos peptídeos

2.2.1 Acoplamentos

Os peptídeos sequenciados foram obtidos em maior quantidade por meio da síntese química manual, via estratégia Fmoc (Chan e White, 2000). Na Figura 2.1 (p. 41) é apresentado um fluxograma com as etapas envolvidas na síntese. Para esse procedimento, utilizou-se como suporte sólido a resina Rink-Amide (que fornece como produto final o peptídeo amidado na porção C-terminal) com grau de substituição 0,63 mmol.g⁻¹ e Fmoc-resíduos de aminoácidos, ambos da *Iris Biotech* (Marktredwitz, Alemanha). Foram empregados como agentes ativadores do grupo carboxila a *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazolona (HOBt). Uma mistura de DMF:DCM (*N,N*-dimetilformamida:diclorometano) na proporção de 2:1 foi usada como solvente nas reações de acoplamento, tendo sido a DMF purificada por destilação fracionada do reagente PA. As lavagens da peptidil-resina (ou resina) foram feitas segundo descrito no Protocolo 1 (p. 42). Planejaram-se sínteses para um rendimento máximo que fornecesse até 250 mg de peptídeo, *i.e.*, 0,11404 mmol do peptídeo ocellatina-LB1, 0,10841 mmol do peptídeo ocellatina-LB2 e 0,09814 mmol do peptídeo ocellatina-F1. As sínteses foram realizadas em seringas de 10 mL, equipadas com filtros, para se facilitarem as etapas de adição de reagentes, as etapas de lavagem, bem como a separação do peptídeo da resina na etapa de clivagem.

Para se iniciar a síntese, a resina é previamente preparada realizando-se três lavagens com 5 mL de DCM. A cada lavagem, a resina é exposta ao DCM por aproximadamente 5 minutos e depois o solvente é removido por filtração.

Previamente às reações de acoplamento, deve-se remover o grupo protetor Fmoc da peptil-resina (ou resina), segundo reação de desproteção descrita no Protocolo 1 (p. 42). A eficácia das etapas de desproteção deve ser avaliada pelo teste de Kaiser, descrito no Protocolo 1 (p. 38). Resultados positivos indicam uma desproteção eficiente, ao passo

que resultados negativos indicam que a reação não alcançou a homogeneidade. Em caso de resultado negativo, devem ser efetuadas consecutivas reações de desproteção, seguidas de teste de Kaiser, até que resultado positivo seja observado. Em caso de resultado positivo, procede-se a lavagem da peptidil-resina (ou resina – Protocolo 1, p. 42), que estará preparada para a respectiva etapa de acoplamento.

As reações de acoplamento são efetuadas conforme descrito no Protocolo 1 (p. 42). A eficácia das etapas de acoplamento deve ser avaliada pelo teste de Kaiser. Resultado negativo indica etapa de acoplamento eficiente, ao passo que resultado positivo indica que o acoplamento não atingiu a homogeneidade. Em caso de resultado positivo, devem ser efetuadas reações consecutivas de acoplamento, seguidas de teste, até que resultado negativo seja observado. Em casos onde se observam sucessivos resultados positivos, pode-se aumentar o tempo de reação e/ou o número de excesso de reagentes, bem como se pode adicionar uma gota de detergente Triton X-100. Em caso de resultado negativo, procede-se a lavagem da peptidil-resina (ou resina – Protocolo 1, p. 42), que estará preparada para a próxima etapa de desproteção.

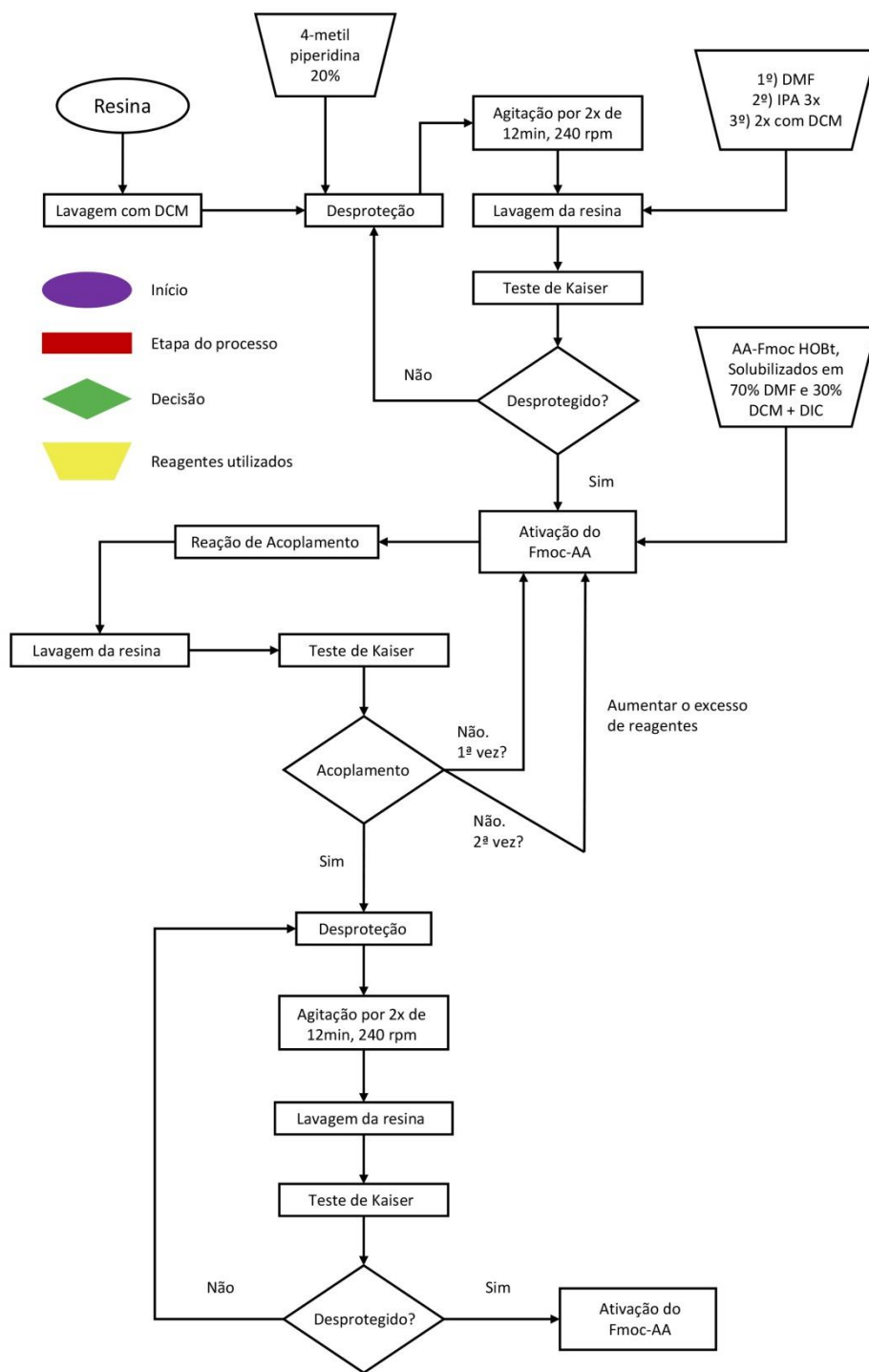


Figura 2.1: Representação esquemática das etapas da estratégia Fmoc de SPFS. Retirado de Barbosa, 2016.

Protocolo 1: Procedimentos utilizados nas etapas de lavagem, desproteção, acoplamento e no teste de Kaiser.

- Lavagem
 - a. Procedem-se por três vezes lavagem da peptídil-resina (ou resina) com uma série alternada de DMF e AIP (aproximadamente 5 mL de cada), procedendo-se uma última lavagem com DCM (aproximadamente 5 mL de cada). Em cada etapa o solvente é removido por filtração.
- Desproteção
 - a. Adicionam-se à peptídil-resina (ou resina) cerca de 3 mL de solução de 4-metilpiperidina em DMF (20% V/V).
 - b. Agita-se a mistura por 12 min, a 240 rpm.
 - c. Remove-se a solução de 4-metilpiperidina por filtração.
 - d. Repetem-se os procedimentos 'a', 'b' e 'c' mais uma vez.
 - e. Lava-se a peptídil-resina, como descrito no tópico Lavagem.
- Teste de Kaiser
 - a. Adicionam-se a um tubo de ensaio, quatro a seis grãos de peptídil-resina (ou resina), com o auxílio de uma espátula.
 - b. Acrescenta-se ao tubo, com uma pipeta de Pasteur, uma gota de piridina a 2 % (v/v) em solução aquosa de KCN a 1mmol.L^{-1} , duas gotas de fenol a 80 % (m/v) em etanol e uma gota de ninidrina a 5 % (m/v) em etanol.
 - c. Aquece-se o tubo a 100 °C por 4 minutos em um bloco de aquecimento.
 - d. Observa-se o resultado: Positivo quando os grãos tornam-se coloridos; Negativo quando os grãos permanecem incolores.
- Acoplamento
 - a. Adiciona-se a um recipiente a massa calculada do resíduo de aminoácido e de HOBt.
 - b. Acrescentam-se ao recipiente 2 mL de DMF e 1 mL de DCM, para a dissolução da mistura.
 - c. A mistura é homogeneizada sob agitação em vortex.
 - d. Adiciona-se o volume calculado de DIC.
 - e. Promove-se então uma nova agitação em vortex.
 - f. Transfere-se a mistura reacional para um frasco de síntese, o qual é deixado sob agitação mecânica a 240 rpm, por 2 h (na primeira reação de acoplamento 3 h).

2.2.2 Clivagem do peptídeo da peptidil-resina

Antes de iniciar a reação de clivagem, a cadeia peptídica ligada à resina foi desprotegida, lavada e a desproteção foi confirmada pelo teste de Kaiser (Protocolo 1, p. 38). Para a clivagem foi adicionada à peptidil-resina seca uma solução de TFA:TIS:EDT:água (ácido trifluoroacético:triisopropilsilano:etanoditiol:água) na proporção de 94,0:1,0:2,5:2,5 (v:v:v:v) (10 a 25mL/g de resina). Em seguida, a mistura foi submetida a agitação mecânica por três horas. Após a agitação, a solução de clivagem foi transferida para um tubo Falcon limpo. A resina foi lavada por duas vezes com um pequeno volume de TFA. A solução de clivagem foi evaporada, até atingir o menor volume possível, com um fluxo de nitrogênio gasoso e posteriormente foram adicionados de 5 a 8 mL de éter diisopropílico gelado ao tubo Falcon, para precipitar o peptídeo. O tubo foi resfriado com nitrogênio líquido e centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante separado. Por fim, realizam-se ainda outras quatro lavagens com éter diisopropílico gelado, utilizando-se o mesmo procedimento.

2.2.3 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados em fase sólida foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). Os experimentos foram realizados em colunas C18 em escalas analítica e semi-preparativa (colunas *μBondapak* C18, 250 X 4,6mm e *Vydac* C 18, 300 X 7,8mm, respectivamente), em sistema para CLAE Varian modelo Pro Star 210 com detector na região do ultravioleta modelo Pro Star 330, válvula de injeção marca Rheodyne. Foram utilizados como eluentes soluções de água mili-Q acidulada com ácido TFA grau UV/HPLC (0,1% TFA/água mili-Q, fase A) e acetonitrila (ACN) grau UV/HPLC da J. T. Baker em TFA (TFA/ACN 0,08%, fase B). Para o monitoramento dos experimentos, empregou-se detector de ultravioleta (UV), sendo utilizado $\lambda_{\text{máx}}$ de 214nm (210-215 nm faixa de absorção do grupo amido).

Inicialmente, em uma escala analítica, foram eluídas alíquotas de todos os peptídeos (20 μ L de solução a 1mg / mL) em um gradiente crescente de ACN/TFA 0,08 % de 0 a 100 % durante 60 minutos com um fluxo de 1mL/minuto. Os resultados do ensaio em escala analítica foram usados para a definição das condições do ensaio em escala semi-preparativa.

A purificação foi conduzida em escala semi-preparativa, injetando-se aproximadamente 5 mg de amostra bruta dissolvida em 5 mL de água Mili-Q, utilizando-se fluxo de 2 mL.min⁻¹. Utilizaram-se as seguintes condições durante os experimentos: 20 a 35 % do eluente B de 0 a 5 min; 35 a 45 % do eluente B de 5 a 20 min; 45 a 100 % do eluente B de 20 a 35 min; 100 % do eluente B de 35 a 37 min; 100 a 20 % do eluente B de 37 a 40 min. Todas as frações foram coletadas manualmente, submetidas à liofilização e mantidas a -20 °C para posterior caracterização.

Os peptídeos purificados foram analisados por espectrometria de massas MALDI-ToF/EM em modo positivo, no espectrômetro autoflex™ III SmartBeam (Bruker Daltonics) pertencente ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG. As alíquotas de cada fração foram diluídas em água mili-Q acidulada com TFA e misturadas com uma solução saturada de matriz do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em uma placa de MALDI, onde cristalizaram à temperatura ambiente. Nessa técnica, os peptídeos são ionizados e separados conforme a massa, possibilitando sua análise e identificação.

2.3 Testes biológicos

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Os testes de microdiluição em meio foram utilizados para a determinação da sensibilidade *in vitro* de microrganismos frente aos peptídeos sintetizados. Por esse método foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de peptídeo que inibe o crescimento microbiano. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

As cepas utilizadas no presente estudo foram: bactérias *Gram*-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556); bactérias *Gram*-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29522); e fungos, *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida lusitanae* (ATCC 56936). Para os teste de susceptibilidade de bactérias foi utilizado o caldo Müller-Hinton como meio. Em relação aos fungos, foram utilizados os meios ágar e caldo sabourand dextrose.

Alíquotas de 50 μ L de diluições seriadas dos peptídeos, feitas a partir de uma solução estoque 2000 μ g.mL⁻¹, foram incubadas com 50 μ L de suspensão bacteriana ou

de leveduras padronizadas. Após o crescimento das colônias em caldo nutriente, os microrganismos foram diluídos em solução salina estérea (NaCl 0,9 %). Com o objetivo de se padronizar a densidade dos inóculo para os testes de sensibilidade, foi utilizado o controle de turbidez equivalente a uma solução padrão Escala McFarland de 0,5, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL .

A turbidez da cultura, em solução salina ou caldo estéreis, foi ajustada de modo a se obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada, usando-se um espectrofotômetro com fonte de luz de 1 cm e cubetas apropriadas para se determinar a absorbância. A absorbância a 630 nm e 540 nm, respectivamente, para as bactérias e para a levedura, variou de 0,08 a 0,10. Isso resultou em uma suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC.mL⁻¹.

Para a realização dos testes de microdiluição em caldo, a suspensão de McFarland 0,5 foi diluída (1:10) em caldo ou solução salina estéreis, para se obter uma concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹, de maneira que, após a inoculação, cada poço continha aproximadamente 5×10^5 UFC.mL⁻¹.

2.3.2 Atividade hemolítica

Eritrócitos de sangue de Coelho, Alsever, foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com solução salina fosfato tamponada (NaCl a 0,14 M; KCl a 2,7 M; Na₂HPO₄ a 10 mM; NaH₂PO₄ a 1,8 mM e pH 7,4). A mesma solução salina foi utilizada para se diluírem os peptídeos e para se preparar uma solução 2% (V/V) de eritrócitos. Em uma placa tipo elisa (micro placa de 96 poços), alíquotas de 100 µL de diluições seriadas dos peptídeos, feitas a partir de uma solução estoque 2000 µg.mL⁻¹, foram incubadas com 100 µL da suspensão de eritrócitos por 1 h, a 37 °C. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada por 5 min a 300 xg. Uma alíquota de 100 µL de cada poço foi transferida para outra placa do tipo elisa e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Para as amostras de controle, foram utilizados Triton X-100 (1% v/v) como referência de 100 % de lise e solução salina como referência de 0 % de lise. Para os controles, as alíquotas de 100 µL de diluições dos peptídeos foram substituídas por alíquotas de 100 µL de Triton e salina, respectivamente, como controle positivo e controle negativo.

2.4 Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular (CD) foram realizados a 20 °C ou 30 °C em espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier Jasco PTC-423L. Como porta amostras foi utilizada uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico. Empregaram-se os seguintes parâmetros para a obtenção dos espectros: janela espectral de 190 a 260 nm, velocidade de varredura de 50 nm.min⁻¹, coleta de dados 0,2 nm, 1 nm de largura de banda, tempo de resposta de 1 s. Os espectros foram adquiridos e processados com o software Spectra Manager e foram posteriormente analisados com auxílio do software CDPro (Sreerama & Woody, 2004; Sreerama & Woody, 2000).

As análises de CD foram realizadas a 20 °C para todos os peptídeos em proporções variadas de água e 2,2,2 trifluoroetanol (TFE), bem como em soluções aquosas na presença de micelas de dodecilsulfocolina (DPC) ou dodecilsulfato de sódio (SDS) e também na presença de LUVs de 100 nm de POPC ou POPC:POPG (3:1 mol:mol). Foram realizadas quatro acumulações para os experimentos em soluções de H₂O:TFE, seis na presença de soluções micelares e oito na presença de LUVs. Foram também realizados experimentos a 30 °C para todos os peptídeos em solução aquosa na presença de micelas dodecilsulfato de sódio (SDS). Em todas as análises, os espectros foram subtraídos dos respectivos brancos para correção de linha de base. A Figura 2.2 (p. 47) apresenta as estruturas químicas dos lipídios, POPC e POPG, e dos detergentes, DPC e SDS, utilizados na preparação das micelas e vesículas. Como pode ser observado, o DPC e o POPC são compostos zwitteriônico, enquanto SDS e POPG são aniônicos.

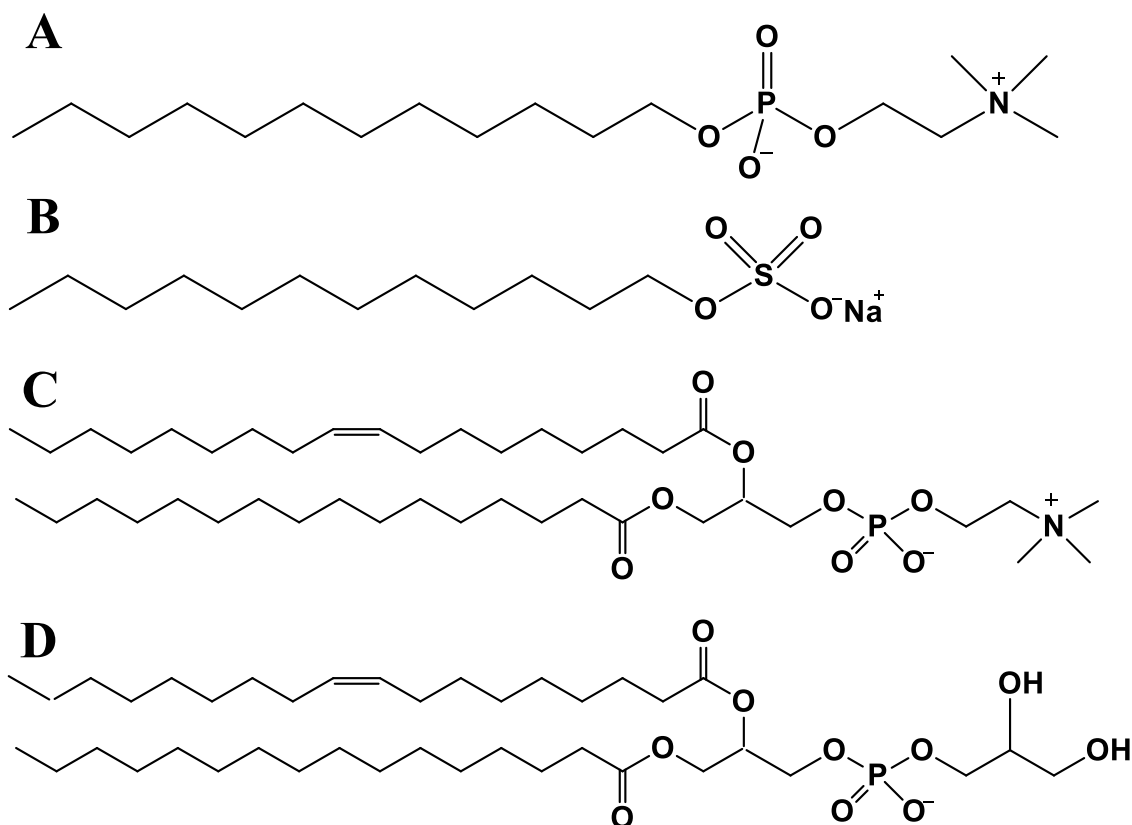


Figura 2.2: Estrutura molecular dos detergentes e fosfolipídios utilizados para a preparação de membranas mimética: (A) DPC – Dodecil Fosfocolina, (B) SDS – Dodecil sulfato de sódio, (C) POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina, (D) POPG – 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol.

Foram preparadas soluções dos peptídeos a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em diferentes proporções de TFE:água (0:100; 10:90; 20:80; 30:70; 50:50 e 60:40). O volume final de cada solução foi de $300 \mu\text{L}$. Para se avaliarem os efeitos da força iônica e do pH, foram realizados experimentos com soluções do peptídeo em TFE:água 60:40, na presença NaCl a diferentes concentrações e na presença de tampão fosfato 5 mM a pH 5,8; 7,0 e 8,0.

Soluções-estoque de SDS e DPC (35 mM) foram preparadas, solubilizando-se a quantidade necessária de cada detergente em água mili-Q. Para as análises foram preparadas soluções dos peptídeos a $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ em diferentes concentrações dos detergentes.

Para os estudos na presença de vesículas, duas diferentes preparações foram usadas, POPC e POPC:POPG (3:1 mol:mol). Os fosfolipídios utilizados foram obtidos da *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, AL). Inicialmente, as quantidades corretas dos lipídios foram dissolvidas em clorofórmio e transferidas para um balão de fundo redondo. Posteriormente, o solvente foi removido com auxílio de um evaporador rotativo

(QUIMIS – Q344B2), sendo então formado um filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com água mili-Q e agitado com vórtex, para a formação de LMV (*Large Multilamellar Vesicles* – vesículas grandes multilamelares). As LMV foram submetidas a uma sequência de cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. A dispersão de vesículas multilamelares obtida foi submetida a ciclos de dez extrusões, através de membranas de policarbonato (WHATMAN) de 0,1 μm , usando-se um extrusor de pressão manual (*Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, Alabama*). As soluções-estoque das vesículas foram preparadas com concentrações de 2,5 mM para POPC e 3,5 mM para POPC:POPG (3:1). Para as análises foram preparadas amostras dos peptídeos a 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para diferentes concentrações dos lipossomas, totalizando um volume de 350 μL de amostra.

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas (índice de polidispersão) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, utilizando um contador de partículas equipado com raio laser monocromático (NANO SIZE ZS modelo ZEN3600 red laser). Amostras de lipossomas foram diluídas em tampão Tris-HCl pH 7,4, para se obter uma contagem adequada de partículas. O índice de polidispersão avalia a distribuição da população de partículas em torno de um tamanho médio de partícula. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.5 Extravasamento marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas

As vesículas unilamelares grandes (LUV – *Large Unilamellar vesicles*) foram formadas a partir da película seca, que foi obtida por evaporação da solução do lipídio (POPC) em clorofórmio. Primeiramente, a quantidade necessária de lipídeo (POPC: 58 mg, 75 mM) foi solubilizada em cerca de 1 mL de clorofórmio e o solvente foi seco em fluxo de nitrogênio gasoso por 20 min. O filme lipídico foi hidratado com 1 mL de uma solução 75 mM de calceína e 20 mM tampão HEPES (pH 7,2) e agitado com vórtex, para a formação de LMV. As LMV foram submetidas a uma sequência de cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria. A dispersão de vesículas multilamelares obtida foi submetida a ciclos de dez extrusões, através de membranas de policarbonato (WHATMAN) de 0,1 μm , usando-se um extrusor de pressão manual (*Avanti Polar Lipids, Inc. Alabaster, Alabama*). A calceína não encapsulada foi removida por filtração em gel, através de uma mini coluna de Sephadex

G50 equilibrada com um tampão de HEPES 20 mM, contendo NaCl a 0,15M, pH 7,2. A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente, imediatamente antes dos experimentos de extravasamento.

A capacidade dos peptídeos em permear a membrana foi determinada a 37 ° C por vazamento de calceína a partir das LUVs, que foi monitorada em tampão de HEPES por medição da fluorescência (Espectrofluorímetro Cary Eclipse, Varian, Palo Alto, USA), com comprimento de onda de excitação a 505 nm e de emissão a 513 nm. A intensidade de fluorescência máxima (100 % de liberação) foi determinada pela adição de 10 μ L de uma solução aquosa de Triton X-100 (1 % em volume) à amostra de lipossoma (2,5 mL).

Para as análises, alíquotas de LUVs (5 μ L), foram adicionadas à cubeta de fluorescência contendo 2,5mL do tampão HEPES e o aumento da fluorescência da calceína em função do tempo foi medido continuamente, sendo que, após dois minutos de leitura, diferentes quantidades de peptídeo foram adicionadas à amostra de lipossomas (20, 40, 80 e 120 μ g para ocellatina-LB1 e ocellatina-LB2 e 2,5, 5, 10, 20 e 40 μ g para ocellatina-F1). As concentrações finais para os peptídeos foram 3,65, 7,30, 14,66 e 21,90 μ mol.mL⁻¹ para ocellatina-LB1, 3,46, 6,94, 13,88 e 20,70 μ mol.mL⁻¹ para ocellatina-LB2 e, 0,39, 0,79, 1,57, 3,14, 6,28 μ mol.mL⁻¹ para ocellatina-F1. Após seis minutos de leitura, foi adicionada solução de Triton X-100 (1% em volume).

A porcentagem de vazamento de calceína foi determinada, utilizando-se a Equação 1.2:

$$\text{Vazamento (\%)} = \frac{I(t) - I_0}{I_T - I_0} \times 100 \quad \text{Equação 1.2}$$

onde $I(t)$ é a intensidade de fluorescência no tempo t , I_0 é a intensidade de fluorescência antes da adição de peptídeo e I_T é a intensidade de fluorescência após a adição de Triton X-100.

2.6 Experimentos de RMN

Os experimentos de RMN de ¹H, de ¹³C e de ¹⁵N foram realizados no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN), na UFRJ, em um espectrômetro Bruker AVANCE III 600, que opera a 600,130, 150,903 e 60,834 MHz, respectivamente, para ¹H, ¹³C e ¹⁵N ou em espectrômetro Bruker AVANCE III 800, que opera a 800,118, 201,193 e 81,107 MHz para ¹H, ¹³C e ¹⁵N, respectivamente. No

espectrômetro Bruker AVANCE III 800 foi utilizada uma sonda de 5 mm de tripla ressonância ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$), enquanto no espectrômetro Bruker AVANCE III 600 utilizou-se uma sonda criogênica de 5 mm de tripla ressonância ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$), ambas com bobina para emprego de pulsos de gradiente de campo.

Os experimentos de RMN para a determinação estrutural dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 foram realizados no equipamento de 800 MHz para os peptídeos na presença de micelas de DPC- d_{38} a 20 °C e na presença de micelas de SDS- d_{25} à temperatura de 30 °C para os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2, e a 50 °C para a ocellatina-F1. Para otimizar o tempo de utilização dos espectrômetros, os experimentos de ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HMQC para a ocellatina-LB2 na presença de micelas de SDS foram realizados no equipamento de 600 MHz. Os espectros para as amostras em mistura de TFE- d_2 /H $_2$ O (60:40%, v/v) foram adquiridos no equipamento de 600 MHz, a 20 °C.

Foram preparadas amostras dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 a 1,5 mM em mistura de TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40 %, v/v), na presença de tampão fosfato pH 7 a 20,0 mM. Foram utilizados TFE- d_2 da *Cambridge Isotope Laboratories* e água mili-Q no preparo das soluções. O 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) a 1 mmol.L $^{-1}$ foi utilizado como padrão interno de referência para as ressonâncias de ^1H e ^{13}C .

Para os experimentos na presença de micelas, foram preparadas amostras contendo 2 mmol.L $^{-1}$ de peptídeo e 400 mmol.L $^{-1}$ de DPC- d_{38} ou SDS- d_{25} (*Cambridge Isotope Laboratories*, Andover, MA), 5% (v/v) D $_2$ O (99,75 %, Merck) em H $_2$ O, e 1 mmol.L $^{-1}$ de DSS.

Experimentos de TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) para as amostras em TFE- d_2 /H $_2$ O (60:40 %, v/v) foram realizados usando-se a sequência de pulsos MLEV-17 (Bax & Davis, 1985). Os parâmetros empregados para as amostras em TFE- d_2 :H $_2$ O foram: largura espectral de 6602,113 Hz (11,0011 ppm), 512 incrementos em t_1 com 8 transientes de 4096 pontos totais. Para as amostras na presença de micelas, os parâmetros foram: largura espectral de 8802,817 Hz (10,9980 ppm), 512 incrementos em t_1 com 32 transientes de 4096 pontos totais e 512 incrementos em t_1 com 16 transientes de 4096 pontos totais para cada FID.

Experimentos de NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*) (Kumar *et al.*, 1980) foram adquiridos com diferentes tempos de mistura (100, 120, 150 ms para os

experimentos na presença de micelas e 100, 150 e 200 ms para os experimentos em TFE- d_2 :H₂O), com o objetivo de se avaliar difusão de *spin*. Como parâmetros, para amostras em TFE- d_2 :H₂O (60:40 %, v/v), utilizou-se janela espectral de 6602,113 Hz (11,0011 ppm), 512 incrementos em t_1 com 32 transientes de 4096 pontos totais. Na presença de micelas, utilizou-se janela espectral de 8802,817 Hz (10,9980 ppm), 512 incrementos em t_1 com 32 transientes de 4096 pontos totais para cada FID.

Experimentos de ¹H-¹³C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 2128,624 Hz (35,00 ppm) e 6602,113 Hz (11,0011 ppm), respectivamente, e foram usados 256 incrementos em t_1 coletados com 64 transientes de 1024 pontos totais, para ocellatina-LB1, e 384 incrementos em t_1 com 64 transientes de 1024 pontos totais para ocellatina-LB2 e -F1 para os peptídeos em TFE- d_2 :H₂O (60:40 %, v/v). Nas amostras de ocellatina-LB1 e -F1 na presença de micelas, utilizaram-se janelas espectrais F1 e F2 de 12827,239 Hz (85,00 ppm) e 6602,113 Hz (10,9980 ppm), respectivamente, 256 incrementos em t_1 com 64 transientes de 1024 pontos totais para cada FID. Para as amostras da ocellatina-LB2, foram utilizadas janelas espectrais F1 e F2 de 12827,239 (85,00 ppm) Hz e 6602,113 Hz (10,9980 ppm), respectivamente, 384 incrementos em t_1 com 64 transientes de 1024 pontos totais para cada FID. Os experimentos foram adquiridos em modo editado, de forma que as correlações de CH e CH₃ resultaram em sinais com fase positiva enquanto que as de CH₂ em sinais com fase negativa (Wilker *et al.*, 1993).

Experimentos de ¹H-¹⁵N HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) foram realizados em TFE- d_2 :H₂O, com janelas espectrais em F1 e F2 de 2128,624 Hz (35,00 ppm) e 6602,113 Hz (11,0011 ppm), respectivamente, e 128 incrementos em t_1 foram coletados com 800 transientes de 1024 pontos totais para cada FID. Na presença de micelas de DPC- d_{38} , os espectros foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 2433,402 Hz (30,00 ppm) e 8802,817 Hz (10,9980 ppm), respectivamente, e foram usados 128 incrementos em t_1 coletados com 800 transientes de 1024 pontos para cada FID, para as ocellatinas-LB1 e -F1. Para a ocellatina-LB2 foram usados 128 incrementos em t_1 coletados com 1024 transientes de 1024 pontos para cada FID. Na presença de micelas de SDS- d_{25} , os espectros foram adquiridos com janelas espectrais F1 e F2 de 2433,402 Hz (30,00 ppm) e 8802,817 Hz (10,9980 ppm) respectivamente e foram usados 128 incrementos em t_1 coletados com 1600 transientes de 1024 pontos para cada FID, para ocellatina-LB1, 800 transientes de 1024 pontos totais para

ocellatina-LB2 e 1400 transientes de 1024 pontos totais para ocellatina-F1 para cada FID (Wilker *et al.*, 1993).

Para as amostras dos peptídeos em soluções de TFE- d_2 :H₂O, espectros de DQF-COSY (*Double-Quantum Filtered Correlation Spectroscopy*) (Piantini *et al.*, 1982; Derome & Williamson, 1990) foram adquiridos com janelas espectrais de 6602,113 Hz (11,0011 ppm), tendo sido adquiridos 1024 incrementos em t_1 com 32 transientes de 4096 pontos totais para ocellatina-LB1 e 1024 incrementos em t_1 com 16 transientes de 4096 para cada FID, para as ocellatina-LB2 e -F1. Para as amostras dos peptídeos na presença de micelas de DPC- d_{38} , utilizou-se como parâmetros, para as ocellatinas-LB1 e -LB2, janela espectral de 8802,817 Hz (10,9980 ppm), 512 incrementos em t_1 com 32 transientes de 1024 pontos totais para cada FID e para a ocellatina-F1 janela espectral de 8802,817 Hz (11,9980 ppm), 512 incrementos em t_1 com 16 transientes de 1024 pontos totais para cada FID.

2.7 Processamento, análise e tratamento dos dados de RMN

Os espectros obtidos foram processados pelo programa NMRPipe® (*NMRPipe Spectral Processing and Analysis System*®) (Delaglio *et al.*, 1995). A interpretação dos mapas de contornos foi efetuada no programa NMRView 5.0 (Johnson e Blevins, 1994). As correlações de NOE obtidas no mapa de contornos NOESY tiveram suas intensidades convertidas em restrições de distâncias, as quais foram calibradas segundo algoritmos propostos por Hyberts e coautores (Hyberts *et al.*, 1992). Os limites máximos de restrições de geometria obtidos foram de 2,8, 3,4 e 5,0 Å (NOEs fortes, médios e fracos, respectivamente). As restrições angulares foram obtidas pelo programa Talos+ (Delaglio *et al.*, 1995), por meio de análise dos valores de deslocamento químico dos átomos da cadeia principal C α , H α , C β , Ne HN, em relação a um banco de dados de deslocamentos químicos desses átomos em estruturas de proteínas determinadas em alta resolução.

Os cálculos da estrutura foram realizados usando o software Xplor-NIH, versão 2.17 (Schwieters *et al.*, 2006). Partindo-se da estrutura estendida, foram geradas 100 estruturas usando um protocolo de *annealing* simulado. Isto foi seguido por 20000 passos de simulação de *annealing* a 1000 K e o subsequente decréscimo da temperatura em 15000 passos. As dez estruturas de energia mais baixa foram refinadas usando um protocolo *sa_new.inp* e a qualidade estereoquímica foi analisada por PROCHECK-

RMN (Laskowski *et al.*, 1996). A visualização, análise e manipulação das estruturas tridimensionais foram realizadas com o programa MOLMOL (Koradi *et al.* 1996).

As coordenadas atômicas das estruturas mais estáveis foram depositadas no *RCSB Protein Data Bank*, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (os códigos PDB ID para os peptídeo em TFE- d_2 :H $_2$ O e na presença de micelas de DPC- d_{38} e SDS- d_{25} , respectivamente: 5U9Q, 5U9V, 5UA6 para ocellatina-LB1, 5U9R, 5U9X, 5UA7 para ocellatina-LB2 e 5U9S, 5U9Y, 5UA8 para ocellatina-F1).

3 Resultados e discussão

3.1 Sequenciamento dos peptídeos

A Figura 3.1 mostra o perfil cromatográfico obtido na purificação da secreção da pele da rã e os picos assinalados representam as frações com peptídeos puros, que foram sequenciadas por degradação automática de Edman.

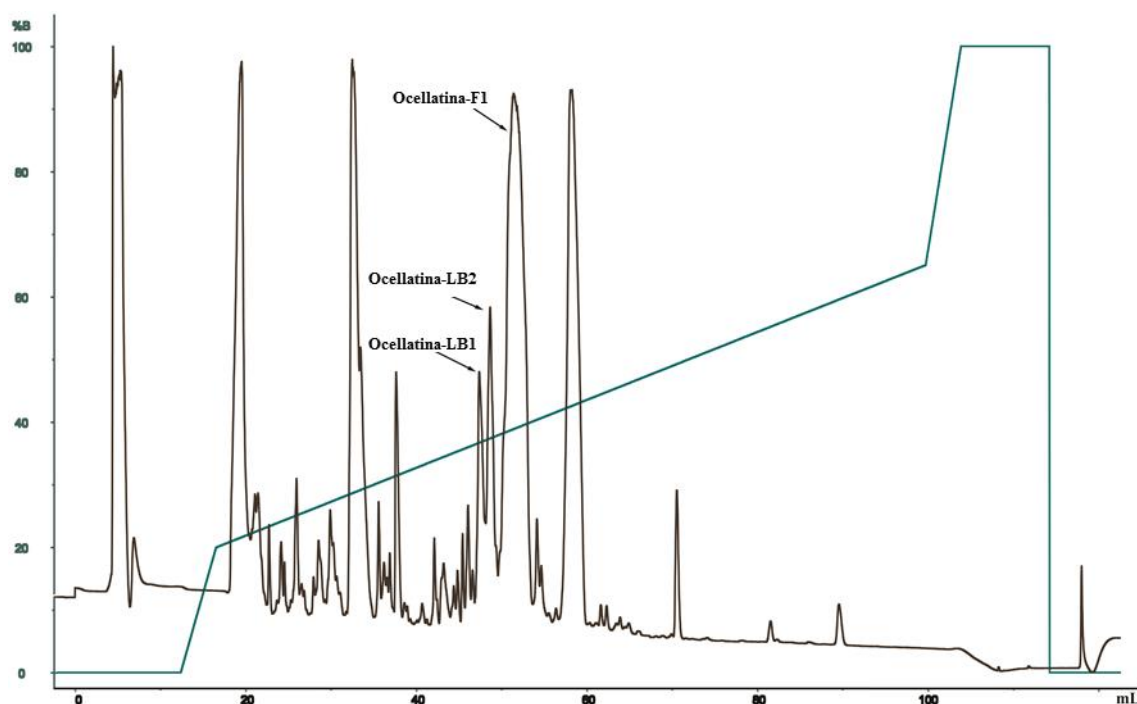


Figura 3.1: Perfil de CLAE – FR da purificação da secreção da pele de *L. labyrinthicus*, coluna C8 preparativa (Discovery Supelco - 4,6 x 250 mm), injeção de 4 mL, concentração 1 mg.mL $^{-1}$, fluxo 1mL.min $^{-1}$. Eixo da esquerda representa a concentração de acetonitrila ao longo do gradiente. A seta indica as frações que foram sequenciadas por degradação de Edman automatizada.

A Figura 3.2a (p. 54) apresenta o cromatograma resultante da calibração do sequenciador de proteínas e peptídeos com a mistura padrão de aminoácidos-PTH. A

calibração é importante, uma vez que a identificação dos aminoácidos-PTH gerados durante o sequenciamento é feita comparando-se os tempos de retenção dos respectivos picos com os padrões. As Figuras 3.2b e 3.2c (p. 54) mostram os cromatogramas resultantes dos dois primeiros ciclos de degradação de um dos peptídeos analisados, onde se observa o pico referente ao resíduo de Gly (Figura 3.2b) e Val (Figura 3.2c), com tempos de retenção idênticos aos do cromatograma padrão.

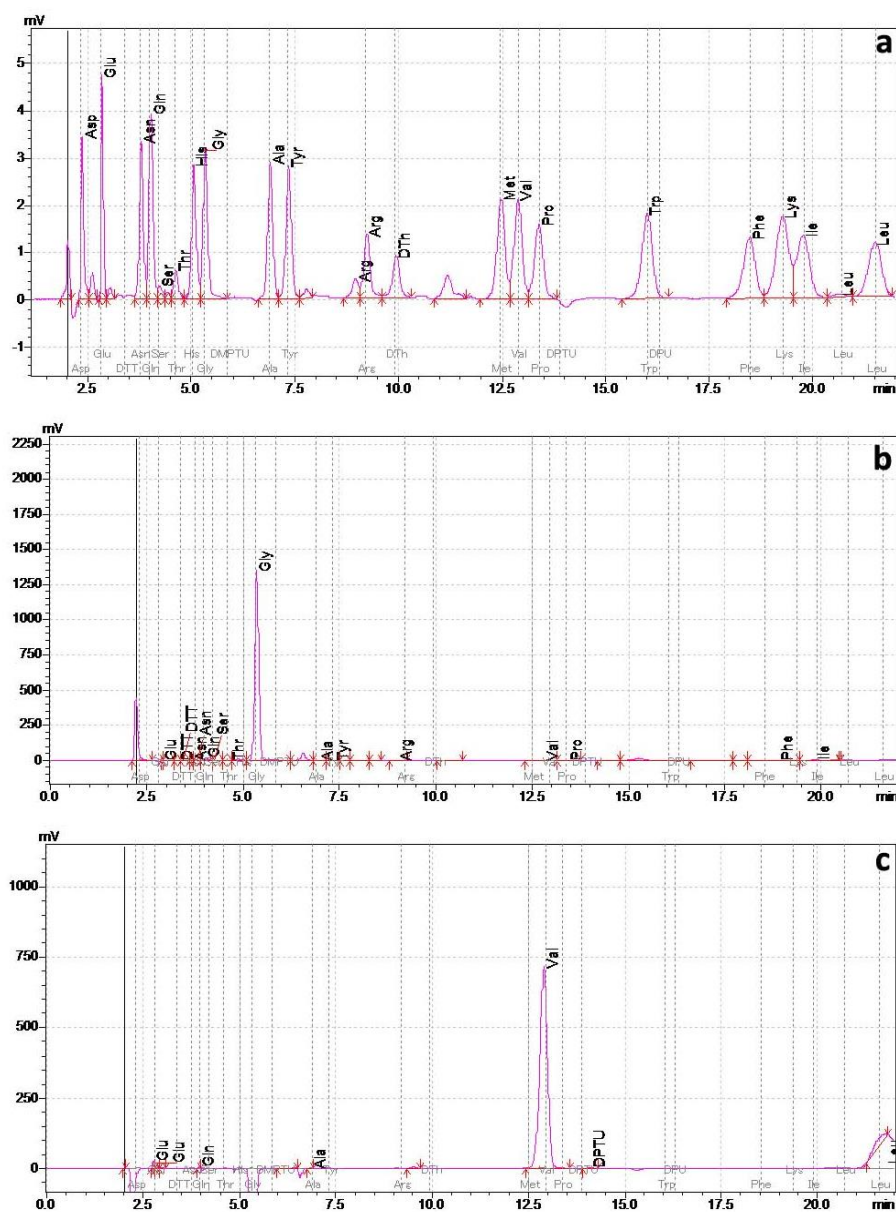


Figura 3.2: Cromatogramas resultantes (a) da calibração do sequenciador com mistura padrão de aminoácidos-PTH; (b) do primeiro ciclo de degradação da ocellatina-LB1 e (c) do segundo ciclo de degradação da ocellatina-LB1. Condições de operação: detector de UV em $\lambda=269$ nm, fluxo isocrático de 1 mL/min com acetonitrila a 37 % como fase móvel, temperatura da coluna 40°C, coluna de fase reversa WAKOSIL-PTH (4.6 mm x 250 mm, Wako, Osaka, Japão).

A Figura 3.3 (p. 55) apresenta os espectros de massas (EM) dos peptídeos isolados da secreção cutânea e as respectivas massas monoisotópicas. A análise desses espectros, após a determinação das sequências e das massas moleculares dos peptídeos, confirmou a amidação *C*-terminal dos peptídeos, nos quais se observaram, em todos os casos, uma diferença de um Da na massa monoisotópica, em relação ao peptídeo carboxilado, o que corresponde à substituição de $-OH$ (17 Da) por $-NH_2$ (16 Da).

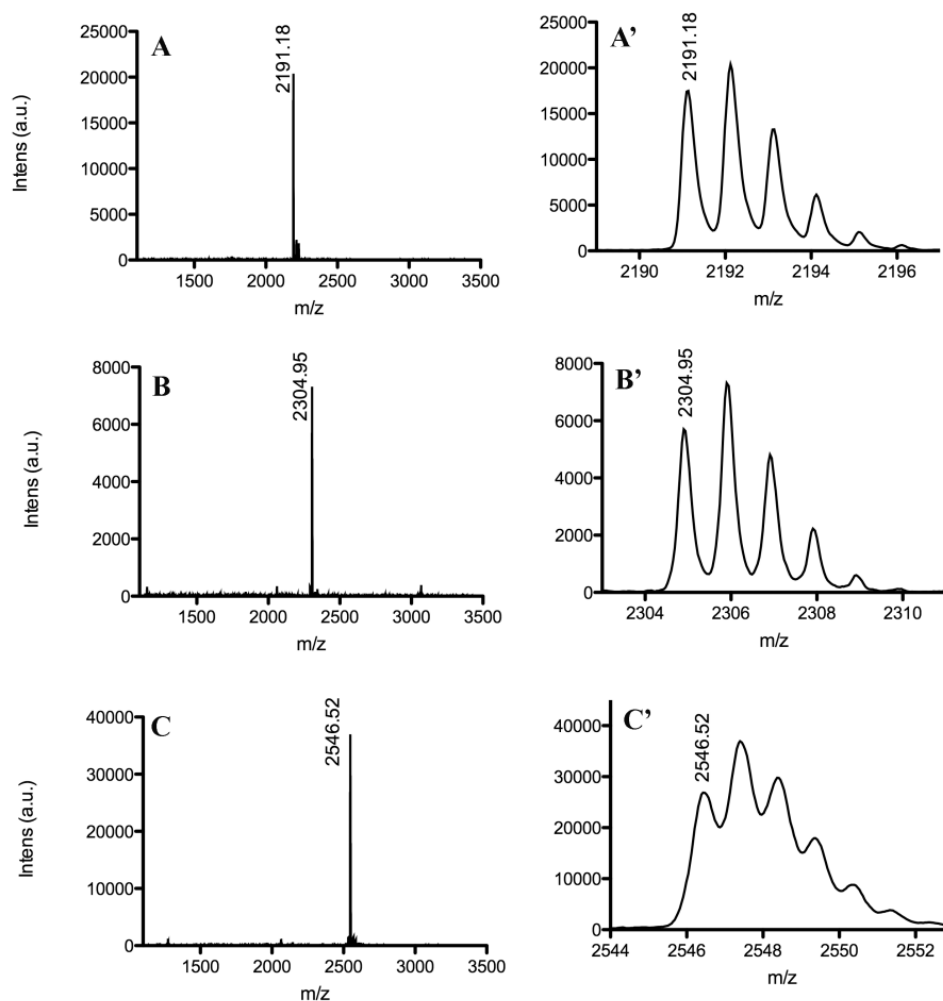


Figura 3.3: Espectros de massas (MALDI-ToF-EM) e expansões das frações correspondentes a (A, A') ocellatina-LB1, (B, B') ocellatina-LB2 e (C, C') ocellatina-F1. Massas monoisotópicas observadas: 2191,18; 2304,95 e 2546,52 Da, respectivamente, para ocellatina-LB1, -LB2 e F1.

Os três peptídeos isolados da secreção cutânea da rã *Leptodactylus labyrinthicus* foram sequenciados por degradação de Edman e as sequências encontradas são apresentadas na Tabela 3.1 (p. 56). Foram atribuídos a essas sequências os nomes ocellatina-LB1, -LB2 e -F1.

Tabela 3.1: Sequências primárias dos peptídeos obtidas por degradação de Edman

Nome	Sequência	Número de resíduos	M_T^*	M_O^*
ocellatina-LB1	GVVDI LKGAA KDIAG HLASK VM-NH ₂	22	2191,24	2191,18
ocellatina-LB2	GVVDI LKGAA KDIAG HLASK VMN-NH ₂	23	2305,08	2304,95
ocellatina-F1	GVVDI LKGAA KDIAG HLASK VMNKL-NH ₂	25	2546,46	2546,52

* M_T e M_O correspondem, respectivamente, às massas monoisotópicas teórica e observadas dos peptídeos amidados.

Um das sequências resultantes corresponde ao peptídeo ocellatina-F1, anteriormente conhecida como fallaxina, que foi originalmente encontrado na secreção da pele de *Leptodactylus fallax* (Rollins-Smith, et al., 2005) e também recentemente isolada da secreção da pele *Leptodactylus labyrinthicus* (Neto et al., 2015). Esse peptídeo é ativo contra bactérias, mas, não foi observada qualquer atividade contra a estirpe de *Candida albicans* testadas (Rollins-Smith, et al., 2005). Além disso, Pimenta e colaboradores (Neto et al., 2015) observaram um efeito antiviral sinérgico entre a ocellatina-F1 e o alcaloide bufotenina, uma vez que as combinações destes compostos conduzem a uma Inibição pronunciada da infecção de células BHK-21 promovida pelo vírus da raiva. Outros dois peptídeos foram isolados da secreção e, de acordo com a nomenclatura proposta por Conlon (2008) os nomes ocellatin-LB1 e -LB2 foram atribuídos às suas sequências.

Para inferir sobre o potencial antimicrobiano das três ocellatinas, foi realizado o alinhamento das sequências primárias com outros peptídeos (Tabela 3.2, p. 57). As sequências foram comparadas com os peptídeos antimicrobianos, Ocellatin-S1 (Dourado et al., 2007), Ocellatin-1 (Nascimento et al., 2004), Ocellatin-K1 e Ocellatin-PT3 (Marani et al., 2014), utilizando Clustal Omega (Sievers et al., 2011) e uma grande semelhança entre as sequências primárias pode ser observada, o que indica que estes compostos podem apresentar atividades antimicrobianas.

Tabela 3.2: Alinhamento das sequências das ocellatinas com peptídeos antimicrobianos

Nome	Espécie	Sequência
ocellatina-LB1	<i>L. labyrinthicus</i>	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVM---
ocellatina-LB2	<i>L. labyrinthicus</i>	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMN--
ocellatina-F1	<i>L. labyrinthicus</i>	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL
ocellatina-K1	<i>L. knudseni</i>	GVVDILKGAAKDLAGHLASKVMNKI
ocellatina-S1	<i>L. syphax</i>	GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINIKI
ocellatina-1	<i>L. ocellatus</i>	GVVDILKGAAGKDLLAHLVVGKISEKV
ocellatina-PT3	<i>L. pustulatus</i>	GVIDIILKGAAGKDLIAHAIGKLAEKV

De posse das sequências é possível avaliar as composições dos peptídeos, quanto à diversidade dos resíduos de aminoácidos presentes. A Tabela 3.3 apresenta o número de resíduos polares e apolares, bem como a carga líquida esperada, em pH fisiológico, a hidrofobicidade e o momento hidrofóbico de cada peptídeo.

Tabela 3.3: Propriedades das sequências de resíduos de aminoácidos dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1

Peptídeo	Resíduos polares		Resíduos apolares	Carga Líquida*	H	μH
	Carregados	Não carregados*				
ocellatina-LB1	5	5	12	1 +	0,396	0,332
	3Lys, 2 Asp	1 His, 1 Ser, 3 Gly				
ocellatina-LB2	5	5	12	1 +	0,353	0,322
	3Lys, 2 Asp	1 His, 1 Ser, 1 Asn, 3 Gly				
ocellatina-F1	6	6	13	2 +	0,353	0,258
	4Lys, 2 Asp	1 His, 1 Ser, 1 Asn, 3 Gly				

H-Hidrofobicidade; μH -Momento hidrofóbico. Calculado em <http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>, acessado em 19/07/2016. *Dependendo do pH do meio, os resíduos de His podem se apresentar parcialmente protonados.

As três sequências primárias apresentam altíssima similaridade, sendo idênticas para os primeiros 22 resíduos dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. As ocellatina-LB2 e F1 apresentam um resíduo de Asn a mais na porção C-terminal (Asn-23) em relação à ocellatina-LB1. A ocellatina-F1 possui outros resíduos extras em relação à ocellatina-LB1, um de Lys e outro de Leu, na porção C-terminal (Asn-23, Lys-24 e Leu-25). O resíduo de lisina a mais na ocellatina-F1 aumenta em uma unidade a carga líquida do peptídeo em relação à dos peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2.

Vários parâmetros estruturais e físico-químicos podem influenciar a potência e o espectro de atividade dos PAMs. Segundo Dathe *et al.* (1996), a hidrofobicidade e o momento hidrofóbico são moduladores eficazes da atividade antibacteriana e da atividade hemolítica, sendo variáveis úteis para modificar a seletividade dos PAMs. A Figura 3.4 (p. 59) apresenta os perfis hidrofóbicos das sequências de aminoácidos dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. Ainda que sutis, as diferenças nas sequências dos peptídeos podem resultar em diferentes propriedades, como o tamanho, a propensão para a estruturação helicoidal, a carga ou cationicidade, a hidrofobicidade e a anfipaticidade. É importante ressaltar que peptídeos com altos graus de homologia se apresentam como modelos muito interessantes para a investigação de aspectos estruturais de alta relevância, que, dependendo da variação na sequência de resíduos de aminoácidos, podem levar a graus de estruturação diferentes para os peptídeos. Por exemplo, estudos previamente realizados com os peptídeos filoseptina-1, -2 e -3 (PS-1, -2, -3) (Resende *et al.*, 2008) indicam que, a despeito da alta homologia entre as três sequências, diferentes efeitos como carga líquida, efeitos de neutralização de dipolo de hélices, bem como interações de *capping* e hidrofóbicas estão associados a diferentes estabilidades dos segmentos helicoidais, que, no caso, seguem a ordem $PS-2 \geq PS-1 > PS-3$. Parâmetros como diferentes cargas líquidas em peptídeos com alta homologia podem levar, em muitos casos, a diferentes graus de afinidades por membranas fosfolipídicas e até a diferentes arranjos topológicos dos peptídeos em superfícies de membranas, como observado para a três filoseptinas relacionadas (Resende *et al.*, 2014).

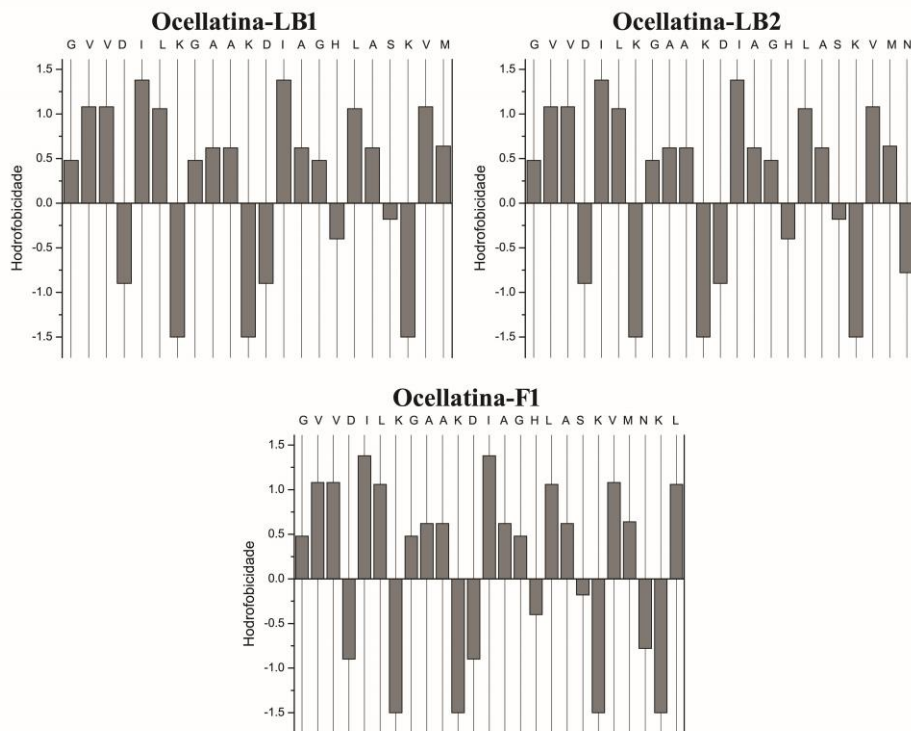


Figura 3.4: Predição da hidrofobicidade dos resíduos de aminoácidos das sequências peptídicas ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. Valores descritos segundo escala de Eisenberg *et al.* (1984).

As três ocellatinas oferecem algumas particularidades bem interessantes, quanto a efeitos de balanceamentos de carga. Por possuírem resíduos com potencial de suportarem cargas negativas e positivas, as características estruturais e topológicas podem ser altamente dependentes do pH do meio, o qual pode oscilar na superfície da membrana. Em particular, as três sequências carregam um resíduo de His na posição 16, sendo que, a pH 7,0, resíduos de His normalmente se apresentam parcialmente carregados, de forma que pequenas variações no pH do meio podem causar importantes modificações estruturais no peptídeo. Na literatura são inclusive relatados exemplos de peptídeos contendo resíduos de histidinas, cujos arranjos topológicos na membrana podem variar significativamente em função do pH do meio. Por exemplo, o peptídeo LAH₄ se alinha paralelamente à superfície de membranas de POPC em meio ácido, entretanto, com o aumento do pH, o peptídeo sofre uma drástica reorientação topológica e adota um alinhamento transmembrana (Bechinger, 1996).

Quando comparada a sequência da ocellatina-F1 com as demais, outro parâmetro interessante que se tem é a presença de um resíduo de lisina (Lys-25) na porção C-terminal, uma vez que a presença de resíduos carregados nas proximidades dessa terminação tende a neutralizar o dipolo resultante de estruturas helicoidais, sendo,

muitas das vezes, observados maiores graus de estruturação (Armstrong & Baldwin, 1993). Outra característica importante associada a esses peptídeos é a existência de uma porção C-terminal naturalmente amidada. Em alguns estudos, a amidação artificial na posição C-terminal de peptídeos com terminações carboxílicas tem levado ao aumento da atividade de peptídeos antimicrobianos (Katayama *et al.*, 2002; Ali *et al.*, 2001), possivelmente devido à neutralização do ânion carboxilato. A remoção da carga negativa na porção C-terminal leva, claramente, a duas consequências e ambas normalmente promovem a atividade antimicrobiana. Primeiramente, a carga negativa resulta na desestabilização de conformações helicoidais, devido a interações repulsivas com o dipolo negativo em C-terminal. Em segundo lugar, a atividade antimicrobiana é intensificada devido ao aumento da carga positiva total da molécula, que promove interações com a superfície com carga negativa da membrana bacteriana (Resende *et al.*, 2008; Mason *et al.*, 2005; Bechinger, 2004; Dathe *et al.*, 1996).

A previsão da estrutura secundária dos três peptídeos investigados neste trabalho indica uma forte propensão desses a assumirem conformações helicoidais. Essa tendência é observada para o peptídeo na presença de alguns co-solventes orgânicos ou quando em contato com bicamadas lipídicas. As simulações preliminares realizadas com as ocellatinas sequenciadas indicam que esses peptídeos podem vir a apresentar certo caráter anfifílico, como demonstrado pelas projeções em hélice apresentadas na Figura 3.5 (p. 61). Considerando apenas o perímetro helicoidal das ocellatinas as duas linhas vermelhas separam as faces hidrofóbicas e hidrofílicas das hélices. Considerando que os resíduos de Lisina-20 e -24 não estejam em porções não estruturadas da hélice, possivelmente se observaria o aumento da face hidrofóbica, representado pelo perímetro entre a linha vermelha e a linha azul na Figura 3.5 (p. 61). Contudo, apenas a determinação da estrutura tridimensional de alta resolução por RMN pode confirmar se todos os resíduos dos peptídeos fazem parte da hélice, conforme representado nas projeções, o que possibilitaria uma avaliação mais quantitativa da real anfipacidade das estruturas.

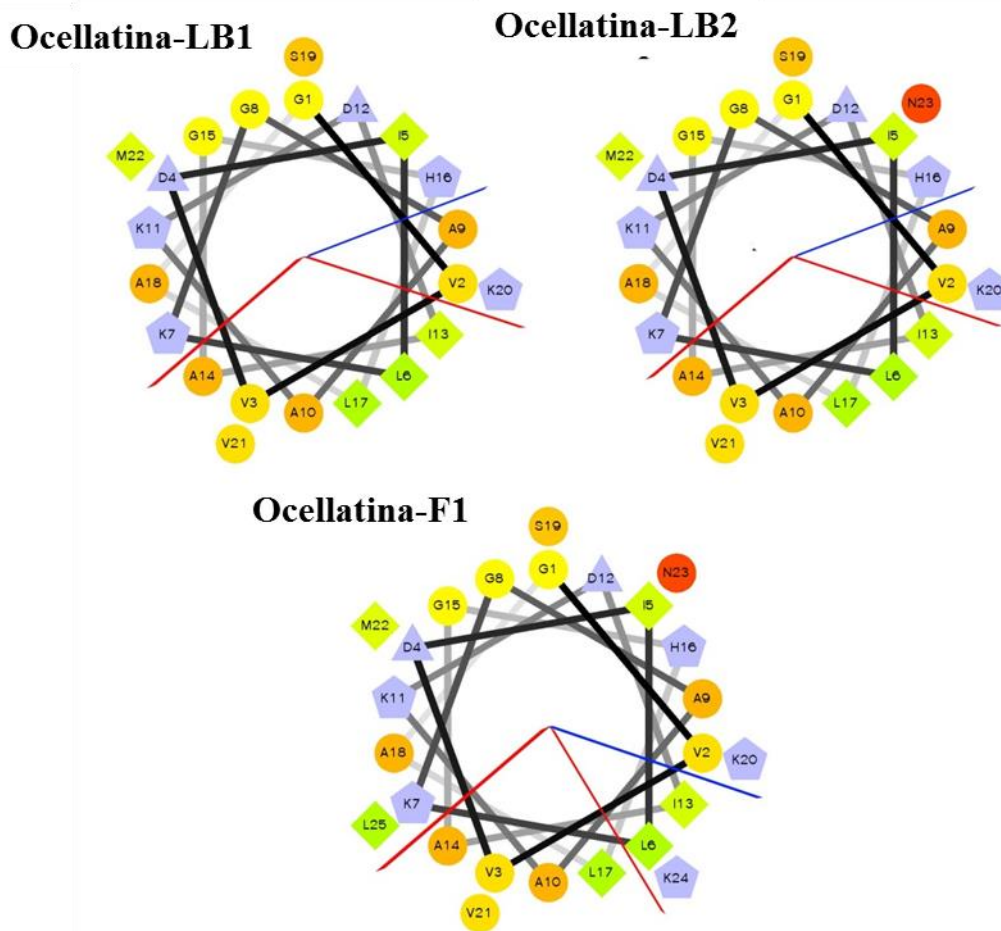


Figura 3.5: Projeções em hélice dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. Os resíduos hidrofílicos e neutros são representados como círculos, resíduos hidrofóbicos como quadrados, resíduos negativamente carregados como triângulos e resíduos positivamente carregados como pentágonos. A hidrofobicidade é codificada por cores: o resíduo apolar mais hidrofóbico é apresentado em verde, e o menos hidrofóbico em amarelo. Os resíduos não carregados mais hidrofílicos são apresentados em vermelho (sem carga). As linhas vermelhas e azul delimitam as faces hidrofóbicas das ocellatinas, considerando o perímetro da hélice. Simulado em <http://r2lab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>, acessado em 07/08/2016.

3.2 Síntese dos peptídeos

A Tabela 3.4 (p. 63 e 64) apresenta as informações das diversas etapas de acoplamento nas sínteses dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1. As sínteses dos peptídeos foram realizadas manualmente em fase sólida (SPFS) pela estratégia Fmoc, empregando-se DIC e HOBt como agentes de acoplamento e nenhuma dificuldade especial foi encontrada. A síntese dos peptídeos ocellatina-LB2 e -F1 foram mais complicadas, tendo sido necessárias reações de reacoplamento, principalmente nas

últimas etapas. Provavelmente as dificuldades nesses acoplamentos são devidas ao maior tamanho da cadeia peptídica ou a algum possível enovelamento da cadeia, que tenha dificultado as reações de acoplamento. Algumas ações foram tomadas para se contornarem possíveis problemas: quando necessário, aumentou-se o tempo de reação até um máximo de 4 horas e/ou aumentou-se o excesso dos reagentes de quatro para até um máximo de oito vezes e/ou adicionou-se TRITON X-100 à mistura reacional, uma vez que o TRITON ajuda a desagregar o peptídeo, diminuindo assim os efeitos de impedimento estérico.

Ao fim das sínteses, os peptídeos foram clivados do suporte sólido e as seguintes massas dos peptídeos brutos foram obtidas após liofilização: $m_{\text{ocellatina-LB1}} = 237,7$ mg; $m_{\text{ocellatina-LB2}} = 198,4$ mg e $m_{\text{ocellatina-F1}} = 187,2$ mg. As massas encontradas correspondem a rendimentos brutos de 94,8 % para a ocellatina-LB1, 79,36 % para a ocellatina-LB2 e de 74,8 % para a ocellatina-F1. Os diferentes rendimentos brutos estão relacionados à quantidade de etapas de reacoplamento realizadas em cada uma das sínteses.

Tabela 3.4: Dados do acompanhamento da síntese dos peptídeos ocellatina-LB1, ocellatina-LB2 e ocellatina-F1

Número	ocellatina-LB1				ocellatina-LB2				ocellatina-F1			
	AA	Excesso reagente	Tempo Reação (h)	Condições de Reacoplamento (tempo/excesso reagentes)	AA	Excesso reagente	Tempo Reação (h)	Condições de Reacoplamento (tempo / excesso reagentes)	AA	Excesso reagente	Tempo reação (h)	Condições de Reacoplamento (tempo / excesso reagentes)
1	M	4	3	-	N	4	3	-	L	4	3	-
2	V	4	2	-	M	4	2	-	K	4	2	-
3	K	4	2	-	V	4	2	-	N	4	2	-
4	S	4	2	-	K	4	2,3	-	M	4	2,3	-
5	A	4	2	-	S	4	2	-	V	4	2	-
6	L	4	2	-	A	4	2	-	K	4	2	-
7	H	4	2	2 / 4	L	4	2	-	S	4	2	-
8	G	4	2	-	H	4	2	-	A	4	2	-
9	A	4	2	-	G	4	2,6	-	L	4	2,6	-
10	I	4	2	-	A	4	2	-	H	4	2	3 / 6
11	D	4	2	-	I	4	1,6	3 / 4	G	4	1,6	3
12	K	4	2	-	D	4	3	3 / 4	A	4	3	-
13	A	4	2	-	K	4	3	3 / 6	I	4	3	3 / 6
14	A	4	2	-	A	4	3	-	D	4	3	-
15	G	4	2	-	A	4	3	-	K	4	3	-
16	K	4	2	-	G	4	3	-	A	4	3	-
17	L	4	2	2 / 4	K	4	3	-	A	4	3	-
18	I	4	2	2 / 4; 3 / 5	L	4	3	-	G	4	3	-
19	D	4	3	-	I	4	4	3 / 7	K	4	3	-

20	V	4	3	3 / 5	D	4	3	3 / 6, TRITON; 3 / 6,TRITON	L	4	3	3 / 7
21	V	5	3	-	V	6	3	-	I	4	3	3 / 6, TRITON; 3 / 6,TRITON; 3 / 7,TRITON
22	G	5	3	-	V	6	3	-	D	6	3	3 / 6, TRITON
23					G	4	3	-	V	6	3	3 / 7, TRITON
24									V	7	3	3 / 7, TRITON
25									G	7	3	3 / 7, TRITON

AA – resíduo de aminoácido a ser acoplado; Tempo de reação – tempo, em horas, da reação de acoplamento (primeira tentativa); Condições de Reacoplamento – Condições utilizadas para reacoplamentos, tempo de reação, em horas / excesso de reagentes (ativadores e resíduos de AA); TRITON – adição de duas a três gotas do detergente Titon X-100 à mistura reacional.

Após a clivagem os peptídeos foram liofilizados e em seguida purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em todas as purificações, o pico mais intenso nos respectivos cromatogramas correspondeu ao peptídeo de interesse, o que indica a eficiência do processo de síntese. Os perfis dos cromatogramas obtidos indicaram que o peptídeo ocellatina-LB1 foi obtido com maior grau de pureza, enquanto que os cromatogramas dos peptídeos ocellatina-LB2 e -F1 apresentaram alguns picos com intensidade significativa, atribuídos a impurezas como ilustrado na Figura 3.6 que apresenta o perfil de purificação do peptídeo Ocellatina-F1. As contaminações são resultados de cadeias incompletas dos peptídeos de interesse e, como as ocellatina-LB2 e -F1 necessitaram de mais etapas de reacoplamento, alguns resíduos podem não ter sido acoplados com eficiência à cadeia polipeptídica.

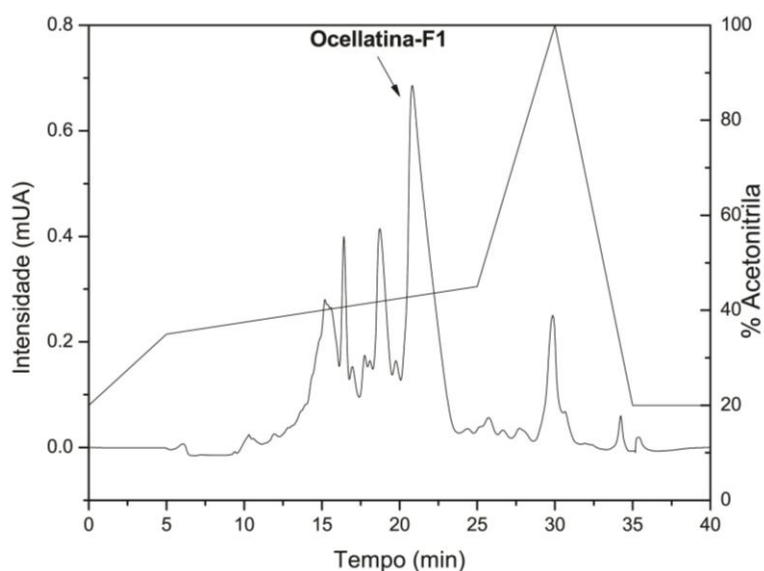


Figura 3.6: Perfil de CLAE do produto bruto da síntese da ocellatina-F1. Amostra injetada (5mL de uma solução a 1 mg.mL^{-1}) em coluna C18 Vydac (250 X 4,6 mm) equilibrada com TFA a 0,1 %. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1 % em um fluxo de 2 mL.min^{-1} . A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorbância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214 \text{ nm}$.

Após as purificações, as frações relacionadas aos peptídeos de interesse foram coletadas, liofilizadas e caracterizadas por espectrometria de massas (EM). Na Figura 3.7 (p. 66) são apresentados os cromatogramas dos peptídeos purificados, bem como os respectivos espectros de massas, que confirmaram a pureza e as identidades dos produtos a partir das massas monoisotópicas em m/z de 2191,01, 2305,128 e 2546,198, para as ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1, respectivamente.

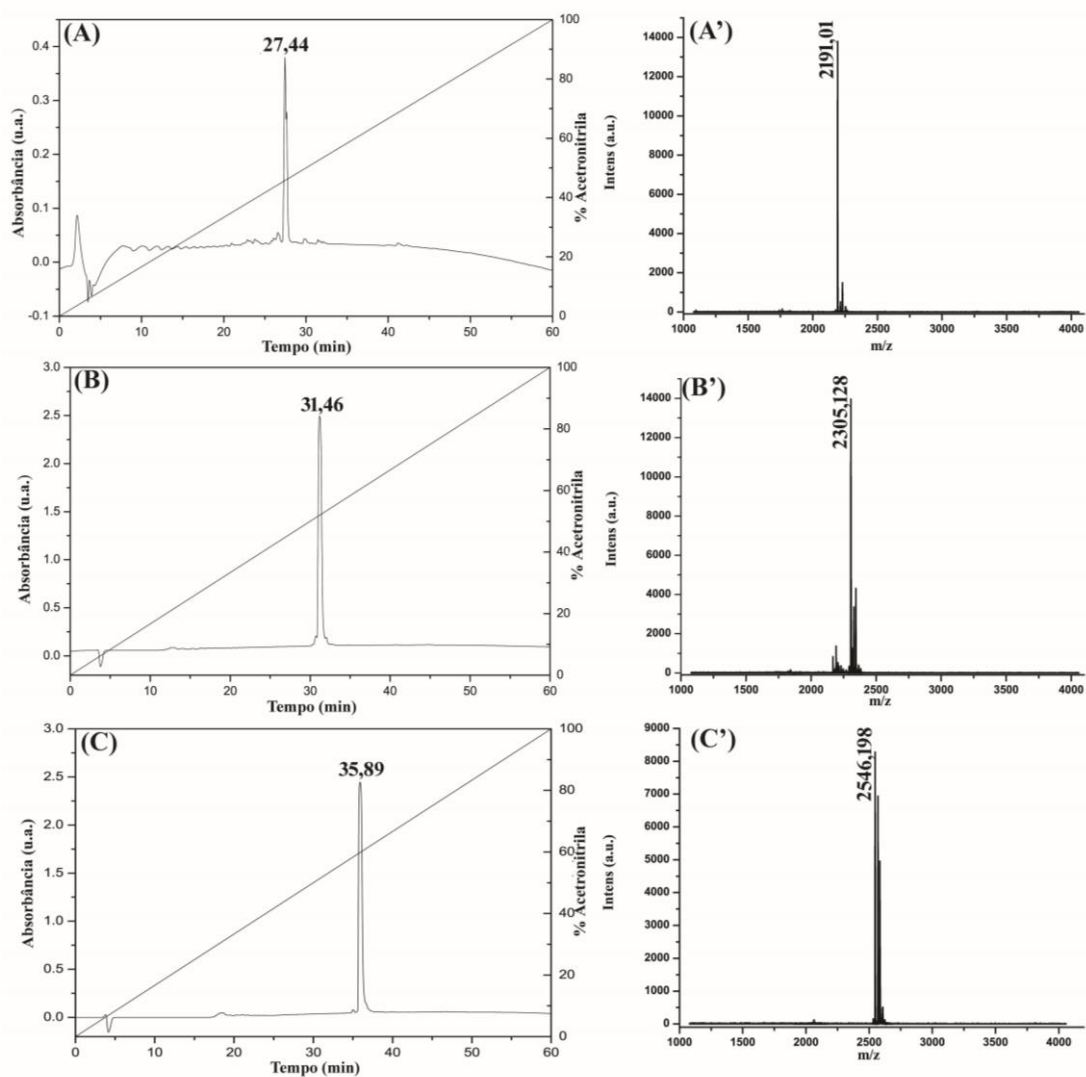


Figura 3.7: Perfis de CLAE das amostras purificadas das sínteses dos peptídeos (A) ocellatina-LB1, (B) ocellatina-LB2 e (C) ocellatina-F1. Amostras injetadas ($200 \mu\text{L}$ de uma solução a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em coluna C18 Vydac ($250 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) equilibrada com TFA a $0,1\%$. Eluição: solução de acetonitrila/TFA $0,1\%$ em um fluxo de $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorvância foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 214 \text{ nm}$. Os Espectros de Massas (EM-MALDI-ToF) das amostras purificadas são apresentados em painéis ao lado dos respectivos cromatogramas: (A') ocellatina-LB1, (B') ocellatina-LB2 e (C') ocellatina-F1.

3.3 Testes biológicos

3.3.1 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 foram testadas contra cepas de bactérias *Gram*-positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sanguinis* e de bactérias *Gram*-negativas *Escherichia coli* e

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, além de cepas do fungo *Candida albicans* e *Candida lusitaniae*. Os valores de concentração inibitória mínima encontrados para os testes são apresentados na Tabela 3.5 abaixo, todos os dados estão expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tabela 3.5: Concentração Inibitória mínima (CIM), μM

	Classificação	ocellatina -LB1	ocellatina -LB2	ocellatina -F1	Controle*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Gram-negativa / Anaeróbico	222,37	210,04	24,84	125,0
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negativa / Aeróbico	114,04	NA	397,45	125,0
<i>Stafilococcus aureus</i>	Gram-positiva / Aeróbico	NA	NA	109,91	31,0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Gram-positiva / Anaeróbico	NA	NA	NA	62,5
<i>Candida albicans</i>	Fungo- Levedura	233,55	NA	NA	NT
<i>Candida lusitaniae</i>	Fungo- Levedura	233,55	NA	50,25	NT

***Controle** : Acetato de clorexidina. NA: Não ativo. NT: Não testado.

Dos três peptídeos apenas a ocellatina-LB1 mostrou-se ativa contra o fungo *Candida albicans*, contudo a CIM foi a mais alta testada ($233,55 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Para Ocellatina-LB2 e -F1 não houve inibição do crescimento do fungo nas concentrações testadas. Quanto aos testes com o fungo *Candida lusitaniae* observa-se que o peptídeo ocellatina-F1 apresenta atividade inibitória mais pronunciada ($50,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto a ocellatina-LB1 mostrou-se ativa apenas na maior concentração incubada ($233,55 \mu\text{mol.L}^{-1}$), e a ocellatina-LB2, novamente, não foi capaz de inibir o crescimento do fungo nas concentrações testadas.

Quanto aos testes contra as bactérias *Gram*-positivas, o peptídeo ocellatina-F1 o único que apresentou atividade antimicrobiana, foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* com CIM de $109,91 \mu\text{M}$, porém não se mostrou ativo contra as cepas de *Streptococcus sanguinis*. PAMs como a DD K (Verly, 2010) e LyeTx I (Santos *et al.*, 2010), apresentam CIM da ordem de $11,6 \mu\text{M}$ e $3,79 \mu\text{M}$, respectivamente, valores menores que o encontrado para a ocellatina-F1.

Os testes contra bactérias *Gram*-negativas mostraram que os três peptídeos apresentam, em algum grau, potencial antimicrobiano. Sendo que ocellatina-LB1 e -F1

foram ativas contra as duas bactérias testadas (*A. actinomycetemcomitans* e *E. coli*), enquanto ocellatina-LB2 foi ativa apenas contra as cepas de *A. actinomycetemcomitans*. Os valores de CIM para as cepas de bactéria *A. actinomycetemcomitans* foram 222,37, 210,04 e 24,84 μM , para ocellatina-LB1, -LB2 e -F1, respectivamente. Quando comparados os valores CIM dos peptídeos, observa-se que a ocellatina-F1 possui atividade em concentração significativamente menor (CIM 125,0 μM), enquanto os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2 são menos ativos e apresentam valores de CIM equivalentes entre si. Os peptídeos ocellatina-LB1 e -F1 mostraram-se ativos também contra as cepas de *E. coli*, com CIM de 114,04 e 397,45 μM , respectivamente.

Reunindo-se todas as informações, identifica-se que a ocellatina-F1 é mais eficaz como antibiótico e apresenta perfil de atividade mais amplo, sendo ativo contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, enquanto os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2 são capazes de inibir apenas o crescimento de bactérias *Gram*-negativas. O peptídeo ocellatina-LB2 é o composto com menor potencial antimicrobiano, sendo ativo apenas contra uma das bactérias testadas. É comum que diferenças no perfil e na potência das atividades antimicrobianas estejam relacionadas à carga, à anfipaticidade e à estruturação dos mesmos (Guo *et al.*, 2013).

Assim como as ocellatinas estudadas nesse trabalho, outros PAMs também apresentam um perfil de atividade mais restrito, como a ocellatina-L1 (anteriormente conhecido como laticeptina) e a leptoglicina (Sousa *et al.*, 2009), dois PAMs extraídos das secreções da pele de anuros (*Leptodactylus laticeps* e *Leptodactylus pentadactylus*, respectivamente), que apresentam perfis de atividade similares aos da ocellatina-LB1 e -LB2, sendo ativos apenas contra cepas de bactérias *Gram*-negativas, com uma CIM da ordem de 40 μM e 50 μM para *E. coli*, respectivamente. Segundo Rollins-Smith e colaboradores (2005), a presença em quantidades elevadas de alguns peptídeos nas secreções da pele dos anuros pode compensar a atividade antimicrobiana relativamente baixa, uma vez que sua concentração pode exceder o valor de CIM de muitos patógenos para o qual o animal pode ser exposto na natureza.

Embora as três ocellatinas apresentem atividades relativamente menores quando comparado com outros peptídeos antimicrobianos, tais como DD K e LyeTx-I, elas podem ser importante para o sistema de defesa do hospedeiro (Santos *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 1999), uma vez que a triagem clássica de peptídeos antimicrobianos é geralmente realizada sobre cepas bacterianas patogênicas para os seres humanos em busca de novos antibióticos. Mas, na realidade, a síntese e liberação de peptídeos

antimicrobianos em pele de rã dependem de fatores ambientais e espécie-específicos (Sousa *et al.*, 2009) e poucos estudos têm sido realizados sobre cepas de bactérias que ocorrem naturalmente no ambiente, tais como as que estão presentes na pele de anfíbios. Ao contrário da *C. albicans*, *C. lusitaniae* é um agente patogénico relativamente raro (Marr *et al.*, 2000) originalmente isolada a partir do trato gastrointestinal de espécies de animais de sangue quente (Merz, 1984), o que sugere que ocellatina-F1 pode ser importante para o sistema imune inato do animal em seu habitat natural.

3.3.2 Hemólise

O padrão ideal para um PAM é que esse possua uma alta atividade antimicrobiana e baixa toxicidade em células de mamíferos, ou seja, um espectro de atividades seletivo. Esse conjunto de características ainda representa um grande desafio, uma vez que, os locais de ação em relação a ambas as células, bacterianas e de mamífero, são, em muitos dos casos, as membranas lipídicas. Como os peptídeos estudados se mostraram ativos contra bactérias, avaliou-se o efeito citotóxico desses em células de mamíferos. Para tal, os peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 foram testados quanto a suas atividades hemolíticas em eritrócitos de coelho, que são constituídos essencialmente por fosfolipídios zwitteriônicos, 50 % de PC (fosfatidilcolina) e 50 % de SM (Esfingomiéline) (Blondelle *et al.*, 1999). Os três peptídeos apresentaram fraca atividade hemolítica (menos de 15 % na concentração mais alta testada $-1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo os valores cerca de 6 % para ocellatina-LB1, 1 % para a ocellatina-LB2 e 12 % para ocellatina-F1, nas concentrações de $0,46 \mu\text{M}$, $0,50 \mu\text{M}$ e $0,40 \mu\text{M}$, respectivamente. A Figura 3.8 (p. 70) apresenta o gráfico que ilustra a atividade hemolítica dos três peptídeos.

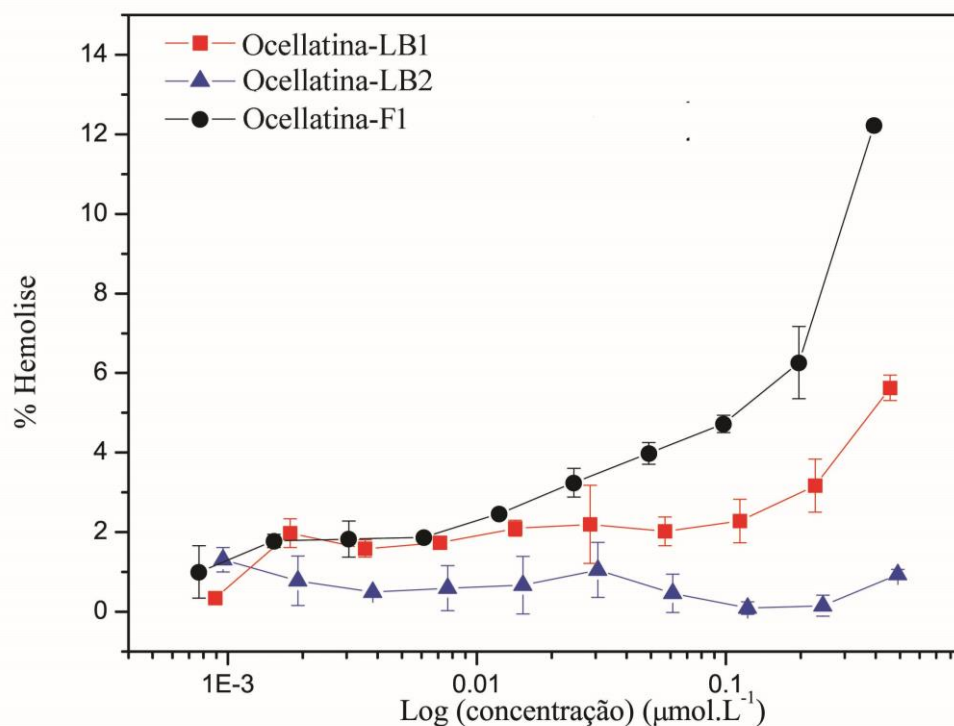


Figura 3.8: Atividade hemolítica das ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 em eritrócitos de coelhos. Maior concentração testada de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e máximos de hemólise de 6 % para a ocellatina-LB1 (vermelho), 1 % para a ocellatina-LB2 (azul) e de 12 % para a ocellatina-F1 (preto).

O parâmetro para se avaliar a toxicidade é a dose efetiva, ED_{50} , que representa a dose que produz a lise de 50 % das hemácias. Por exemplo, o PAM LyeTx I apresenta ED_{50} de $0,13 \mu\text{M}$ (Santos *et al.*, 2010), enquanto que somente doses cerca de três e quatro vezes mais elevadas ($0,46 \mu\text{M}$, $0,50 \mu\text{M}$ e $0,40 \mu\text{M}$) de ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 promovem a lise de apenas 6 %, 1 % e 12 %, respectivamente. Dessa forma, os resultados sugerem que os peptídeos podem ser seletivos para células de patógenos. Entretanto, testes de hemólise com concentrações mais elevadas deveriam ter sido realizados, para obter um parâmetro mais adequado para comparação com os testes antimicrobianos e, possivelmente, confirmar uma correlação direta entre índices de hemólise e as atividades antimicrobianas, *i.e.*, ocellatina-F1 > ocellatina-LB1 > ocellatina-LB2.

3.4 Espectroscopia de Dicroísmo circular

Vários meios foram utilizados nos experimentos de CD para simular os efeitos de ambientes de membranas. Co-solventes orgânicos induzem uma constante dielétrica reduzida no meio, mimetizando o ambiente hidrofóbico da membrana, ao passo que os detergentes levam à formação de estruturas micelares, que mimetizam o caráter anfifílico da membrana. Neste estudo foram utilizados micelas de DPC e SDS, que apresentam concentrações micelares críticas (CMC) de 1,5 e 2,2 mM (Lukas Tamm, 2005), respectivamente. Os lipossomas apresentam uma estrutura de bicamada e, além disso, apresentam uma curvatura bem menos acentuada do que estruturas micelares, sendo então meios miméticos de membranas mais acurados (Bechinger *et al.*, 2011). Neste estudo foram utilizados lipossomas zwitteriônicos de POPC e lipossomas mistos de POPC:POPG (3:1).

A seguir são apresentados os espectros de CD obtidos para amostras da ocellatina-LB1 (Figura. 3.9a, b, c, d, e, p. 72), ocellatina-LB2 (Figura 3.10a, b, c, d, e, p. 73) e ocellatina-F1 (Figura 3.11a, b, c, d, e, p. 74) em diferentes meios biomiméticos.

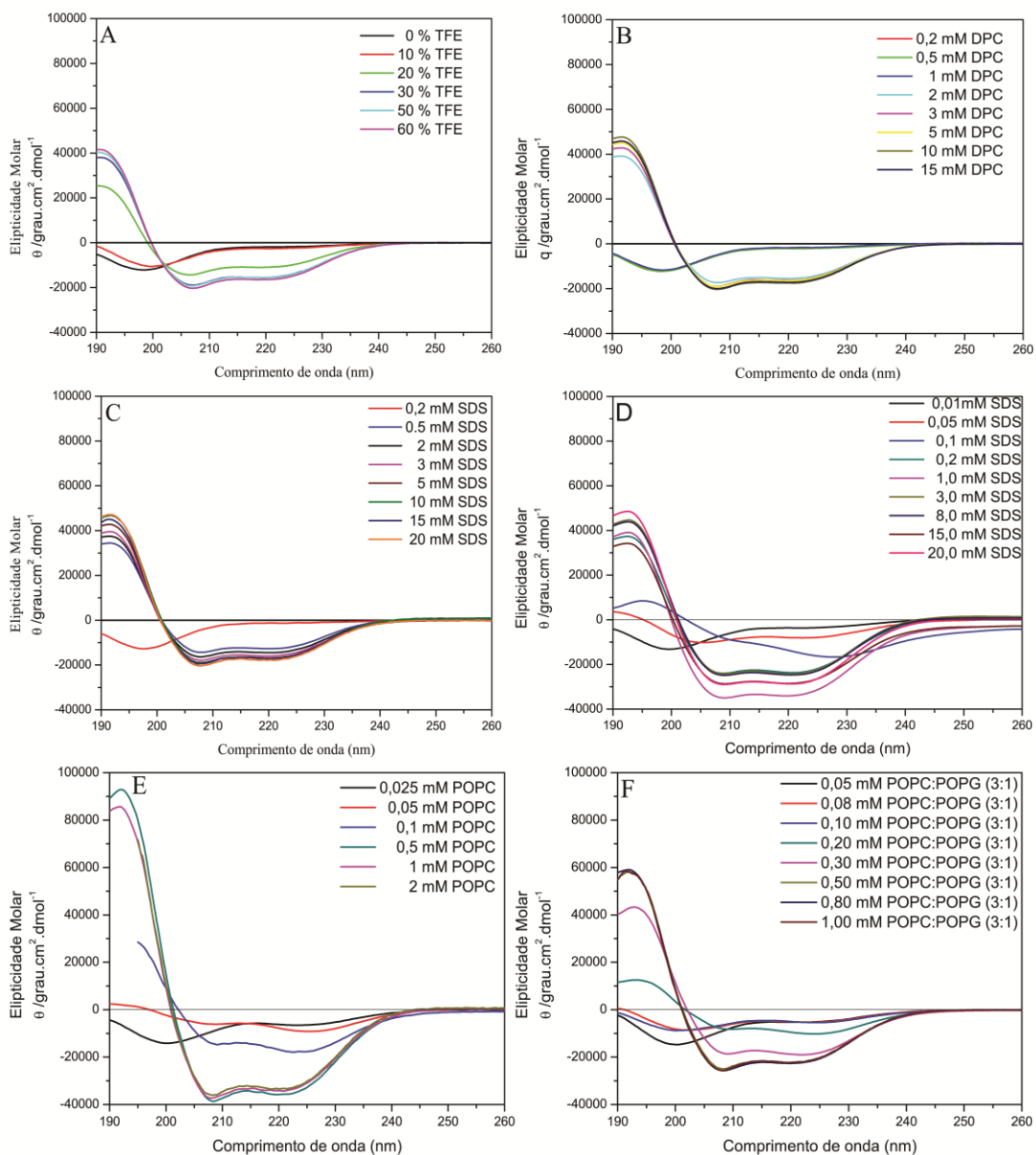


Figura 3.9: Espectros de CD da ocellatina-LB1 em (A) diferentes proporções de TFE/H₂O, (B) na presença de micelas de DPC, (C) SDS a 20 °C, (D) SDS a 30 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (E) POPC e de (F) POPC:POPG (3:1).

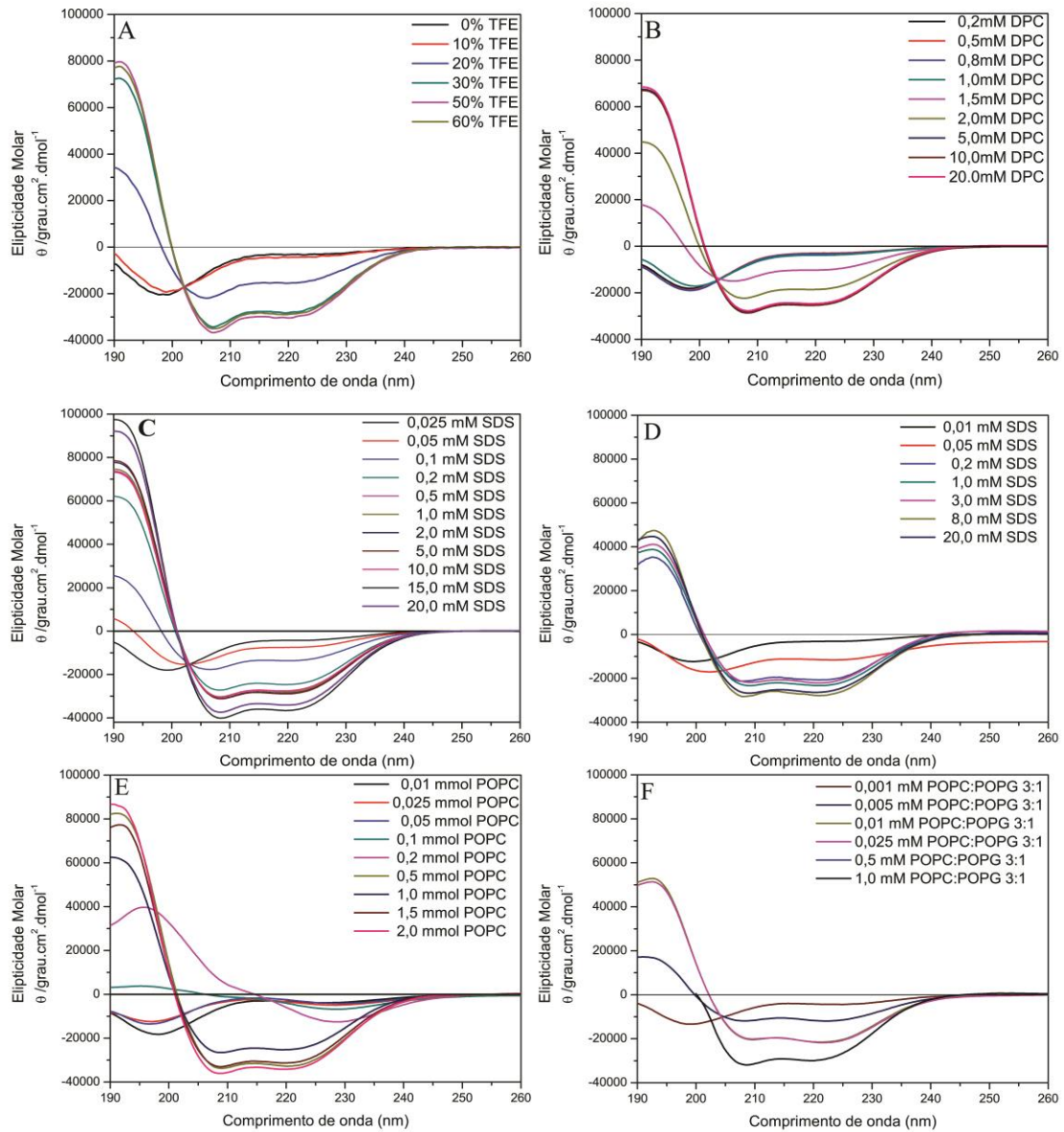


Figura 3.10: Espectros de CD da ocellatina-LB2 em (A) diferentes proporções de TFE/H₂O, na presença de micelas de (B) DPC, (C) SDS a 20 °C, (d) SDS a 30 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (E) POPC e de (F) POPC:POPG (3:1).

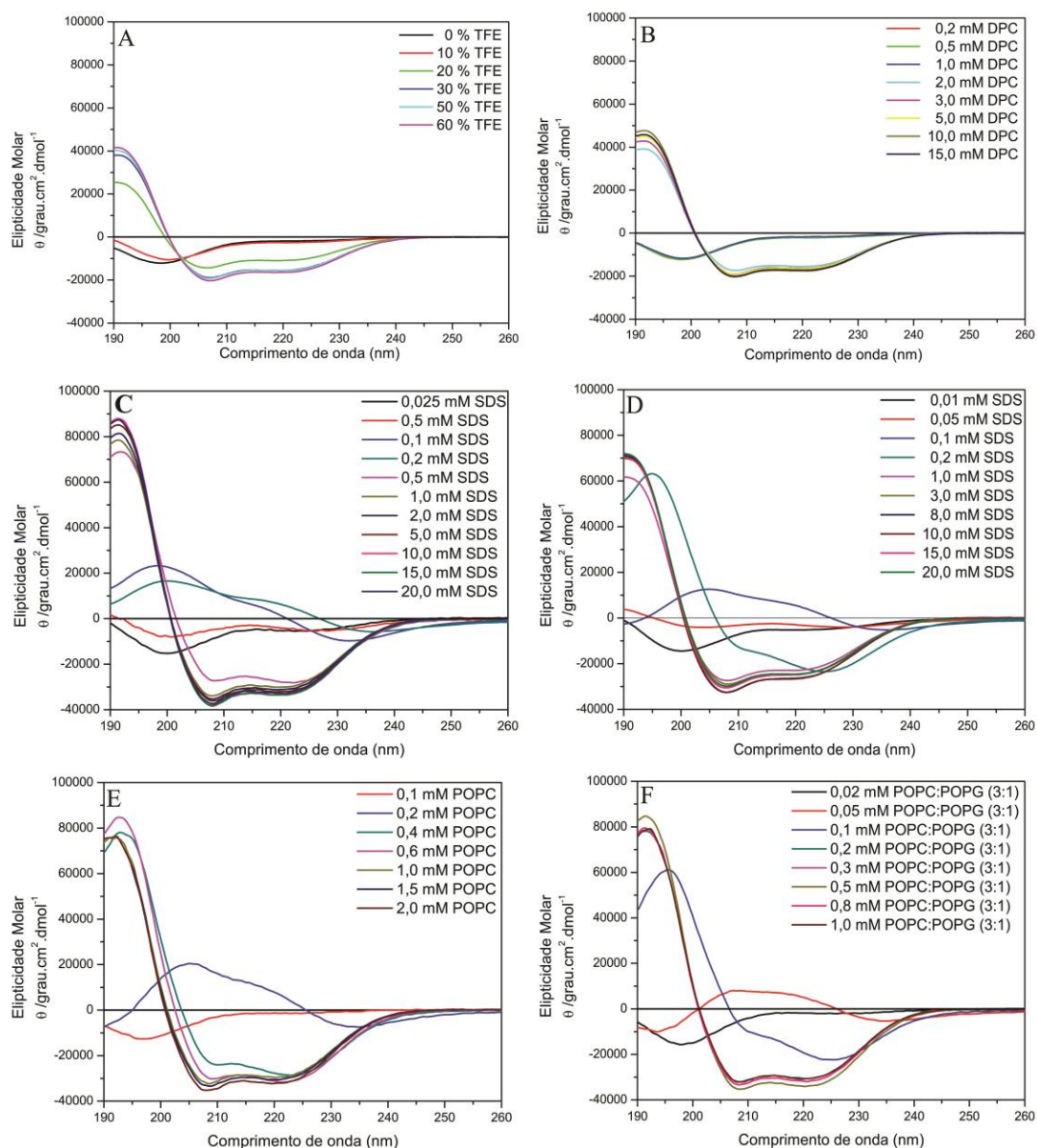


Figura 3.11: Espectros de CD da ocellatina-F1 em (a) diferentes proporções de TFE/H₂O, na presença de micelas de (b) DPC, (c) SDS a 20 °C, (d) SDS a 50 °C e na presença de vesículas grandes unilamelares de (e) POPC e de (f) POPC:POPG (3:1).

O TFE é um co-solvente orgânico que, utilizado em certas proporções com a água, mimetiza o ambiente da membrana e, em muitos casos, estabiliza motivos de estrutura secundária, no caso de seqüências que têm propensão a estruturação (Buck, 1998). Para os peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1, os espectros obtidos em solução aquosa apresentam perfis típicos de peptídeos não estruturados, sendo observado, nos três casos, um mínimo característico em 198 nm (Figuras 3.9a, 3.10a e 3.11a, p. 72-74). A 10 % de TFE pode ser observado, para cada peptídeo, um pequeno deslocamento desse mínimo para comprimentos de onda (λ) maiores, bem como uma diminuição da sua intensidade, entretanto o perfil do espectro ainda corresponde ao de peptídeos sem

estruturação bem definida. Já, a partir de 20 % de TFE, observam-se dois mínimos bem definidos próximos a 208 e 222 nm, indicando que o peptídeo adquire certo grau de estruturação α -helicoidal. Concomitantemente ao aumento da proporção de TFE, observa-se a intensificação dos respectivos mínimos, bem como a definição e a intensificação de um máximo próximo a 193 nm, também característico de padrão helicoidal, sendo então confirmada a existência de motivos helicoidais bem definidos e de maiores extensões para os três os peptídeos na presença de maiores proporções de TFE (Fig. 3.9a, 3.10a e 3.11a, p. 72-74). Este comportamento é típico de peptídeos antimicrobianos, que normalmente não apresentam preferência conformacional em água, mas conformações bem definidas são adquiridas em contato com a superfície da membrana (Bechinger e Lohner, 2006; Strandberg & Ulrich, 2004; Bechinger, 1999). Ao se compararem os espectros dos três peptídeos em soluções contendo 60 % de TFE, percebe-se que os mínimos e máximos característicos são mais intensos no espectro obtido para a ocellatina-LB2, o que sugere a presença de um maior teor helicoidal para esse peptídeo, em comparação com os outros dois, nesta condição. Para os três peptídeos estudados em misturas de TFE/água observou-se uma transição direta entre as duas estruturas, randômica e α -hélice, com um ponto isodicroico próximo a 202 nm.

A dodecilsulfocolina (DPC) é um surfactante zwitteriônico que, acima de uma determinada concentração (concentração micelar crítica - cmc) se agrupa em um arranjo na forma micelar, que mimetiza a interface anfifílica das membranas (Bechinger *et al.*, 2011). Os espectros obtidos para a ocellatina-LB1 (Fig. 3.9b, p. 72) mostram que, a baixas concentrações do detergente (até 1 mM), não se observa significativa estruturação, entretanto, a partir de 2 mM, observa-se um espectro com o perfil de estruturação em α -hélice. As bandas negativas se intensificaram com o aumento da concentração do detergente, até não mostrarem significativas variações para valores maiores que 5 mM, o que sugere a existência de ordenamento helicoidal máximo já nas proximidades dessa concentração de detergente. Os espectros obtidos para a ocellatina-LB2 e -F1 (Fig 3.10b e 3.11b, p. 73 e 74) mostram que esses peptídeos também não se estruturam em baixas concentrações de detergente (até 1 mM), mas a 1,5 mM de DPC o perfil do espectro muda e apresenta dois mínimos em 206 e 220 nm, caracterizando que os peptídeos começa a adotar uma conformação menos flexível. Em concentrações a partir de 5 mM de DPC para a ocellatina-LB2 e 3 mM de DPC para a ocellatina-F1, o peptídeos apresentam significativa estruturação em α -hélice, sendo que o conteúdo helicoidal não varia significativamente para concentrações acima desses patamares.

Assim como observado nos resultados obtidos em misturas de TFE/água os espectros obtidos na presença de micelas de DPC indicam uma transição direta entre as duas estruturas, randômica e α -hélice, com um ponto isodicroico próximo a 202 nm.

O surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) também foi utilizado para analisar as preferências conformacionais dos peptídeos. Como os experimentos de RMN na presença de micelas de SDS, para as três ocellatinas, foram realizados em temperaturas maiores que 20 °C, os experimentos de CD na presença de micelas de SDS foram obtidos a 20 °C e em uma outra temperatura maior, a fim de se comparar os resultados com os dados de RMN. Assim, foram obtidos espectros de CD em duas temperaturas diferentes: 20 °C e 30 °C para as ocellatinas-LB1 e -LB2 (3.9c, d e 3.10c, d, p. 72 e 73); 20 °C e 50 °C para a ocellatina-F1 (3.11c, d, p. 74). Assim, os perfis de estruturação obtidos podem ser comparados com as estruturas obtidas por meio dos dados de RMN, conforme será discutido posteriormente. Para os experimentos a 20 °C, mesmo a baixas concentrações do detergente, *i.e.*, a partir de 0,5 mM para ocellatina-LB1 e -F1 e 0,2 mM para ocellatina-LB2, os espectros apresentam perfis condizentes com o de uma estrutura α -helicoidal (Figura 3.9c, 3.10c e 3.11b, p. 72-74). Com o aumento da concentração de SDS, tem-se caracterizado o aumento no conteúdo helicoidal dos peptídeos, o que é confirmado pela intensificação dos mínimos próximos a 208 e 222 nm e do máximo próximo a 193 nm, que são condizentes com o perfil de estruturas em α -hélice. Para a ocellatina-LB2 o perfil não estruturado aparece apenas em concentrações muito baixas de detergente (0,025 mM), sendo que os espectros a concentrações 0,05 mM e 0,1 mM há deslocamento do mínimo para λ maiores, bem como a definição e a intensificação de um máximo próximo a 193 nm, também característico de padrão helicoidal, sendo então confirmada a transição de um espectro com perfil não estruturado para espectro característico de padrão helicoidal. Para a ocellatina-F1 o perfil não estruturado também aparece apenas em concentrações muito baixas de detergente (0,025 mM a 20 °C e 0,01 mM a 50 °C), com o aumento da concentração micelar, os espectros de CD não apresentaram um ponto isodicroico, sugerindo a presença de outras estruturas no meio além da α -hélice. Enquanto, para as ocellatinas-LB1 e -LB2 a presença de um ponto isodicroico próximo a 202 nm, indica uma transição direta entre estruturas estendidas e α -helicoidais.

Os perfis dos espectros para os experimentos a temperatura maior não diferem de forma significativa dos espectros obtidos a 20 °C. Para a ocellatina-LB1 (Fig. 3.9d, p. 72), observa-se que o perfil não estruturado aparece em uma concentração mais baixa de

SDS (0,01 mM) e percebe-se que os mínimos característicos são mais intensos nos espectros obtidos a 20 °C, o que sugere a presença de um maior teor helicoidal para esse peptídeo a 30 °C. Para a ocellatina-LB2 (Fig. 3.10d, p. 73), assim com a 20 °C, a 0,2 mM SDS o peptídeo apresenta espectro com perfil característico de padrão helicoidal, contudo observa-se que para as concentrações de SDS mais elevadas há uma diminuição da intensidade dos mínimos e máximos característicos, em comparação aos espectros obtidos a 20 °C, o que indica um menor teor helicoidal para esse peptídeo a 30 °C. Os espectros obtidos nessa condição experimental não apresentaram um ponto isodicroico, sugerindo a presença de outras estruturas no meio além da α -hélice. Nos espectros do peptídeo ocellatina-F1 (Fig. 3.11d, p. 74) que mostram que, a 50 °C, em concentrações intermediárias a 0,01 mM e 1,0 mM os espectros apresentam, como nos experimentos a 20 °C, perfis que sugerem a presença de duas populações, uma estendida e outra α -helicoidal. Novamente, percebe-se uma leve diminuição da intensidade dos mínimos e máximos característicos, em comparação aos espectros obtidos a 20 °C.

Na presença de vesículas fosfolipídicas de POPC, ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 apresentaram elevados índices de helicidade (Fig. 3.9e, Fig. 3.10e, Fig. 3.11e, p. 72-74). Para a ocellatina-LB1, em de 0,05 mM de fosfolipídios, o peptídeo já apresenta um pequeno grau de estruturação, enquanto que a ocellatina-LB2 a partir de 0,5 mM e a ocellatina-F1 a partir de 0,4 mM de lipídios apresentam perfis de estruturação. Para os três peptídeos observa-se que, com o aumento da concentração de POPC, há aumento no conteúdo helicoidal. O fato dos espectros, obtidos nessa condição experimental, não apresentarem um ponto, sugere que a transição estrutural entre conformações estendidas e α -hélicoidais não ocorre de forma direta, mas sim com a presença de outras estruturas no meio. O que fica claro nos espectros das ocellatina-LB2 e -F1, a 0,2 mM, que apresentam perfis que sugerem a presença de duas populações, uma estendida e outra α -helicoidal, ou uma estrutura transitória entre as duas.

Para a ocellatina-LB1 na presença de vesículas fosfolipídicas de POPC:POPG (3:1) já se observa, a concentrações de lipídios de 0,20 mM, um espectro com perfil helicoidal (Fig. 3.9f, p. 72). À concentração de 0,3 mM é observada uma intensificação dos mínimos, bem como uma boa definição do máximo característico de espectros com perfis de peptídeos helicoidais. A 0,5 mM de lipídeos já é nítida a saturação do teor de hélice, uma vez que o espectro obtido é muito similar aos obtidos em maiores concentrações de lipídios. Para a ocellatina-LB2 (Fig. 3.10f, p. 73) se observa que o perfil não estruturado aparece apenas em concentrações muito baixas de vesículas

(0,001 mM), sendo que os espectros a concentrações 0,005 mM e 0,01 mM já apresentam perfil de espectro com determinada estruturação em α -hélice. Como já observado em outros meios, as ocellatinas não apresentaram um ponto isodicroico nos espectros na presença dos lipossomas mistos, indicando outras estruturas no meio além da α -hélice e estendida. Sendo que, para a ocellatina-F1 (Fig. 3.11f, p. 74) se observa, a 0,05 mM de lipídios, que o espectro não apresenta um perfil característico de peptídeo não estruturado, possivelmente devido à presença de populações estendidas e em α -hélice. A 0,1 mM, o espectro da ocellatina-F1 já começa a mostrar perfil com certo teor de conformação α -helicoidal. A partir 0,2 mM de lipídeo, o conteúdo helicoidal não varia significativamente, uma vez que os espectros obtidos são muito similares.

Quando comparadas as intensidades dos mínimos e máximos característicos de espectros de peptídeos helicoidais, percebe-se, por exemplo, valores significativamente maiores para ocellatina-LB1 e -F1, em módulo, para os espectros na presença de vesícula de POPC:POPG (3:1), relativamente aos valores observados para o peptídeo em solução TFE/H₂O (60:40). Inúmeros exemplos de peptídeos antimicrobianos podem, a despeito de apresentarem elevados conteúdos helicoidais, mostrarem valores de helicidades relativamente baixos em espectros de CD, pois o que se observa é um valor médio de padrão de estrutura entre espécies ligadas à bicamada (normalmente estruturadas) e espécies livres no meio aquoso (normalmente não estruturadas) (Ladokhin *et al.*, 2010; Voievoda *et al.*, 2015). Esse processo, definido como um modelo de partição, já foi investigado por várias aproximações biofísicas, merecendo-se destaque os estudos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), a qual possibilita a determinação da constante de partição do peptídeo entre a bicamada e o meio aquoso, além de outros parâmetros que regem a termodinâmica das interações peptídeo-membrana (Seelig, 1997).

O perfil do espectro obtido para a ocellatina-LB1 na presença de vesículas de POPC:POPG (3:1) (elipticidades molares de aproximadamente 60, -25 e -22 x10³/grau.cm².dmol⁻¹, para comprimentos de onda em aproximadamente 193, 208 e 222 nm, respectivamente), indicam que a ocellatina-LB1 apresenta alta afinidade pela membrana mista, uma vez que a alta helicidade indica que a maior parte do peptídeo está ligada à membrana. Ressalta-se também a importância da utilização de um modelo de membrana mais acurado para estudos deste peptídeo, uma vez que tanto soluções micelares, quanto misturas TFE/H₂O, sugerem teores de hélice inferiores aos observados na presença das vesículas aniônicas. As ocellatina-LB2 e -F1 apresentam o

mesmo comportamento, com uma alta afinidade pelas membranas mistas de POPC:POPG (3:1) (elipticidades molares de aproximadamente $55, -30$ e $-29 \times 10^3/\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ e $80, -32$ e $-31 \times 10^3/\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, para comprimentos de onda em aproximadamente 191, 208 e 222 nm, respectivamente para ocellatina-LB2 e -F1). Quando comparados os espectros das ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1, observa-se que as intensidades dos mínimos e do máximo característicos de espectros de peptídeos helicoidais apresentam valores significativamente maiores, em módulo, para os espectros de ocellatina-F1 na presença de vesícula de POPC:POPG (3:1), indicando uma maior estruturação do peptídeo no meio.

Para se obterem os conteúdos de estrutura helicoidal nos diferentes meios, realizaram-se análises de desconvolução dos espectros, com auxílio do software CDPro (Sreerama & Woody, 2004; Sreerama & Woody, 2000). Os gráficos apresentados na Figura 3.12 (p. 81) sumarizam os conteúdos α -helicoidais calculados a partir dos espectros das ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 nos diferentes meios.

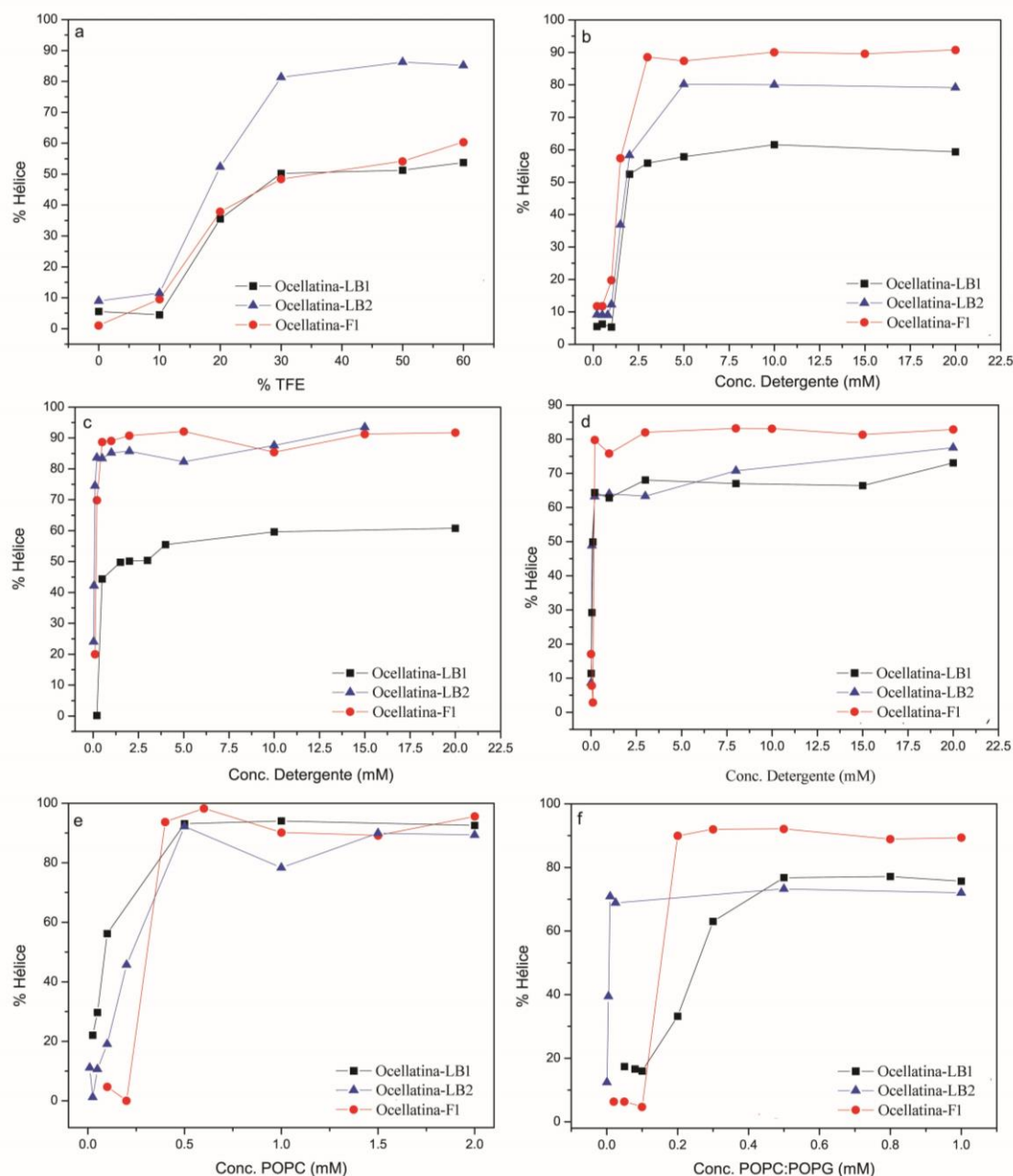


Figura 3.12: Percentuais de conteúdo helicoidal dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 obtidos a partir de dados de espectroscopia de dicroísmo circular para soluções dos peptídeos em (a) diferentes proporções de TFE/H₂O, (b) na presença de micelas de DPC, (c) na presença de micelas de SDS a 20°C, (d) na presença de micelas de SDS a 20°C, (e) na presença de LUVs de POPC e (f) na presença de LUVs de POPC:POPG (3:1).

A variação da concentração de TFE nas soluções contendo ocellatina-LB1,-LB2 e -F1 mostra claramente uma transição sigmoideal da estrutura randômica para estrutura α -helicoidal. Essa transição é iniciada a 10% de TFE, atingindo um limite a 60% de TFE e, alcançando-se um máximo de 53, 85 e 60 % do conteúdo de hélice para ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1, respectivamente (Figura 3.12a).

Os resultados de CD em soluções micelares de DPC (Figura 3.12b, p. 80) mostram que a ocellatina-F1 (90 %) tem uma maior tendência à formação de estrutura α -helicoidal, seguido pela ocellatina-LB2 (80 %) e depois ocellatina-LB1 que apresenta menor teor de estruturação (60 %). Já em soluções contendo SDS (Figura 3.12c, p. 80), à temperatura de 20 °C, ocellatina-LB2 e -F1 apresentam teores helicoidais semelhantes (93 e 92 %, respectivamente) e maiores que a ocellatina-LB1 (60 %). Quando as helicidades na presença de DPC são comparadas aos conteúdos helicoidais na presença de SDS (Figura 3.12c e 3.12d, p. 80) nas duas temperaturas, constata-se que na temperatura maior há uma diminuição nos teores de hélice para os peptídeos ocellatina-LB2 e -F1 (78 e 82 % respectivamente), enquanto um maior teor (73 %) é observado para a ocellatina-LB1.

Os conteúdos de hélice das ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 mostram que os três peptídeos se estruturam tanto em vesículas zwitteriônicas, como em vesículas aniônicas (Fig. 3.12e e f, p. 80). Contudo, nota-se que a ocellatina-F1 alcança o máximo de estruturação em concentrações ligeiramente menores que as ocellatinas-LB1 e -LB2, indicando que a ocellatina-F1 interage de forma mais eficiente com vesículas.

Os dados de CD dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 na presença de vesículas de POPC (Fig. 3.12e, p. 80) mostram que os três peptídeos não diferem em grau de estruturação em α -hélice, com um máximo de aproximadamente 94 % para todos. Os conteúdos helicoidais do peptídeo ocellatina-F1 na presença de vesículas de POPC:POPG (3:1) (Fig. 3.12f, p. 80) mostram que a ocellatina-F1 possui um maior grau de estruturação em α -hélice, em comparação com as ocellatina-LB1 e -LB2 (Figura 3.12f), observando-se máximos de 74, 73 e 90 % de hélice, para ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1, respectivamente. Este comportamento é incomum para peptídeos catiônicos, que normalmente mostram maiores afinidades com as membranas carregadas negativamente (Resende *et al.*, 2014, Oren & Shai, 2000). No entanto, no caso das três ocellatinas estudadas, apesar das cargas positivas líquidas, a presença de dois resíduos de aspartato carregados negativamente, podem modular o processo de ligação à membrana, devido à possibilidade de interações repulsivas entre estes resíduos e os grupos carregados negativamente (cabeça polar) na estrutura do POPG. Isto pode explicar a forte afinidade aparente de ocellatina-LB1 e -LB2 às vesículas zwitteriônicas, no entanto, é necessária a determinação da estrutura tridimensional para confirmar esta hipótese. Outro ponto que reforça esta proposta é que a carga positiva extra de ocellatina-F1 faz com que este peptídeo também apresente uma elevada ordem estrutural na presença de vesículas

aniônicas, possivelmente, por interagir de forma mais eficiente com os grupos carregados negativamente (cabeça polar) da estrutura dos lipídeos, ou por neutralização de um possível efeito repulsivo exercido por um dos resíduos de aspartato.

3.5 Extravasamento marcador químico incorporado em vesículas fosfolipídicas

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica altamente sensível e amplamente utilizada para se estudarem as interações peptídeo-lipídeo e a penetração do peptídeo em membranas. A adição dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 aos sistemas contendo o fluoróforo aumentou o sinal fluorescente causado pelo extravasamento da calceína encapsulada. Esses resultados demonstram que as ocellatinas interagem com os modelos de membrana, desestruturando-os.

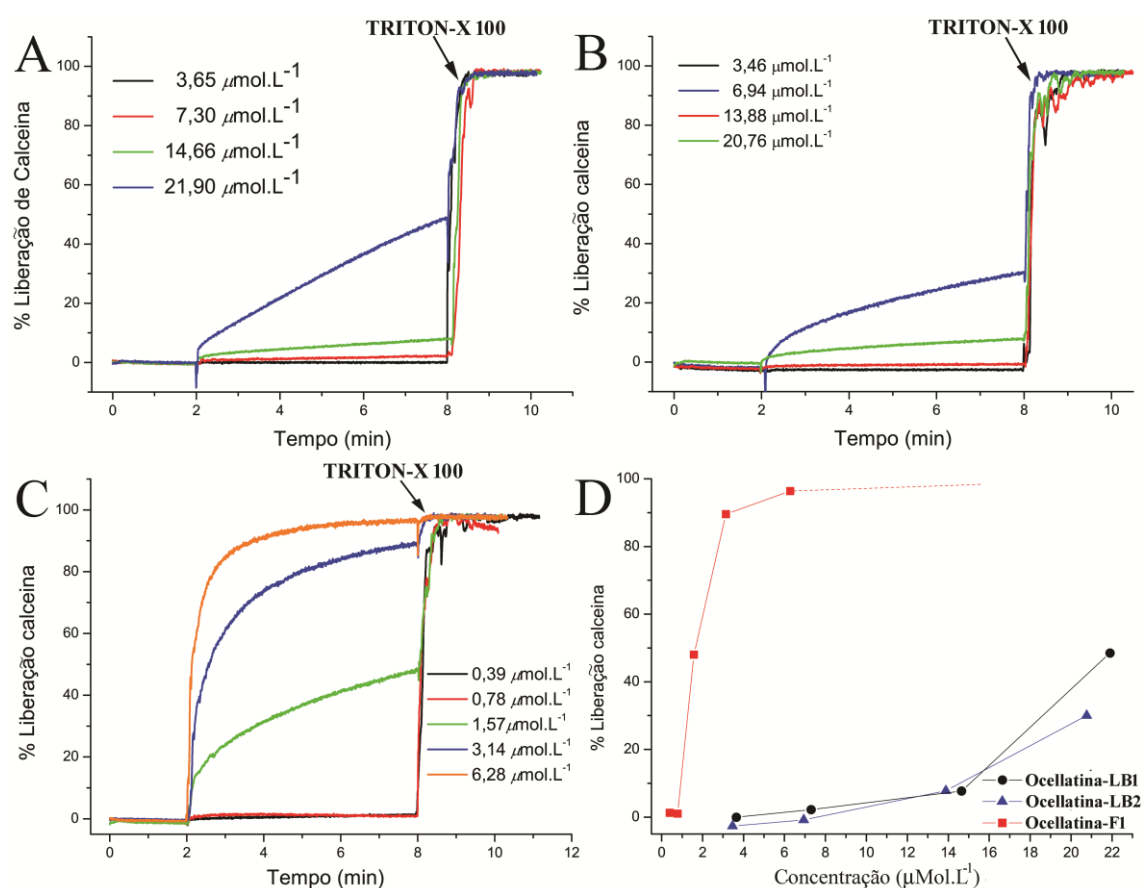


Figura 3.13: Liberação de calceína incorporada em vesículas de POPC, a 37 °C, induzida por diferentes concentrações de (a) ocellatina-LB1, (b) ocellatina-LB2 e (c) ocellatina-F1; (d) variação do percentual de liberação em função das concentrações dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1.

A Figura 3.13 (p. 83) apresenta os teores de calceína liberada após a adição das três ocellatinas ao sistema contendo o fluoróforo. Nos dois primeiros minutos dos experimentos o sinal fluorescente constante evidencia a integridade e estabilidade das vesículas, que somente após a adição dos peptídeos tem sua estrutura desorganizada ocasionando o vazamento do marcador. A maior liberação de calceína ocorre quando o peptídeo ocellatina-F1 é adicionado a LUVs-POPC, enquanto menores percentuais de liberação ocorrem com as adições dos peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2 (Fig. 3.13a, b e c, p. xx). Como pode ser observado na Figura 3.13d (p. 83) para ocellatina-LB1 e -LB2, o máximo de extravasamento alcançado foi de 50 e 30 %, nas concentrações de 21,90 e 20,76 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Já ocellatina-F1 provoca o vazamento de 96 % do corante encapsulado com a concentração de 6,28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Ainda que os estudos de CD mostrem que as três ocellatinas atingem elevados graus de estruturação α -helicoidal na presença de vesículas de POPC, os resultados de extravasamento de calceína indicam diferentes interações entre os peptídeos e as POPC-LUVs. Sendo, o peptídeo ocellatina-F1 capaz de interagir fortemente com POPC-LUVs, com o extravasamento de quase 100% da calceína encapsulada, enquanto os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2 promovem uma menor perturbação na membrana.

Apesar do estudo de liberação de calceína não representar uma investigação cinética durante um longo período de tempo como em outros estudos (Verly *et al.*, 2008), a análise da interação das ocellatinas em uma curta escala tempo permitiu uma avaliação qualitativa da estabilidade da membrana, quando em contato com esses peptídeos. Os resultados indicam que ocellatina-F1 interage fortemente com vesículas de POPC, mesmo a concentrações relativamente baixas, ao passo que a taxa de extravasamento de calceína para os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2, o que indica mecanismos diferentes para as três ocellatinas. A liberação de calceína nas ocellatina-LB1 e -LB2 é, aparentemente, mais dependente da dose de peptídeo, o que possivelmente está relacionado a um processo cooperativo, que mostra a necessidade de um acúmulo dos peptídeos sobre a superfície da membrana, para que o processo de lise ocorra (Takeuchi *et al.*, 2004). Os resultados de cinética de extravasamento de marcador químico sugerem uma interação distinta entre as ocellatinas e as vesículas de POPC. Os mecanismos distintos podem ser mais benéficos para o animal, uma vez que permite a distinção do mecanismo de defesa que seja mais eficaz, contra diferentes agentes patogênicos (Giovannini *et al.*, 1987; Leite *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2008). A ação conjunta desses mecanismos promovidos pela secreção simultânea de diferentes

peptídeos, pode mesmo conduzir a um sistema de defesa mais robusto (Westerhoff *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 2001).

Verly *et al.* (2008) avaliaram a interação do PAM DD K com lipossomas de POPC e perceberam uma dependência linear da liberação de carboxifluoresceína com a razão DD K / POPC, até que um patamar é atingido para maiores razões DD K / PPOC. Santos *et al.* (2010) estudaram a LyeTx-I e também observaram que a liberação de marcador químico de lipossomas de POPC é dependente da concentração do peptídeo. A LyeTx-I mostrou uma cinética de liberação do tipo sigmoide, que começa lentamente, aumenta de modo exponencial durante um determinado período de tempo intermediário e depois se estabiliza. Esse comportamento diferenciado pode influir sobre a forma de ação dos peptídeos, sendo DD K capaz de interagir fortemente com vesículas de POPC, enquanto que a dose dependência de LyeTx-I indica um comportamento cooperativo.

Considerando que as capacidades de formação de poros das três ocellatinas se correlacionam diretamente a suas atividades antimicrobiana e hemolítica, isto é, ocellatina-F1 > ocellatina-LB1 > ocellatina-LB2, tem-se fortes indícios que os resíduos de aminoácidos extras na porção C-terminal são importantes para a promoção de interações peptídeo-membrana mais intensas na ocellatina-F1.

3.6 Determinação das estruturas tridimensionais dos peptídeos por RMN

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta poderosa na investigação de características estruturais de peptídeos ligados a membranas modelo. Por isso, realizou-se os experimentos de RMN dos três peptídeos, na presença de mistura de TFE/H₂O 60:40, bem como na presença de micelas de detergentes aniônicos e zwitteriônicos. Considerando o estudo das três lelpodactinas nos três meios miméticos diferentes, foram obtidos 38 espectros unidimensionais e 63 bidimensionais de RMN.

A obtenção de espectros de RMN de boa qualidade é um resultado muito importante, uma vez que a observação de largura de linha relativamente estreita é, geralmente, uma tarefa bastante difícil para os estudos de RMN de peptídeos na presença de micelas. Geralmente várias condições experimentais, tais como o pH, força iônica, concentração de peptídeo e a temperatura precisam ser investigadas e então otimizadas, para a obtenção de espectros de RMN de alta qualidade para peptídeos

ligados a micelas (Verly *et al.*, 2009; Bechinger *et al.*, 2011). No caso das ocellatinas investigadas neste trabalho, os espectros dos peptídeos na presença de micelas de DPC apresentam largura de linha relativamente estreita nas primeiras condições testadas, isto é, a 20 °C, sem a presença de tampão e de sal. Para os peptídeos na presença de micelas de SDS, larguras de linhas relativamente maiores foram observadas a 20 °C, no entanto, larguras de linha satisfatórias foram alcançadas por meio do aumento da temperatura das amostras.

Na Figura 3.14 (p. 85) são apresentados os espectros de RMN de ^1H parciais da região de ^1H amídicos das ocellatinas em diferentes meios e temperaturas. Como esperado, observa-se larguras de linhas estreitas para os sinais nos espectros dos três peptídeos na presença de soluções TFE- d_2 /H $_2$ O (60:40) a 20 °C, como mostrado para ocellatina-LB1 na Figura 3.14-A. Da mesma forma, foram observadas larguras de linha adequadas nos espectros obtidos para os três peptídeos na presença de micelas DPC- d_{38} a 20 °C, como mostrado para ocellatina-LB2 na Figura 3.14-B. No entanto, ao se comparar com os espectros em soluções de TFE- d_2 /H $_2$ O, observa-se um significativo alargamento das ressonâncias do peptídeo na presença das micelas de SDS- d_{25} . Larguras de linha satisfatórias foram alcançadas com o aumento da temperatura para os experimentos realizados com as amostras de solução micelar de SDS- d_{25} . A temperatura de 30 °C foram obtidas larguras de linha adequadas para a ocellatina-LB1 e -LB2 (Fig. 3.14-C e D), ao passo que linhas muito largas foram obtidas para a ocellatina-F1 nessa temperatura, tendo sido resultado satisfatório obtido apenas a 50 °C (Fig. 3.14-F).

Esses resultados corroboram com os dados de CD e indicam que as três ocellatinas mostram elevadas afinidades por membranas aniônicas, que se caracterizam por uma ligação eficiente. A ocellatina-F1 apresenta interação mais efetiva, o que é caracterizado por linhas de ressonância mais alargadas. Os resultados de extravasamento de calceína também indicam que a ocellatina-F1 interage mais fortemente, causando o extravasamento de quase 100 % do marcador encapsulado, enquanto os peptídeos ocellatina-LB1 e -LB2 promovem menor perturbação na membrana.

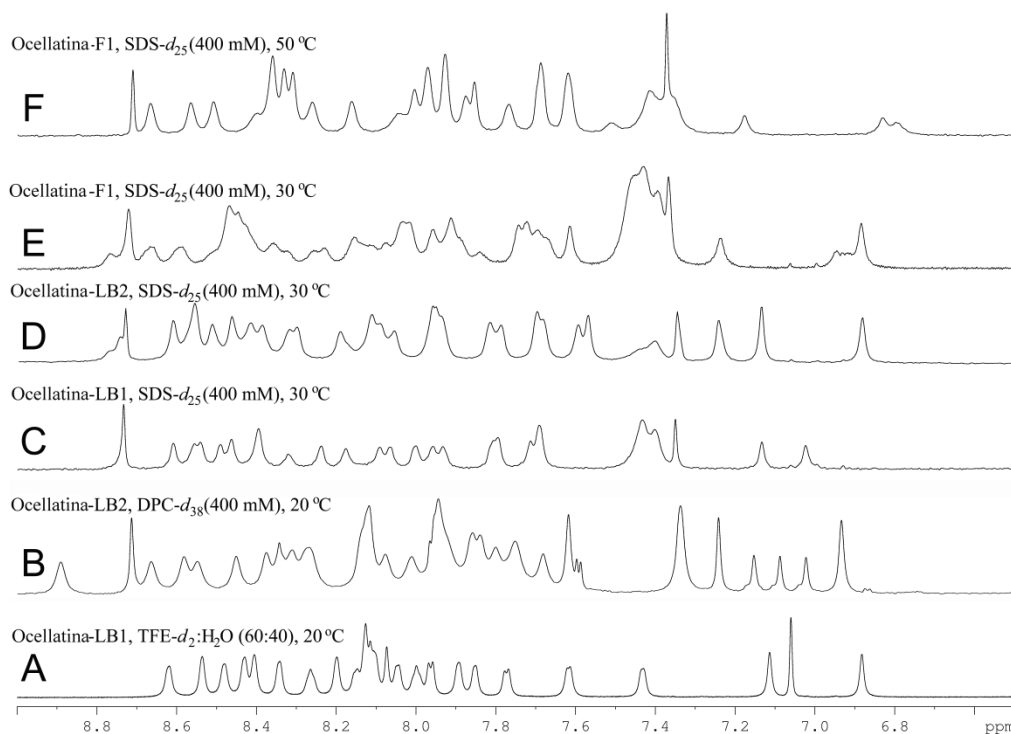


Figura 3.14: Espectros de RMN de ^1H parciais da região de H amídicos das ocellatinas em diferentes meios e temperaturas.

Peptídeos que mostram partição efetiva entre membrana-água geralmente resultam em fracas correlações de NOE, especialmente correlações de longo e médio alcance. O processo de partição também dificulta a obtenção de mapas de contorno TOCSY de boa qualidade, uma vez que o ajuste de fase dos espectros está severamente comprometido pelo processo de equilíbrio.

A atribuição dos sinais de RMN para os espectros 2D, foi realizada pela análise simultânea dos mapas de contornos, empregando-se a metodologia desenvolvida por Kurt Wüthrich (Wüthrich, 1986). Para exemplificar essa estratégia, destacam-se na Figura 3.15 (p. 87) os assinalamentos dos sinais referentes às correlações HN- $\text{H}\alpha$ dos resíduos de Val-3, Asp-4 e Ile-5 para a ocellatina-LB1 em mistura de TFE- d_2 : H_2O (60:40).

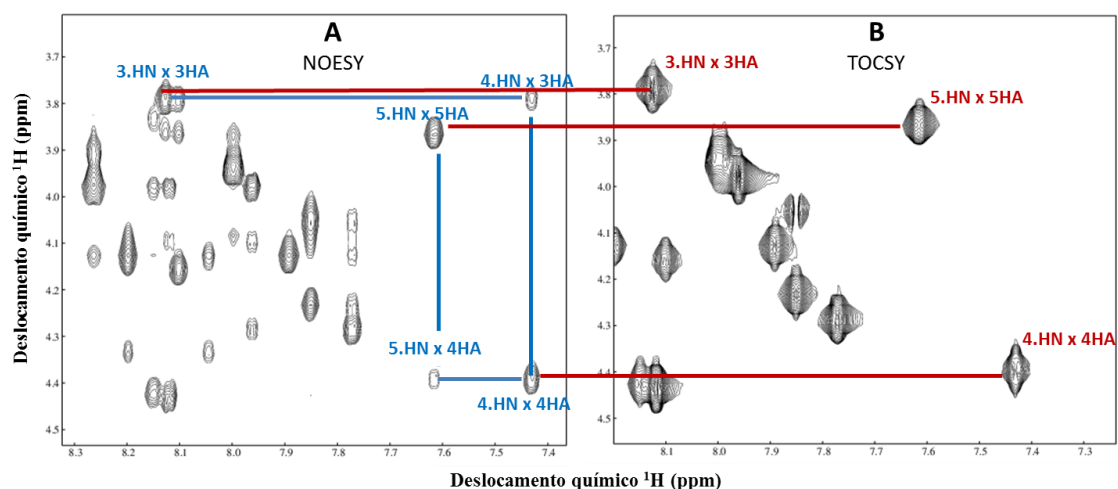


Figura 3.15: Mapas de contornos parciais (A) NOESY e (B) TOCSY da ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40).

Pela análise do mapa de contornos TOCSY (Fig. 3.15b), identifica-se o sistema de *spins* que apresenta o padrão esperado para o resíduo de aminoácido, por exemplo o do Asp-4 (HN, HA, HB1 e HB2). Partindo da correlação atribuída no mapa de contornos TOCSY entre 4.HN x 4.HA, identifica-se a correlação equivalente (linha vermelha) no mapa de contornos NOESY. No mapa de contornos NOESY (Fig. 3.15a), observa-se que, para o mesmo valor de δ de HN, essa correlação está conectada a outro HA, que se refere ao 3.HA (linha azul), o que caracteriza uma conexão inter-resíduo do tipo $d\alpha N$. A mesma observação pode ser feita para o valor de δ de HA do resíduo de Asp-4, identificando a conexão de 5.HN com a ressonância de 4.HA.

Para a confirmação dos assinalamentos, uma ferramenta importante é o mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC, que correlaciona os valores de δ dos HN, assinalados no mapa de contornos NOESY, com os valores de δ dos N. A Figura 3.16 (p. 88) apresenta a confirmação dos assinalamentos dos resíduos Val-3, Asp-4 e Ile-5 utilizando o mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC.

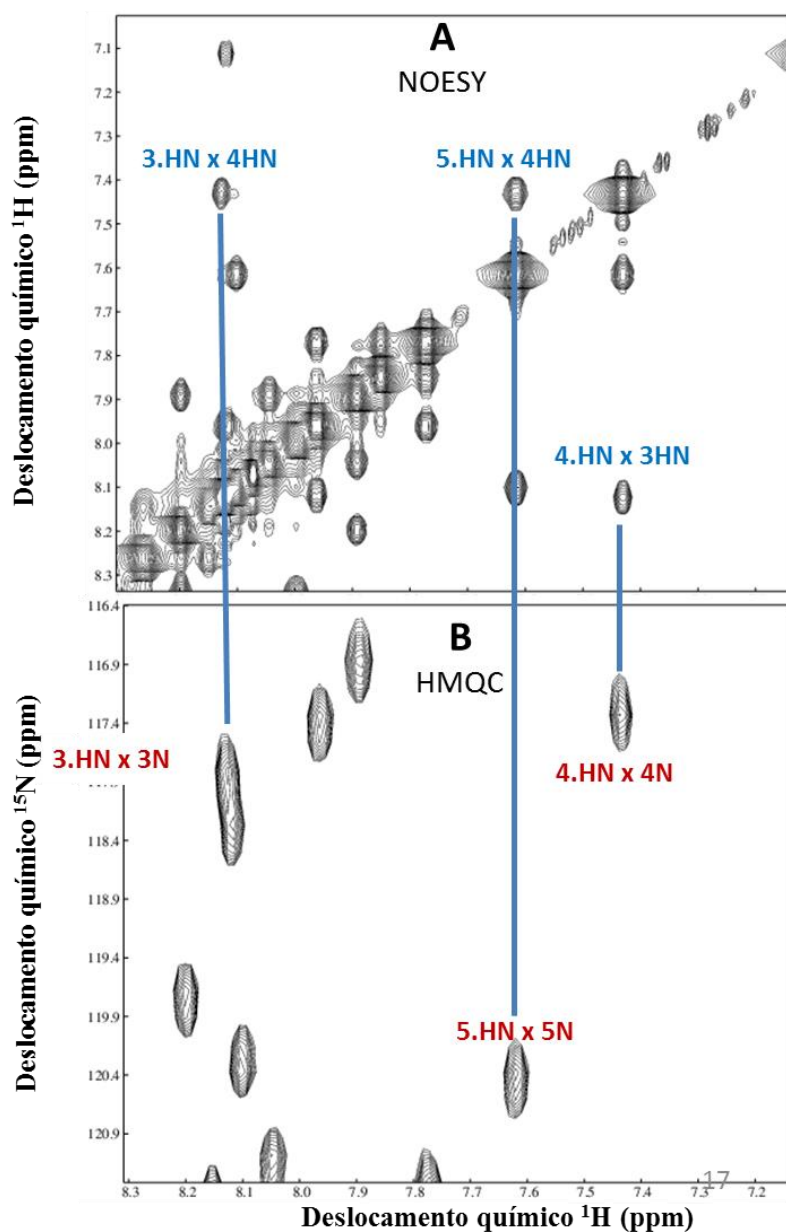


Figura 3.16: Mapas de contornos parciais (a) NOESY e (b) mapa de contornos ^1H - ^{15}N HMQC, da ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 : H_2O (60:40).

Nos espectros de TOCSY, a porção que compreende a região dos sinais HN-HA é chamada de região de impressão digital. A resolução espectral e aparência dessa região são indicadores se o peptídeo pode ser investigado com sucesso por RMN. A Figura 3.17 (p. 90) apresenta os mapas de contornos parciais, para os três peptídeos estudados, da região característica nos mapas de contornos TOCSY, obtidos em TFE- d_2 : H_2O , onde é possível observar elevado número de correlações, que são sugestivas de peptídeos com conformações bem definida. Para todos os peptídeos na região de ressonância dos hidrogênios amídicos foram identificados todos os sistemas de *spins*, a partir do terceiro resíduo (Val-3) até o último resíduo de aminoácido da porção C-terminal, totalizando

20, 21 e 23 sistemas de spins identificados, respectivamente, para as ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1. Os sistemas de *spins* dos resíduos de Gly-1 e Val-2, porção *N*-terminal, não foram observados através da frequência ressonância de HN, certamente, devido à troca muito rápida de prótons com o solvente. Entretanto, os sistemas de *spins* desses resíduos nas proximidades dos *N*-terminais foram detectados pelos respectivos δ de H α . As ressonâncias dos hidrogênios amídicos da Val-3 até o *C*-terminal também foram observadas em todos os espectros HMQC ^1H - ^{15}N obtidos para os peptídeos, como mostrado na Figura 3,17 (D-F, p. 90) para as amostras preparadas em TFE- d_2 / H $_2$ O (60:40). Resultados semelhantes foram observados nos espectros de TOCSY de todos os peptídeos, na presença de solução micelar de 400 mmol.L $^{-1}$ de DPC- d_{38} e de 400 mmol.L $^{-1}$ de SDS- d_{25} , indicando a ligação eficiente do peptídeo às membranas miméticas.

As regiões de hidrogênios amídicos dos mapas de contorno NOESY obtidos para os peptídeos na presença de TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), na presença de micelas de DPC- d_{38} e de SDS- d_{25} são apresentados nas Figuras 3.18, 3.19 e 3.20 (p. 91 - 93). O grande número de correlações HN-HN definitivamente indica uma elevada estabilidade estrutural dos peptídeos nos meios estudados, já que em espectros de peptídeos não estruturados tais núcleos não se correlacionariam devido ao processo de troca rápida com os hidrogênios de ligações lábeis das moléculas de solvente. O elevado número de correlações, bem como a largura de linha dos sinais observados permitiram as atribuições das ressonâncias, e a avaliação das estruturas tridimensionais dos peptídeos.

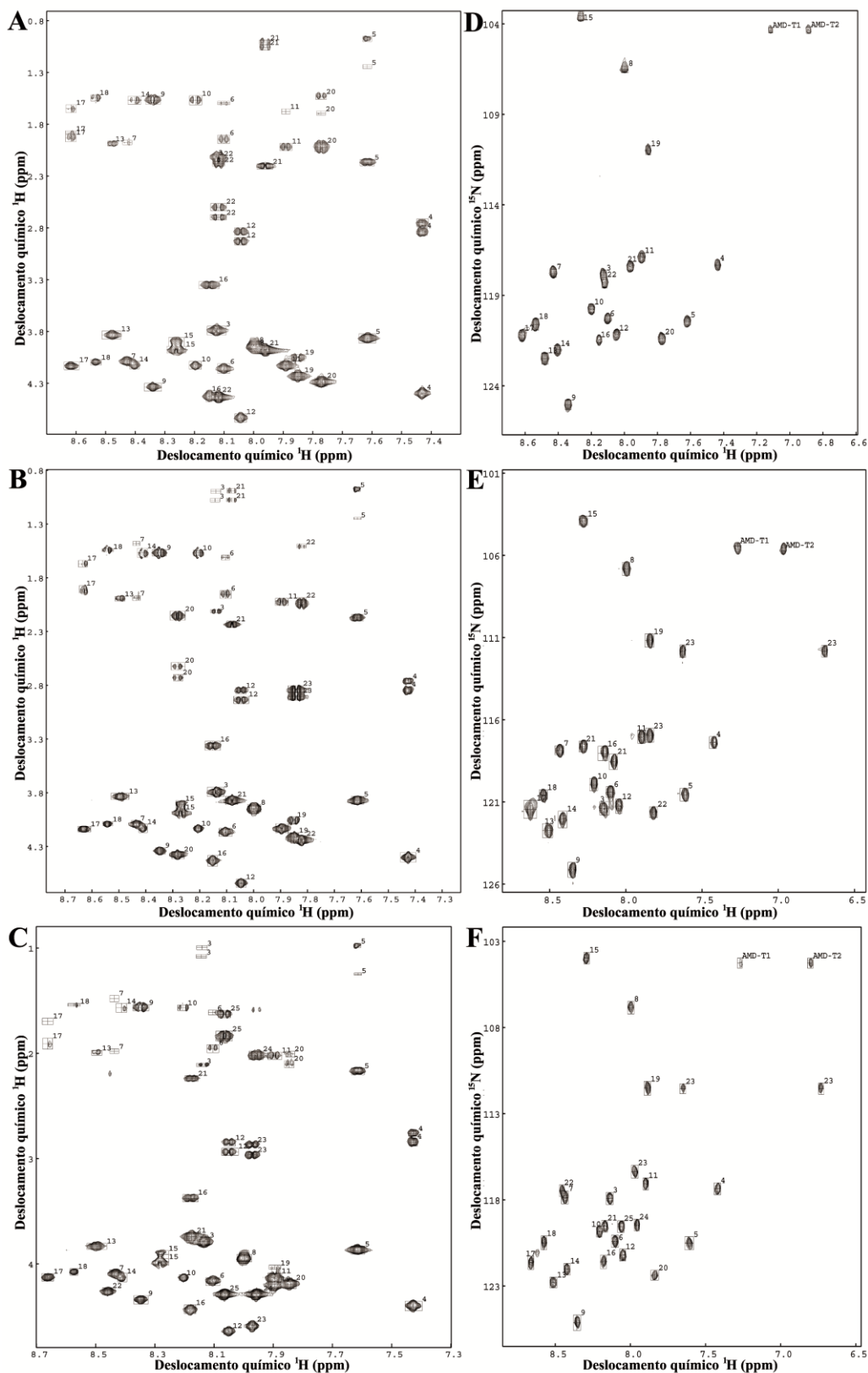


Figura 3.17: (A-C) Mapas de contornos TOCSY parciais e (D-E) mapas de contornos ^1H - ^{15}N HMQC parciais das ocellatina-LB1 (A, D), -LB2 (B, E) e -F1 (C, F) a 1,5 mM em TFE- d_2 : H_2O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

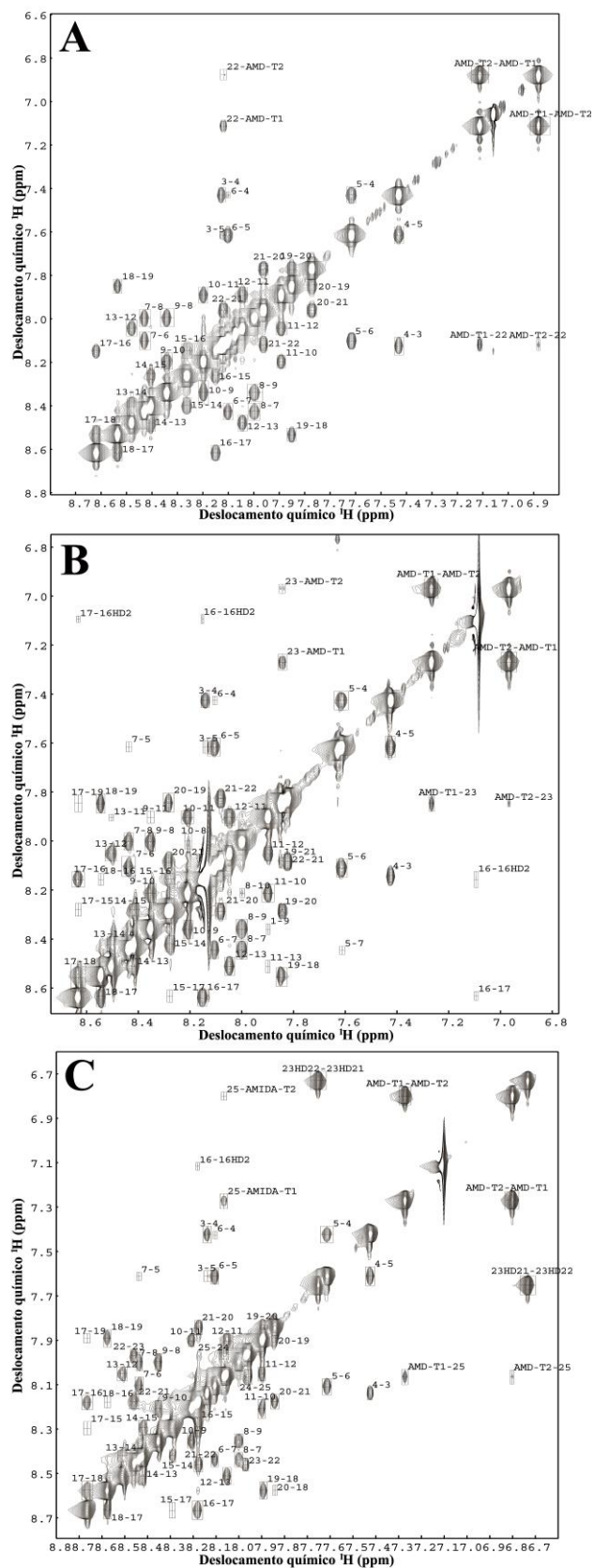


Figura 3.18: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), pH 7,0 (tampão fosfato 20,0 mM).

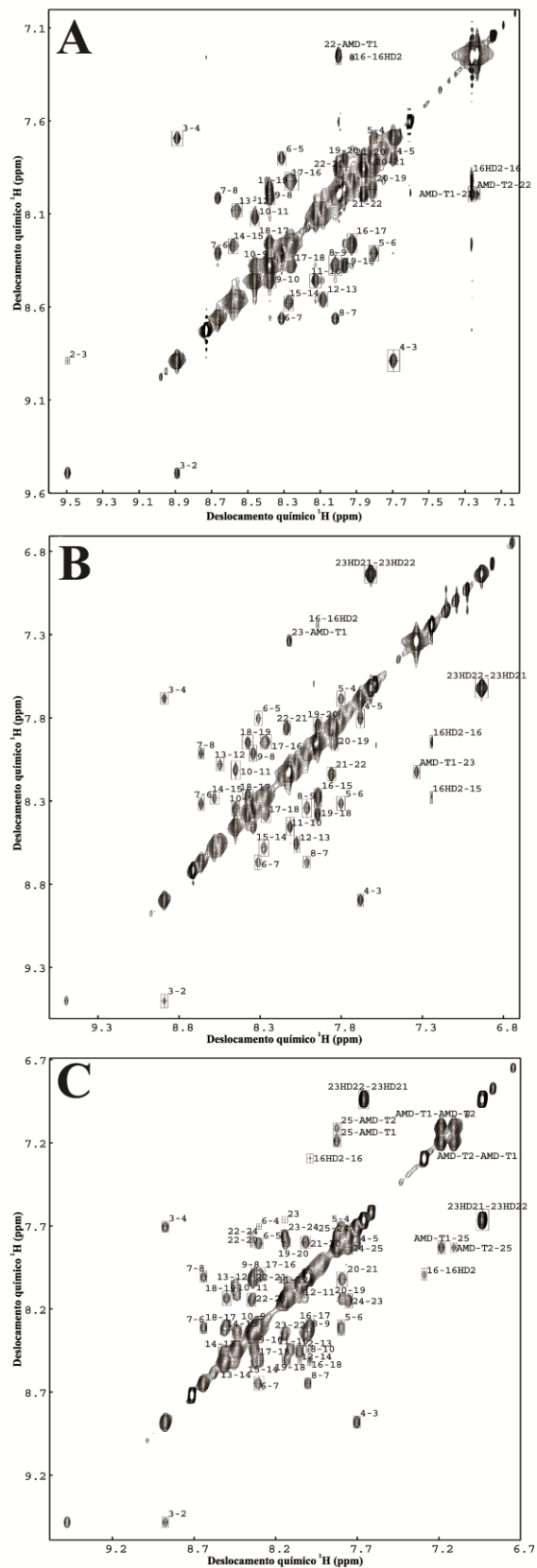


Figura 3.19: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 2 mM em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC-*d*₃₈.

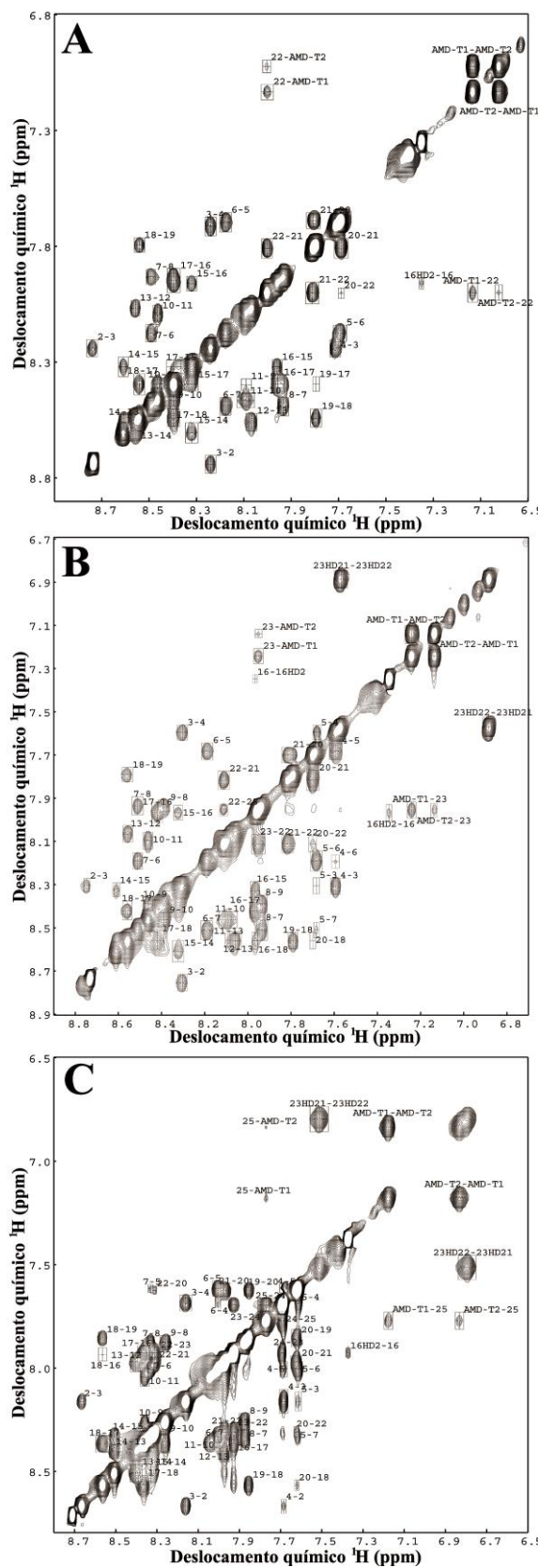


Figura 3.20: Mapas de contornos NOESY parciais das ocellatina-LB1 (a), -LB2 (b) e -F1 (c) a 2 mM em solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de SDS-*d*₂₅.

Após a interpretação de todos os espectros, foram observadas inúmeras correlações de NOE inter-residuais, que são indicativos claros de estruturação secundária dos peptídeos. As correlações de NOE inter-residuais sequenciais e de médias distâncias observadas para os peptídeos ocellatina-LB1, ocellatina-LB2 e ocellatina-F1, respectivamente, na presença de TFE- d_2 :H₂O, solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de DPC- d_{38} e solução micelar 400 mmol.L⁻¹ de SDS- d_{25} , são apresentadas a seguir nas Tabelas enumeradas de 3.6 a 3.8 (p. 95-97).

Tabela 3.6: NOEs característicos de estrutura secundária, ocellatina-LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40)

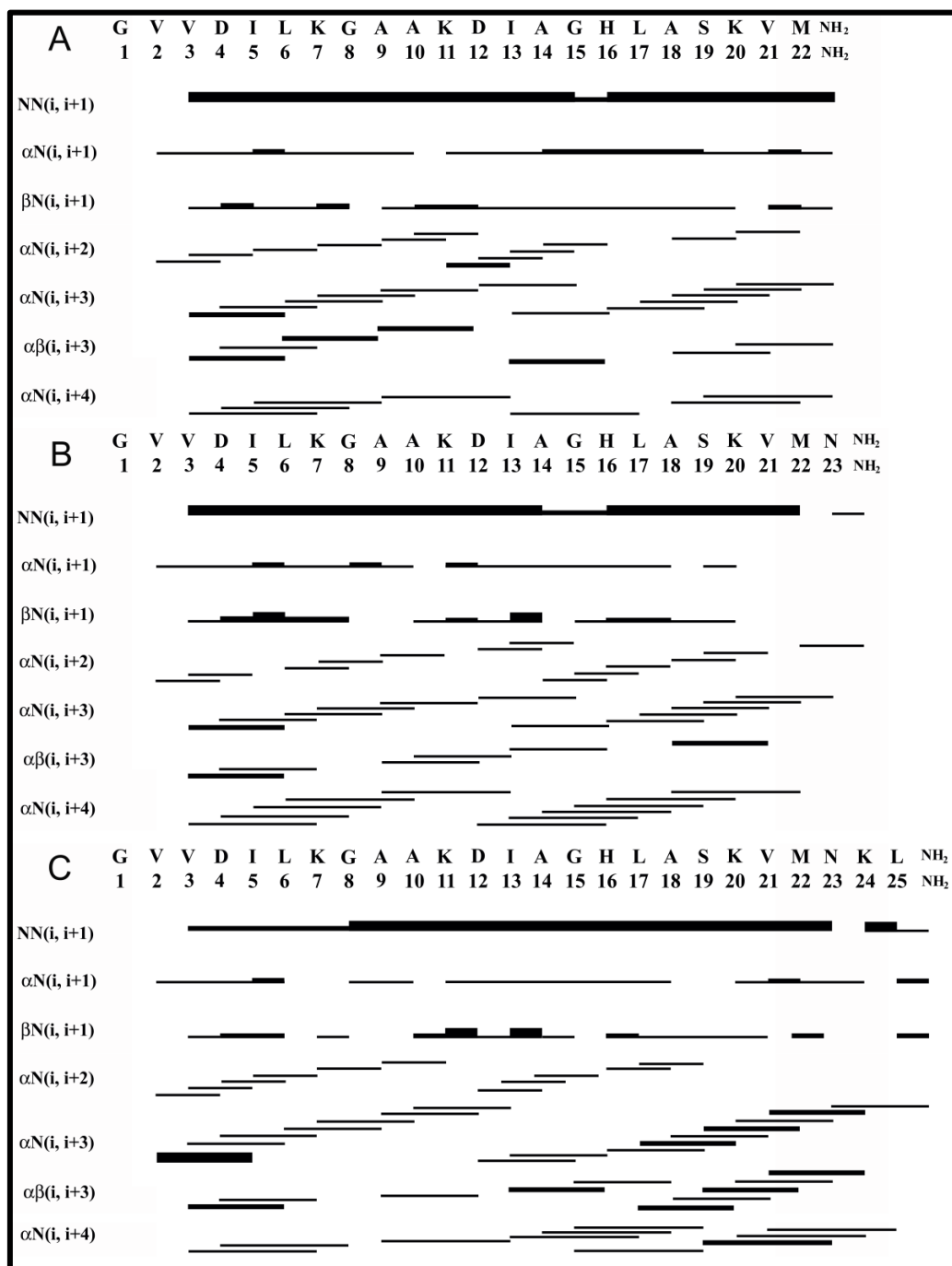


Tabela 3.7: NOEs característicos de estrutura secundária, ocellatina-LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em solução micelar de DPC-*d*₃₈ a 400 mmol.L⁻¹.

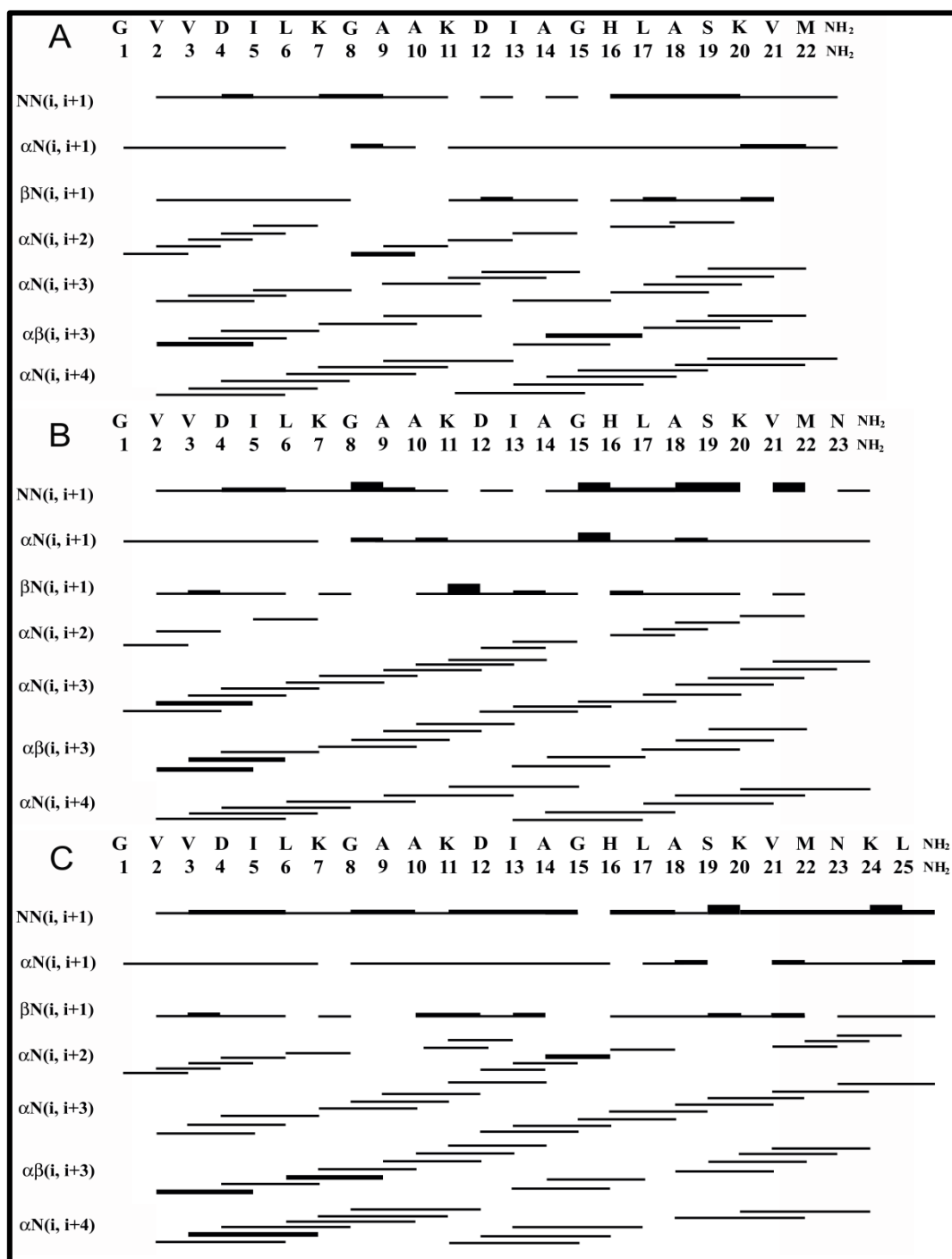
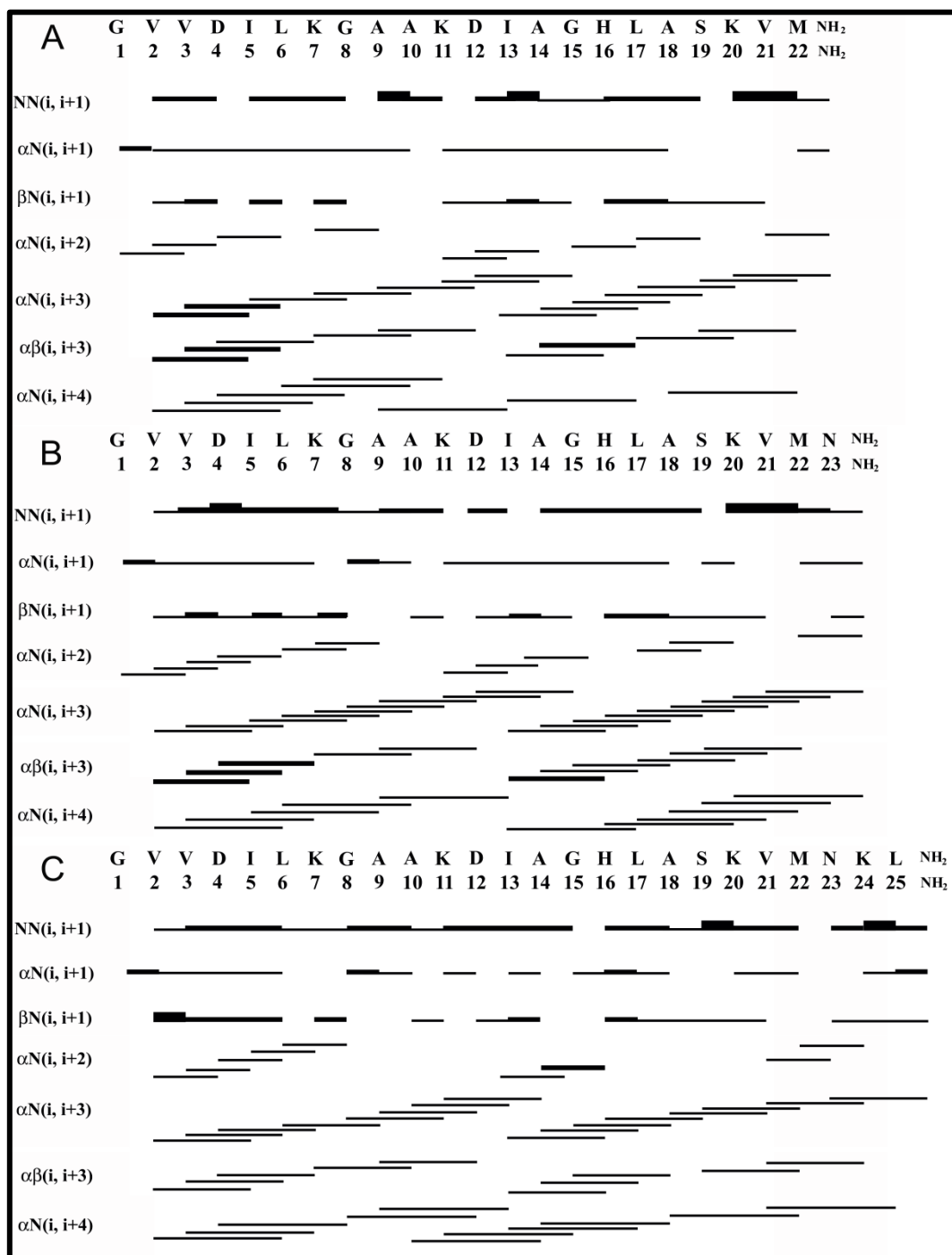


Tabela 3.8: NOEs característicos de estrutura secundária: ocellatina- LB1 (A), -LB2 (B) e -F1 (C) em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹.



A partir dos dados apresentados nas Tabelas, destaca-se que para as três ocellatinas foram atribuídas numerosas correlações de NOE características de estruturas secundárias α -helicoidais – α N (i, i+3), $\alpha\beta$ (i, i+3) e α N (i, i+4) (Wüthrich, 1986). Também vale a pena mencionar que essas várias correlações de NOE inter-resíduos foram observadas não só em soluções de TFE- d_2 :H₂O, mas também na presença de

micelas de DPC e SDS, o que sugere que os três peptídeos adquirem estruturas α -helicoidal em todos os meios estudados. A utilização de solventes orgânicos como meios miméticos de membrana, tais como TFE, muitas vezes estimula a formação e estabiliza hélices, de forma que, na maioria dos casos, os peptídeos não mantêm a estrutura nativa significativa em solventes orgânicos (Warschawsk *et al.*, 2011), enquanto micelas de detergentes são uma alternativa atraente para o estudo de peptídeos e proteínas de membrana por espectroscopia de RMN em solução. Os detergentes micelares são espécies anfipáticas, e as micelas mimetizam a interface das bicamadas de fosfolípidios, de modo que são geralmente considerados como mais confiáveis para a determinação de estruturas de peptídeos de membrana, do que os solventes orgânicos (Gesell *et al.*, 1997). Os dados apresentados nas Tabelas de NOEs característicos de estrutura secundária estão de acordo com os resultados de CD e mostram que as ocellatinas estudadas adquirem estruturação α -helicoidal tanto em misturas TFE/H₂O, como em meio mimético mais acurado, como as micelas de detergente. Entretanto, os perfis estruturais parecem conter diferenças sensíveis em solventes orgânicos e em micelas de detergentes, como se constata por algumas diferenças importantes nos padrões de NOEs característicos de estruturas secundárias, em especial na região *N*-terminal, e também pelos diferentes percentuais de conteúdo helicoidal alcançados pelos peptídeos nos diferentes meios analisados.

Para os estudos feitos em misturas de TFE-*d*₂:H₂O (Tab. 3.6 A, B e C, p. 95), observa-se que não há correlações entre os sinais dos HN dos resíduos Gly-1 e Val-2, sendo observado algumas correlações inter-residuais envolvendo o resíduo Val-2 (α N (i, i+1) e α N (i, i+2) para ocellatina-LB1 e -LB2, e α N (i, i+1), α N (i, i+2) e α N (i, i+3) para a ocellatina-F1). A ausência de correlações nessa porção reflete em uma menor ordenação estrutural nessa região dos peptídeos. Em contra partida, nos experimentos realizados na presença de micelas de DPC-*d*₃₈ e de SDS-*d*₂₅ (Tabelas 3.7 e 3.8, p. 96 e 97), há correlações inter-residuais envolvendo o primeiro resíduo de aminoácido (Gly-1) para as três ocellatinas. De fato, quando se observa os primeiros quatorze resíduos de aminoácidos dos peptídeos, nota-se um maior número de correlações NOE α N (i, i + 4) na presença de micelas, quando comparados com os experimentos realizados em TFE-*d*₂/H₂O. Estes resultados indicam que na presença das micelas de detergentes induz uma maior estabilidade estrutural próximo das regiões *N*-Terminal. Assim, para as três ocellatinas na presença de micelas de detergente, as inúmeras correlações de NOE características de estruturas α -helicoidais (α N(i,i+3), $\alpha\beta$ (i,i+3) e α N (i,i+4)) são

observadas desde o primeiro até o últimos resíduos, incluindo-se os hidrogênios da amidação C-terminal, o que indica que estruturação α -helicoidal em praticamente toda a extensão dos peptídeos.

Considerando que o uso de co-solventes é conhecido por induzir conformações helicoidais devido a uma constante dielétrica reduzida, micelas de detergente simulam a interface da membrana e, portanto, representam uma abordagem mais precisa para investigar interações peptídeo-membrana por espectroscopia de RMN em solução (Bechinger *et al.*, 2011, Sönnichsen *et al.*, 1992). No caso das três ocellatinas, várias correlações de médio alcance, especialmente para a primeira metade da cadeia polipeptídica, parecem não estar devidamente determinadas no caso do co-solvente, o que pode induzir características estruturais inadequadas nas estruturas tridimensionais. Como já observado para outros peptídeos, por exemplo, no caso da maculatina 1.1 onde um resíduo de prolina induz uma dobra entre duas regiões helicoidais do peptídeo e as diferenças nos ângulos delimitados pelos dois segmentos helicoidais foram observadas nas estruturas tridimensionais determinadas em TFE- d_3 / H₂O e na presença de micelas DPC- d_{38} (Chia *et al.*, 2000).

Para corroborar com os dados já apresentados, a Figura 3.21 (p. 99) apresenta as previsões de estrutura secundária para as três ocellatinas, obtidas pelo programa TALOS+, que calcula a flexibilidade dos peptídeos por meio dos valores de deslocamentos químicos experimentais dos C α , CO, C β , N e H α , utilizando a abordagem RCI (*random coil index*) (Berjanskii and Wishart, 2005).

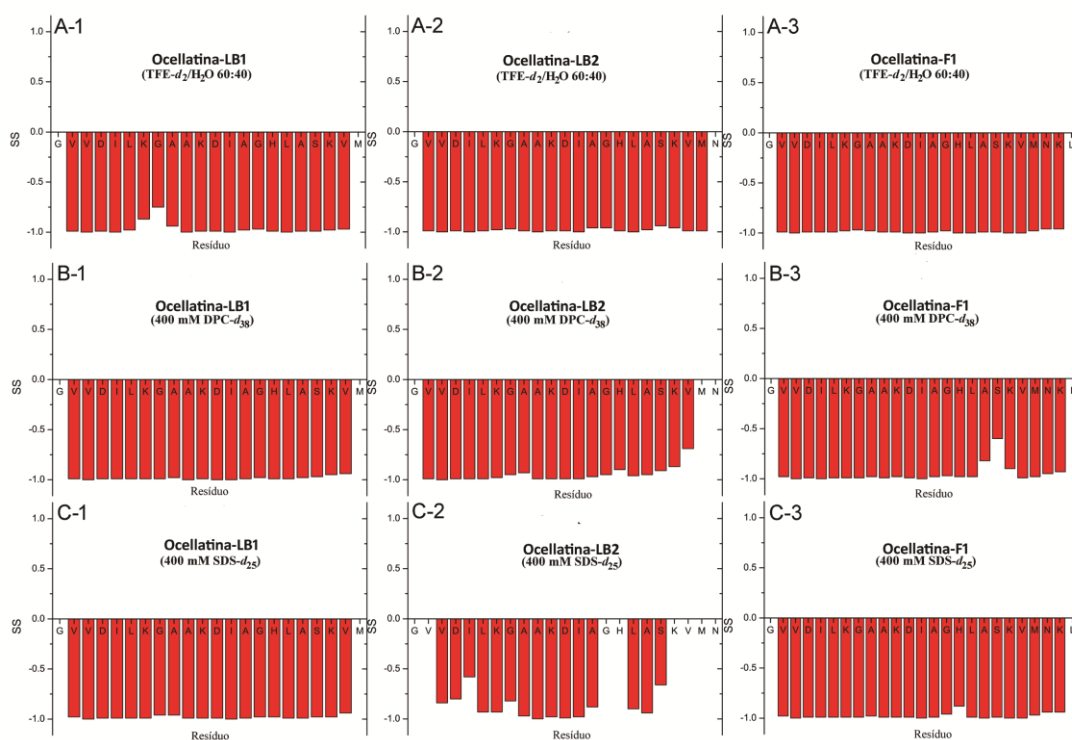


Figura 3.21: Valores de RCI obtidos pelo software TALOS+ para os peptídeos ocellatina-LB1, ocellatina-LB2 e ocellatina-F1, respectivamente, em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L $^{-1}$ e solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L $^{-1}$. Todos os valores de S^2 para o RCI obtidos são superiores a 0,5.

Para os gráficos de previsão de estrutura secundária, o comprimento das barras corresponde à probabilidade atribuída pela previsão de estrutura secundária, sendo os valores negativos indicativos de que os resíduos participam de um segmento α -helicoidal. Como se observa, todos os três peptídeos apresentam valores negativos para quase todos resíduos de aminoácido nos três meios estudados. Isso sugere que as ocellatinas estudadas se estruturam em α -hélice em toda a sua extensão, na presença de todos os meios avaliados. O peptídeo ocellatina-LB2 não apresenta previsão estrutural para todos os resíduos de aminoácidos, pois, durante a interpretação dos espectros de RMN, não foi possível atribuir valores de deslocamento químico para todos dos átomos necessários para o cálculo de RCI de alguns dos resíduos de aminoácidos.

Após a atribuição completa dos sinais de RMN, as correlações de NOE foram convertidas em restrições de distância e, a partir dos dados de deslocamentos químicos de $C\alpha$, $C\beta$, $H\alpha$ e $H\beta$, foram obtidos dados de restrições de ângulos diedros da cadeia principal do peptídeo. Os conjuntos de restrições geométricas foram empregados em procedimentos de *annealing* simulado, para o cálculo das estruturas dos três peptídeos nos três meios estudados. Obteve-se um total de nove conjuntos de estruturas

tridimensionais de alta resolução, considerando-se os três peptídeos estudados nos diferentes meios, estando apresentadas nas Figuras 3.22, 3.23 e 3.24 (p. 101 - 103) as sobreposições das dez estruturas mais estáveis para os três peptídeos em cada meio.

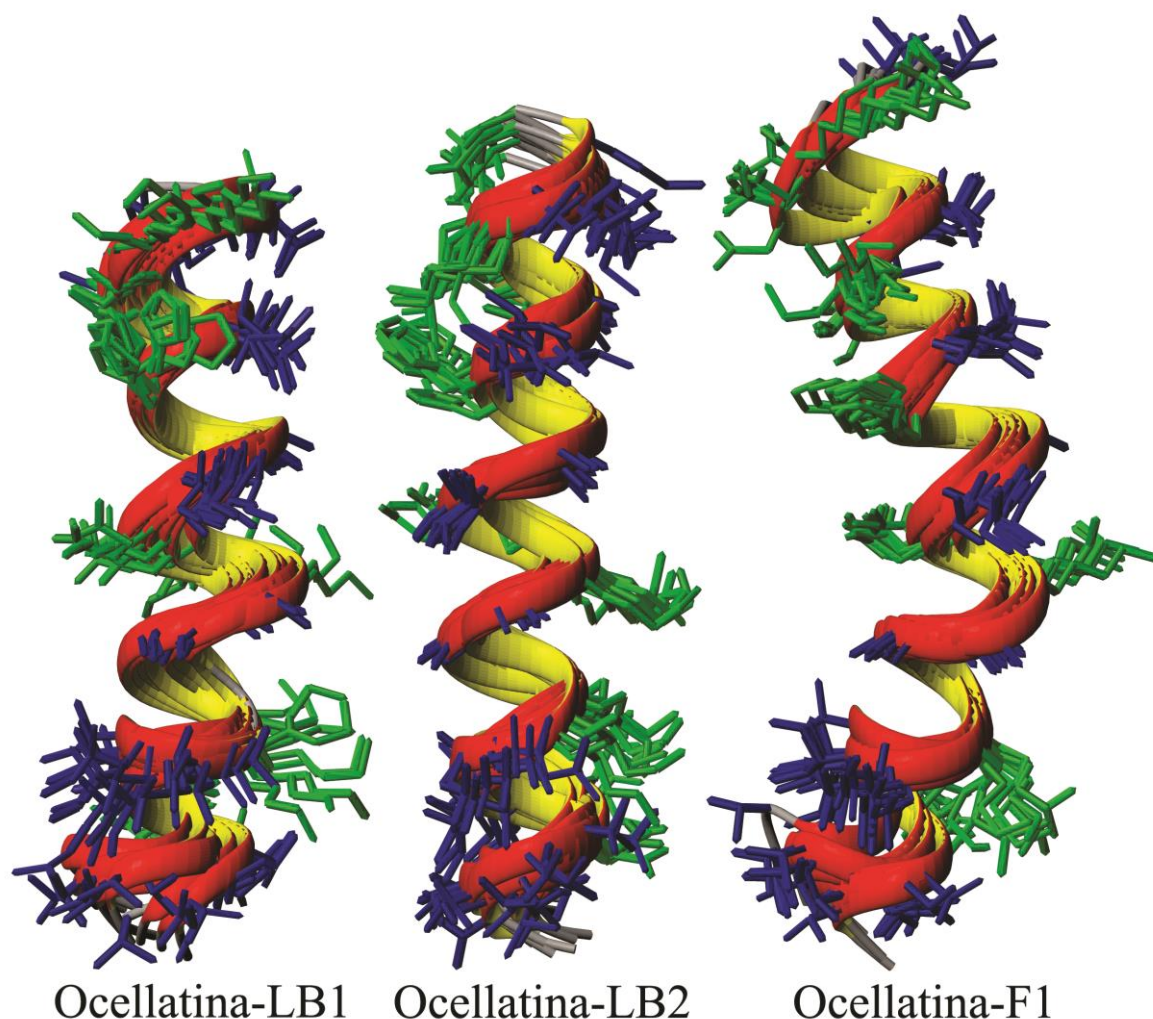


Figura 3.22: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para soluções dos peptídeos a 1,5 mM em TFE- d_2 :H₂O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção *N*-terminal aponta para a parte inferior da Figura.

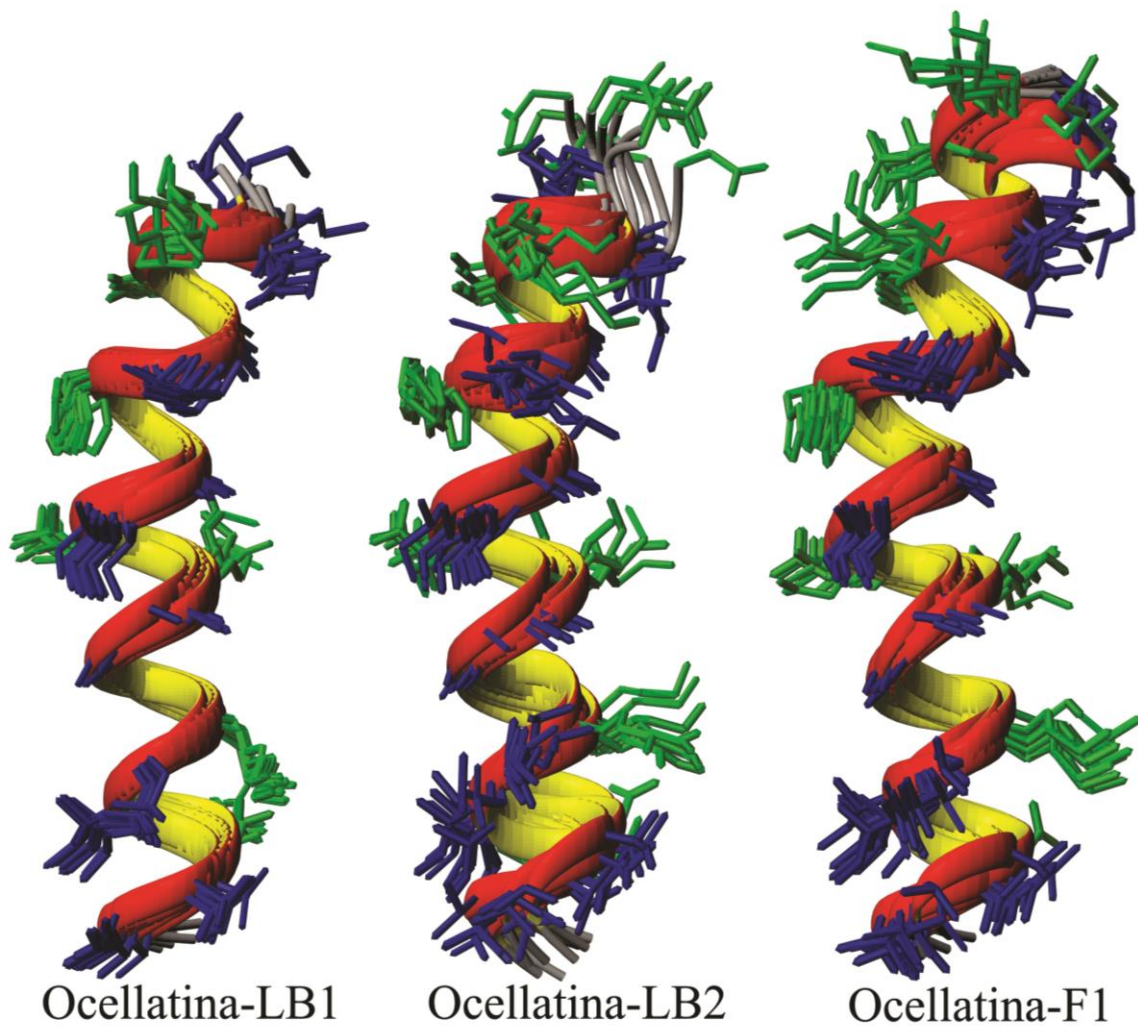


Figura 3.23: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para soluções dos peptídeos a 2,0 mM na presença de solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L⁻¹. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção *N*-terminal aponta para a parte inferior da Figura.

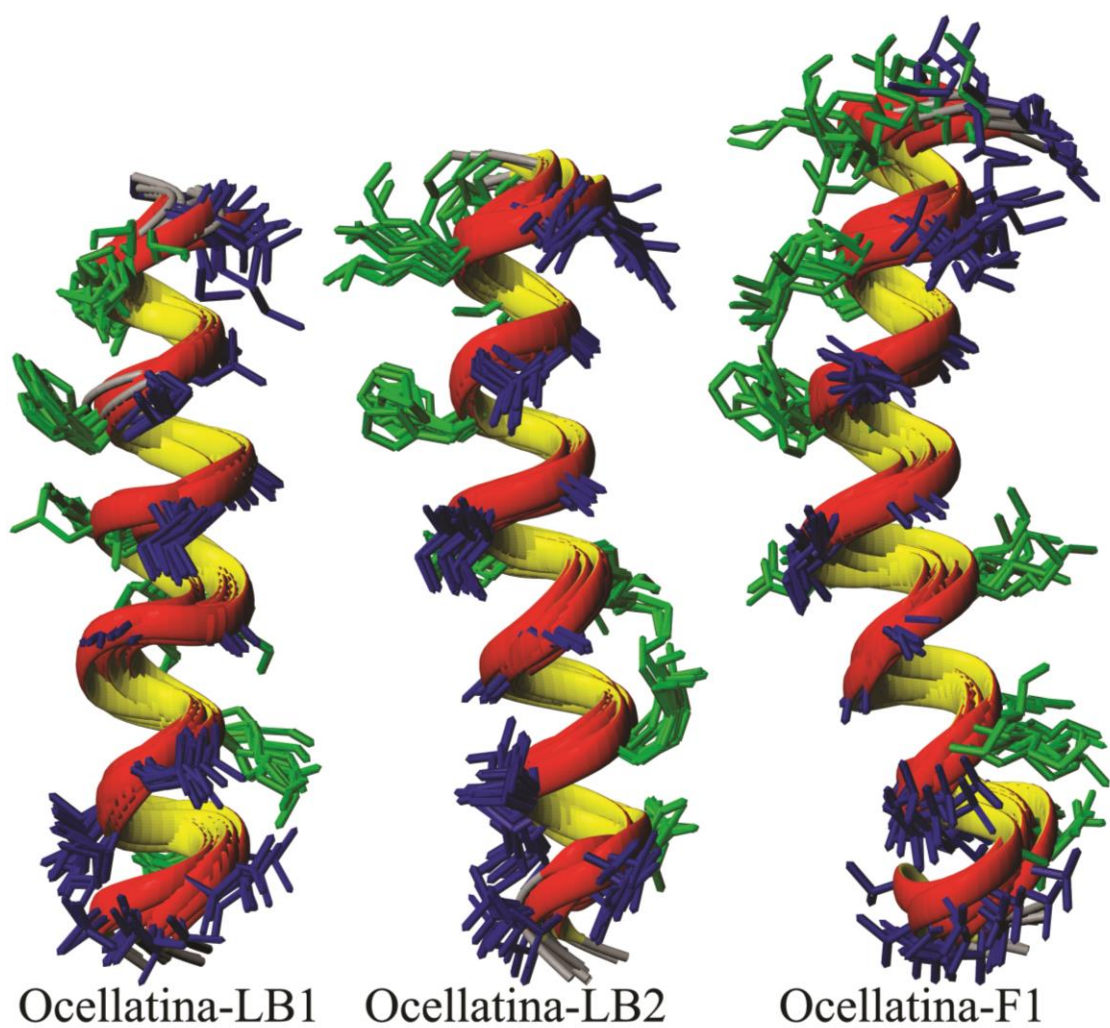


Figura 3.24: Dez estruturas de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para soluções dos peptídeos a 2,0 mM na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção N-terminal aponta para a parte inferior da Figura.

Como esperado, a partir da análise dos dados de NOE, os três peptídeos apresentam estruturas com elevados índices de helicidade, em todos os meios analisados e percebe-se que nas estruturas obtidas em TFE- d_2 :H₂O, há menor estabilidade estrutural nas proximidades da porção N-terminal, ao se comparar com as estruturas nas soluções micelares. Esses resultados estão de acordo com os dados de CD, que indicam que os três peptídeos alcançam altos teores de α -hélice em todos os meios, contudo observa-se de modo geral uma menor helicidade em soluções contendo o co-solvente que em soluções micelares e de vesículas.

Como apontado pela previsão da estrutura secundária dos três peptídeos investigados (Fig. 3.4, p. 61), as estruturas de RMN confirmam a forte propensão a estruturação α -helicoidal. Assim como nas simulações preliminares realizadas, as estruturas calculadas indicam que os peptídeos apresentam certo caráter anfifílico, com faces hidrofóbicas melhor definidas, em especial para as estruturas obtidas na presença de soluções micelares de DPC- d_{38} e SDS- d_{25} , que possuem um particionamento anfipático mais bem definido. A maior anfipaticidade em ambientes micelares também pode ser atribuída à adequada representação da interface membrana-água, o que certamente impõe uma partição adequada dos resíduos de aminoácidos dentro das faces hidrofílicas e hidrofóbicas da hélice peptídica. A Figura 3.25 (p. 104) mostra a face hidrofóbica das estruturas para as três ocellatinas na presença de solução micelar de SDS- d_{25} . Pode-se observar que os resíduos de Lys-20 (ocellatina-LB1, -LB2 e -F1) e Lys-24 (ocellatina-F1) estão contidos em porções estruturadas dos peptídeos, o que torna os perímetros das faces hidrofóbicas menores, principalmente para a ocellatina-F1, que possui dois resíduos de Lys. Como constatado pelos experimentos de CD e de extravasamento de calceína, a ocellatina-F1 apresentou maior afinidade pelas membranas modelo quando comparado com os outros dois peptídeos e, apesar de apresentar esses aparente perímetro hidrofóbicos reduzido.

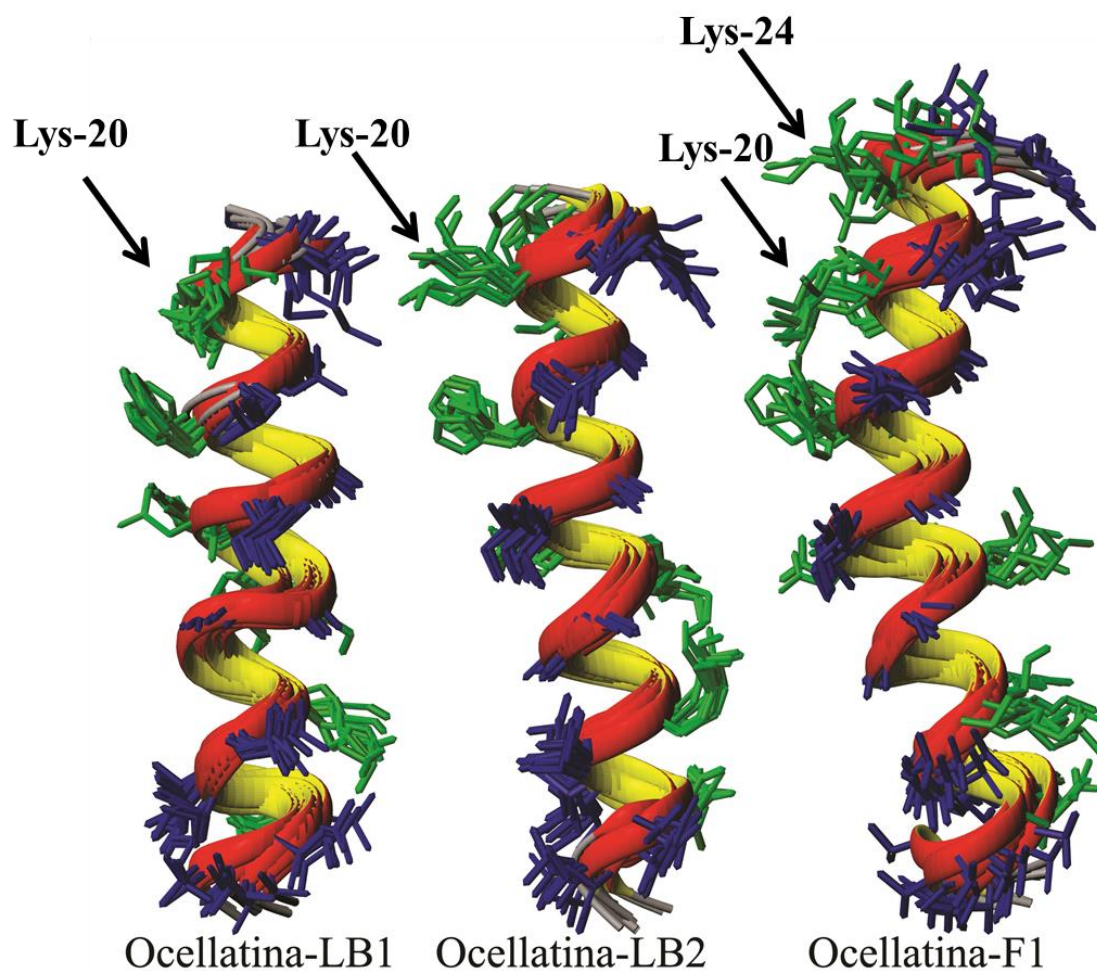


Figura 3.25: Representação com a face de caráter mais hidrofóbico evidenciada para frente, para os três peptídeos a 2,0 mM, na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L⁻¹. ocellatina-LB1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Val-21), ocellatina-LB2 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Met-22) e ocellatina-F1 (sobreposição dos resíduos Val-2 a Lys-24). Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul. A porção *N*-terminal aponta para a parte inferior da Figura.

Observam-se diferenças importantes em relação às estruturas dos peptídeos nos diferentes meios. Na presença de micelas de TFE- d_2 /H₂O e DPC- d_{38} observam-se curvaturas mais pronunciadas para a ocellatina-F1 em comparação com os outros dois peptídeos (Fig. 3.22, 3.23, 3.24 p. 101-103) e a composição de aminoácidos das três sequências sugere que os resíduos extras de Lys-Leu na porção *C*- terminal da ocellatina-F1 induzem a curvatura da hélice peptídica. Enquanto que a curvatura da hélice centrada entre resíduos Asp-12 e Ile-13 é observada para ocellatina-F1, na presença de micelas DPC- d_{38} (Figura 3.26-B, p. 107), o seu segmento helicoidal quase linear na presença de micelas SDS- d_{25} (Figura 3.26-C, p. 107), o que sugere diferentes interações do peptídeo com o as membranas zwitteriônicas e aniônicas.

Outros peptídeos, também extraídos de anuros, possuem hélices que não são perfeitamente lineares, mas, em vez disso, apresentam curvas ou dobras em torno de alguns resíduos (Wegener *et al.*, 2002; Pukala *et al.*, 2004). A Caerina 1.1, peptídeo de 25 resíduos de aminoácidos, assume duas hélices bem definidas, do resíduo Leu-2 até Lys-11 e Val-17 até His-24, separadas por uma região de maior flexibilidade na vizinhança do resíduo de Pro-15 (Wong *et al.*, 1997), sendo resíduos de Pro muitas vezes responsáveis por descontinuar estruturas helicoidais. A magainina 2, assim com as três ocellatinas estudadas, não possui resíduos de prolina, mas adota uma estrutura helicoidal com uma dobra no meio da sua sequência (Gesell *et al.*, 1997).

Nas estruturas obtidas na presença de micelas DPC- d_{38} , a face hidrofóbica do peptídeo é côncava (Fig. 3.26-B, p. 107), como observado em outras estruturas que apresentam curva ou dobra (Wong *et al.*, 1997, Pukala *et al.*, 2004). As faces côncavas hidrofóbicas das ocellatinas apresentam uma descontinuidade da hidrofobicidade pela presença do resíduo de Lys-7. Observar-se a presença do resíduo de Lys-7 na face côncava próxima à região *N*-terminal, ao passo que o resíduo de Lys-24 assume uma disposição espacial, que faz com que esse resíduo não se posicione na face hidrofóbica (Fig 3.26-B, p. 107). A ocellatina-F1, apesar de apresentar um aparente perímetro hidrofóbico reduzido, devido ao resíduo de Lys-24, é o que apresenta maior afinidade para as membranas modelo quando comparadas com os outros dois peptídeos. Possivelmente, a longa cadeia lateral de resíduos de lisina pode permitir a externalização do grupo amino e, como já observado para outros peptídeos catiônicos, tais como a PS-1 e a cadeia-1 da distinctina, pequenos desvios de uma topologia planar podem evitar a inserção de resíduos hidrofílicos e carregados da região *C*-terminal do peptídeo no interior da membrana (Resende *et al.* 2014, Resende *et al.* 2009).

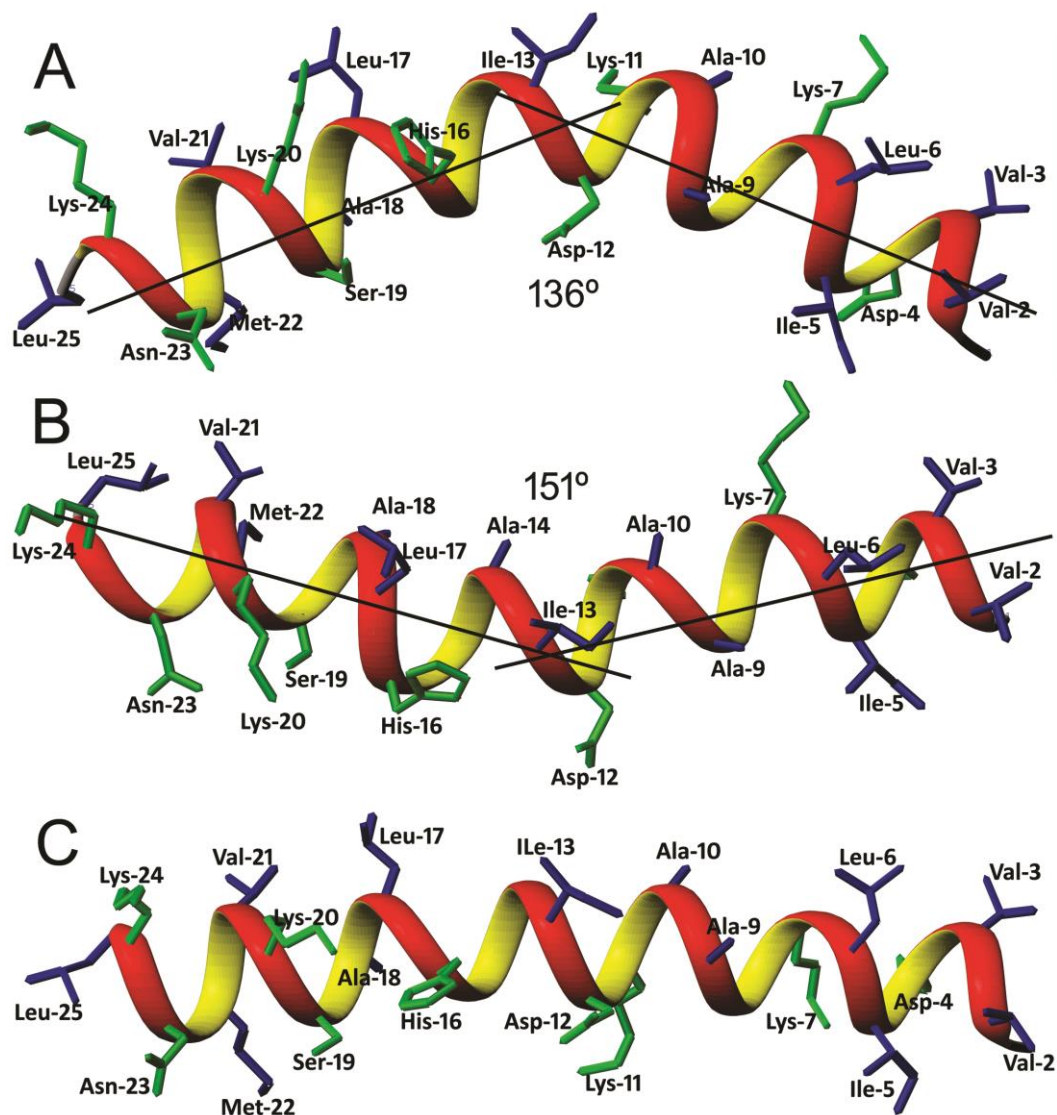


Figura 3.26: Conformações de menor energia obtidas via rotina de *annealing* simulado para ocellatina-F1 (A) a 1,5 mM em TFE- d_2 :H $_2$ O (60:40), tampão fosfato pH 7,0 a 20,0 mM, (B) a 2,0 mM na presença de solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mmol.L $^{-1}$ e (C) a 2,0 mM na presença de solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mmol.L $^{-1}$. Cadeias laterais de resíduos hidrofílicos são apresentadas em verde e de resíduos hidrofóbicos em azul.

É possível atestar a boa qualidade estereoquímica das estruturas calculadas a partir da análise dos diagramas de Ramachandran, uma vez que, todos os dos ângulos φ e ψ estão localizada nas regiões mais favoráveis e nas regiões adicionalmente favoráveis para a formação de motivos estruturais em α -hélice, como mostram as Figuras 3.27, 3.28 e 3.29 (p. 108 - 110).

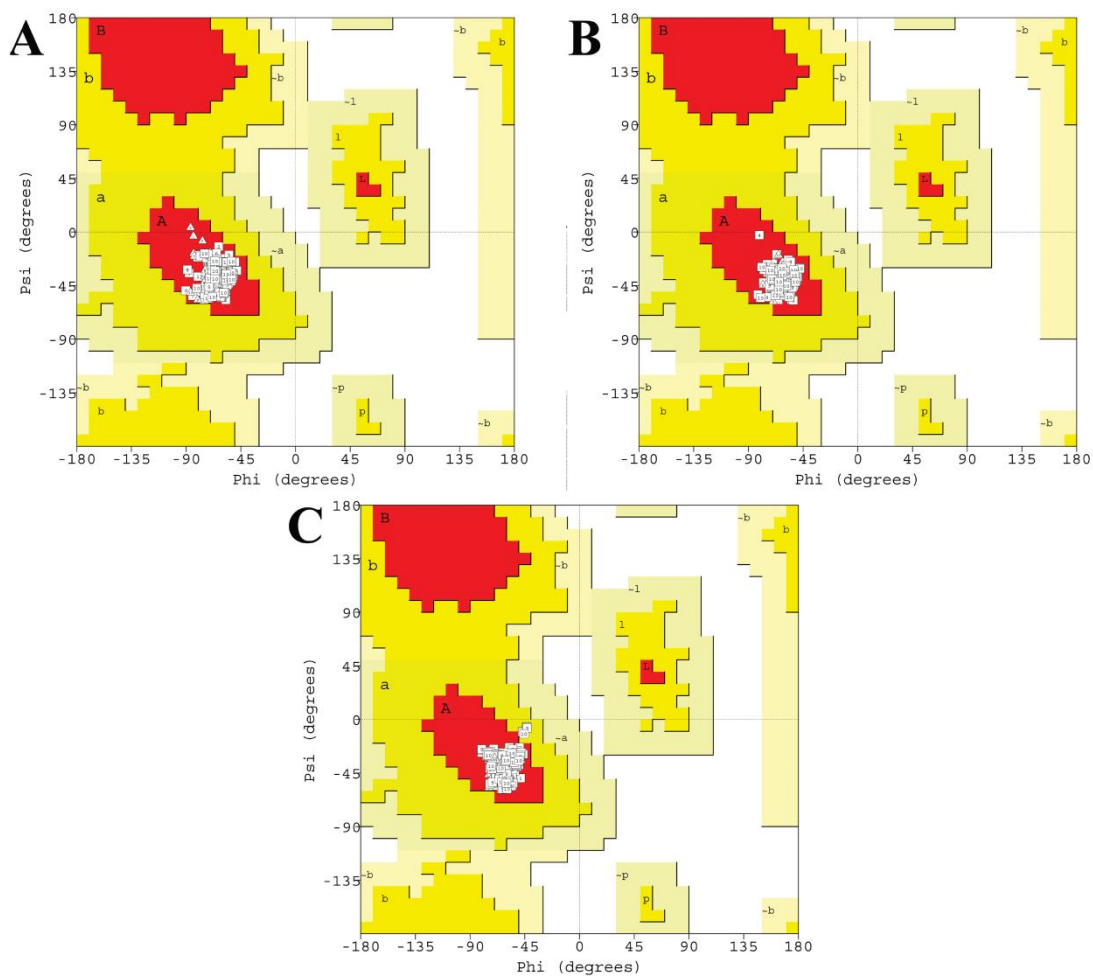


Figura 3.27: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-LB1 em (a) TFE- d_2 :H $_2$ O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c) solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996).

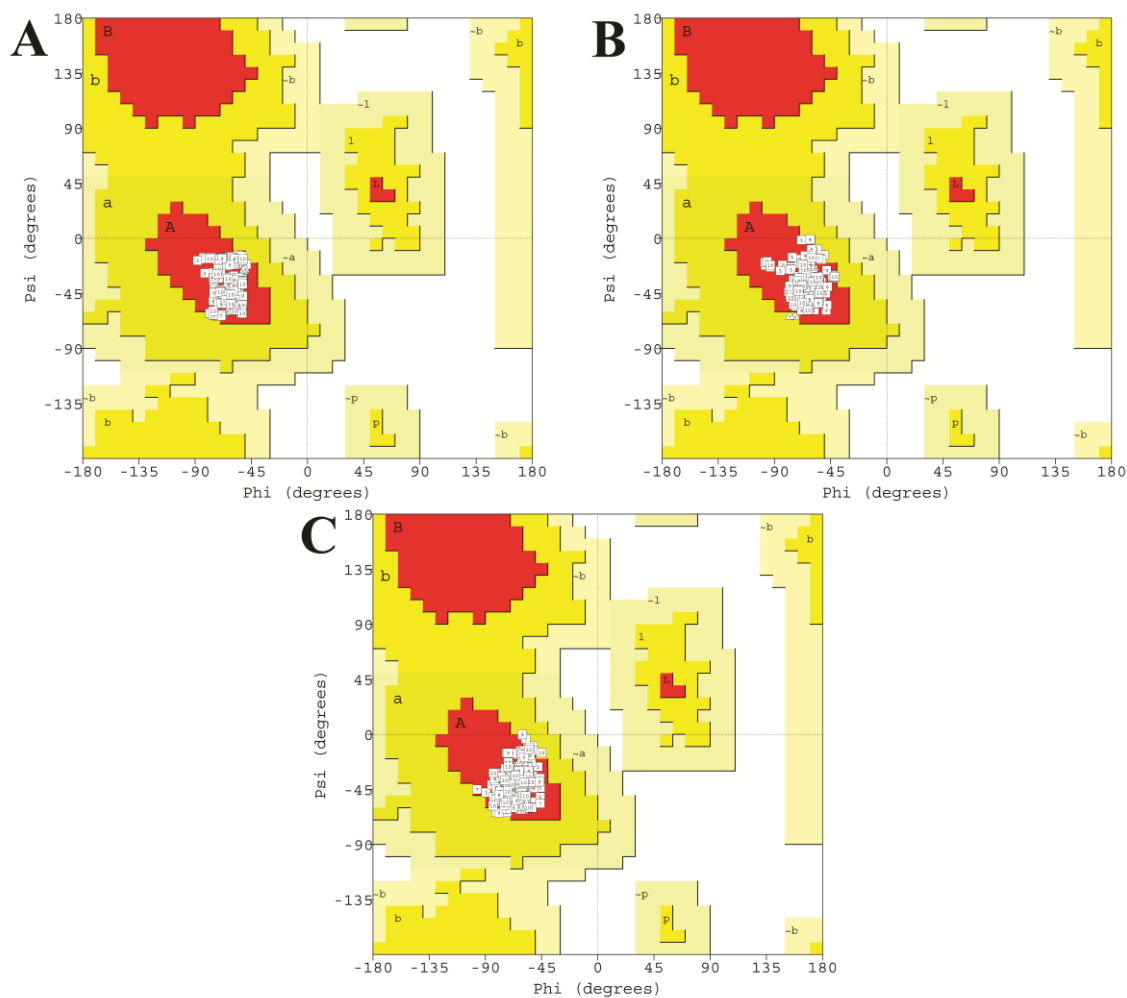


Figura 3.28: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-LB2 em (a) TFE- d_2 :H $_2$ O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c) solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996).

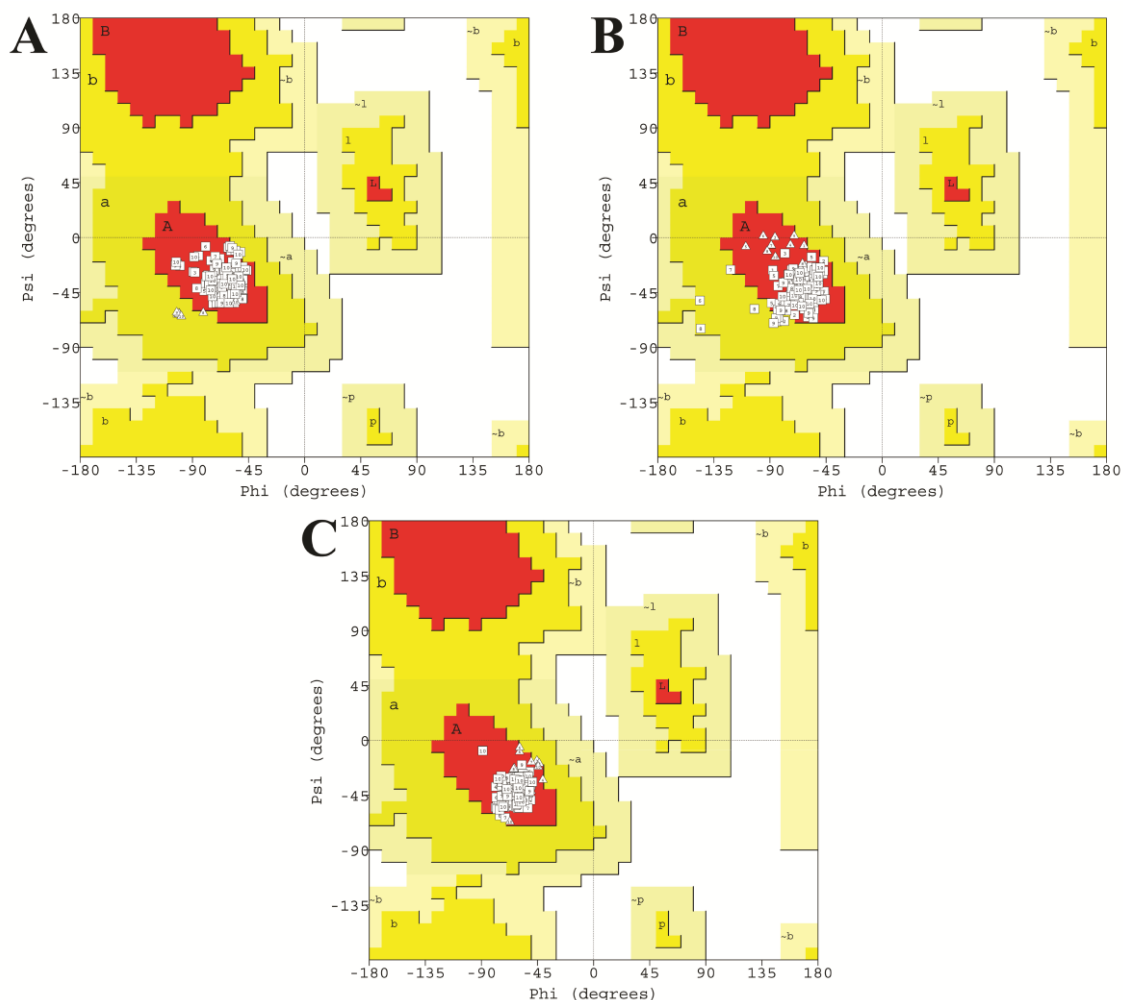


Figura 23: Qualidade estereoquímica das estruturas tridimensionais mais estáveis do peptídeo ocellatina-F1 em (a) TFE- d_2 :H $_2$ O, (b) solução micelar de DPC- d_{38} e (c) solução micelar SDS- d_{25} . Regiões mais favoráveis em vermelho, regiões adicionalmente favoráveis em amarelo, regiões generosamente favoráveis em bege e regiões proibidas em branco. Dados obtidos com uso do PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996).

As estatísticas da análise estrutural das três ocellatinas em TFE- d_2 /H $_2$ O e nas soluções micelares de DPC- d_{38} e SDS- d_{25} são apresentadas nas Tabelas 3.15, 3.16 e 3.17 (p. 111-113). Os valores de RMSD, bem como o número de correlações NOE de médio alcance estão de acordo com os perfis estruturais bem definidos e as boas sobreposições apresentadas nas Figuras 3.22, 3.23 e 3.24 (p. 101-103).

Tabela 3.9: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-LB1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H₂O (60:40) a 20°C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L⁻¹; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L⁻¹.

Ocellatina-LB1	Meio mimético		
	TFE- d_2 : H ₂ O (60:40)	400 mol.L ⁻¹ de DPC- d_{38}	400 mol.L ⁻¹ de SDS- d_{25}
Número total de restrições de distância	297	323	308
Número de restrições intra-residuais	185	187	195
Número de restrições sequenciais (<i>i, i+1</i>)	68	78	59
Número de restrições a médias distâncias (<i>i, i+j</i>)_{j=2, 3, 4}	44	58	54
Número de restrições de ângulos diedro	38	40	39
Número de violações			
NOE > 0.3 (Å°)	0	0	0
RMSD (Å) – todos os resíduos^a			
Esqueleto	1,54	0,79	1,07
Esqueleto e átomos pesados	1,98	1,08	1,41
RMSD (Å) – segmento helicoidal^{a, b}			
Esqueleto	1,45	0,67	0,94
Esqueleto e átomos pesados	1,90	0,90	1,29
RMSD (Å) – resíduos Gly-1 a Ala-14^a			
Esqueleto	1,06	0,38	0,61
Esqueleto e átomos pesados	1,36	0,61	0,95
Análise do diagrama de Ramachandran^c			
Resíduos em regiões mais favoráveis	100,0%	96,7%	98,3
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	0,0%	3,3%	1,7
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0,0%	0,0%	0,0%
Resíduos em regiões proibidas	0,0%	0,0%	0,0%

^a – valores de RMSD obtidos com uso do programa MOLMOL.

^b – da Val-2 à Val-21 para todos os meios.

^c – resultados obtidos com uso do programa PROCHECK_NMR.

Tabela 3.10: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-LB2 a: 1,5 mM em TFE- d_2 :H₂O (60:40) a 20 °C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L⁻¹; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L⁻¹.

Ocellatina-LB2	Meio mimético		
	TFE- d_2 : H ₂ O (60:40)	400 mol.L ⁻¹ de DPC- d_{38}	400 mol.L ⁻¹ de SDS- d_{25}
Número total de restrições de distância	316	323	348
Número de restrições intra-residuais	189	194	212
Número de restrições sequenciais (<i>i</i>, <i>i</i>+1)	65	67	70
Número de restrições a médias distâncias (<i>i</i>, <i>i</i>+<i>j</i>)_{<i>j</i>=2, 3, 4}	62	62	66
Número de restrições de ângulos diedro	42	42	28
Número de violações			
NOE > 0.3 (Å°)	0	0	0
RMSD (Å) – todos os resíduos^a			
Esqueleto	1,54	1,58	1,12
Esqueleto e átomos pesados	1,81	2,08	1,40
RMSD (Å) – segmento helicoidal^{a, b}			
Esqueleto	1,40	1,31	1,08
Esqueleto e átomos pesados	1,75	1,67	1,35
RMSD (Å) – resíduos Gly-1 a Ala-14^a			
Esqueleto	1,01	0,75	0,72
Esqueleto e átomos pesados	1,34	1,03	0,97
Análise do diagrama de Ramachandran^c			
Resíduos em regiões mais favoráveis	100,0%	99,5%	94,2
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	0,0%	0,5%	5,8
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0,0%	0,0%	0,0%
Resíduos em regiões proibidas	0,0%	0,0%	0,0%

^a – valores de RMSD obtidos com uso do programa MOLMOL.

^b – da Val-2 à Met-22 para TFE- d_2 /H₂O(60:40) e 400 mol.L⁻¹ de SDS- d_{25} e da Val-2 à Val-21 para 400 mol.L⁻¹ de DPC- d_{38} .

^c – resultados obtidos com uso do programa PROCHECK_NMR.

Tabela 3:11: Sumário da estatística estrutural do peptídeo ocellatina-F1 a 1,5 mM em TFE- d_2 :H₂O (60:40) a 20 °C, pH 7,0, tampão fosfato 20,0 mM; 2,0 mM em solução micelar de DPC- d_{38} a 400 mol.L⁻¹; e 2,0 mM em solução micelar de SDS- d_{25} a 400 mol.L⁻¹ ..

Ocellatina-F1	Meio mimético		
	TFE- d_2 / H ₂ O (60:40)	400 mol.L ⁻¹ de DPC- d_{38}	400 mol.L ⁻¹ de SDS- d_{25}
Número total de restrições de distância	347	362	354
Número de restrições intra-residuais	222	217	218
Número de restrições sequenciais (<i>i, i+1</i>)	66	72	73
Número de restrições a médias distâncias (<i>i, i+j</i>)_{<i>j</i>=2, 3, 4}	60	73	63
Número de restrições de ângulos diedro	46	44	44
Número de violações			
NOE > 0.3 (Å°)	0	0	0
RMSD (Å) – todos os resíduos^a			
Esqueleto	1,07	1,20	1,39
Esqueleto e átomos pesados	1,39	1,55	1,97
RMSD (Å) – segmento helicoidal^{a, b}			
Esqueleto	0,93	1,07	1,28
Esqueleto e átomos pesados	1,33	1,46	1,84
RMSD (Å) – resíduos Gly-1 a Ala-14^a			
Esqueleto	1,01	0,75	0,72
Esqueleto e átomos pesados	1,34	1,03	0,97
Análise do diagrama de Ramachandran^c			
Resíduos em regiões mais favoráveis	95,2%	95,7%	99,0%
Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis	4,8%	4,3%	1,0%
Resíduos em regiões generosamente favoráveis	0,0%	0,0%	0,0%
Resíduos em regiões proibidas	0,0%	0,0%	0,0%

^a – valores de RMSD obtidos com uso do programa MOLMOL.

^b – da Val-2 à Lys-24 para todos os meios.

^c – resultados obtidos com uso do programa PROCHECK_NMR.

Como apresentado nas Tabelas 3.9-3.11 (p. 111-113), menores valores de RMSD são observados para os conjuntos de estruturas mais estáveis para os três peptídeos em solução micelar, quando os primeiros quatorze resíduos de aminoácidos são considerados, indicando que o ambiente de micelar realmente estabiliza a região *N*-terminal dos peptídeos. Dentre as três ocellatinas estudadas a ocellatina-F1 é, em particular, mais estruturada na região *C*-terminal, o que é evidenciado por uma melhor sobreposição nessa região e um maior número de correlações de NOE a média distância. Enquanto que as estruturas obtidas para a ocellatina-LB2 nos três meios analisados possuem menor estabilidade estrutural nas proximidades do *C*-terminal, em especial para as estruturas na presença de solução micelar de DPC-*d*₃₈ onde o seguimento helicoidal se estendeu da Val-2 à Val-21, ou seja, um resíduo de aminoácido a menos que os seguimentos dos outros meios.

Esses resultados estão de acordo com as atividades mais pronunciadas da ocellatina-F1 em comparação com as outras duas ocellatinas, o que reforça ideia de que os resíduos extras na região *C*-terminal favorecem a interação da ocellatina-F1 com as membranas. Enquanto a presença do resíduo de Asn-23 a mais na sequência da ocellatina-LB2 em relação à ocellatina-LB1, não promove diferenças significativas quanto à atividade biológica ou em relação à interação desses peptídeos com as membranas, uma vez que, os peptídeos apresentaram perfis semelhantes nos testes de liberação de calceína de LUVs-POPC e, ainda apresentam perfis de atividade antimicrobiana e teores de hemólise equivalentes. Na realidade o resíduo extra de Asn-23 na sequência da ocellatina-LB2 parece provocar uma ligeira diminuição na atividade, na estrutura, bem como na capacidade de perturbar a estabilidade da membrana (ensaios de extravasamento de marcador químico), o que parece sugerir que este resíduo extra, a princípio, leve a efeitos contrários à atividade antibiótica. Como a ocellatina-F1 foi o peptídeo com maior atividade e com interações mais fortes, pode-se planejar em estudos futuros síntese de análogos da ocellatina-F1, onde se promova a remoção do resíduo de Asn-23, ou a substituição deste por outro resíduo de aminoácido, a fim de tentar se potencializar as atividades do peptídeo (Silva *et al.*, 2015). Embora a ocellatina-LB2 apresente isoladamente menor atividade, é possível que um *cocktail* de peptídeos antibióticos secretados na pele do animal, contendo as três ocellatinas, ainda possibilite uma ação conjunta dos três peptídeos, que possa levar a um espectro de ação mais amplo e potente, entretanto a existência de tal efeito deve ser investigada em outros trabalhos.

4 Conclusão

A degradação de Edman permitiu sequenciar, a partir do extrato da secreção cutânea de *L. labyrinthicus*, três peptídeos, que foram identificados e caracterizados, apresentando cadeias compostas por 22, 23 e 25 resíduos de aminoácidos. Os peptídeos, com elevado grau de homologia, foram denominados de ocellatina-LB1, -LB2 e -F1.

Para a obtenção dos três peptídeos em maior escala, utilizou-se a metodologia FMOC de síntese em fase sólida. Todos os peptídeos foram obtidos com rendimentos brutos consideráveis. O processo de purificação dos peptídeos por CLAE-FR em escala semi-preparativa se mostrou adequado, viabilizando a obtenção dos peptídeos com elevado grau de pureza, o que foi confirmado por posteriores experimentos de injeção do peptídeo puro em escala analítica por CLAE, bem como por análise de espectrometria de massas.

Os resultados mostraram que as três ocellatinas possuem atividade antimicrobiana, sendo a ocellatina-F1 o peptídeo com espectro de atividade mais amplo e potente. Além disso, as ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1, não apresentam atividade hemolítica significativa, mesmo em concentrações muito mais elevadas que os valores de MIC, indicando que essas substâncias são seletivas contra células de microrganismos.

Os estudos estruturais dos peptídeos ocellatina-LB1, -LB2 e -F1 por espectroscopia de dicroísmo circular mostraram que essas ocellatinas não apresentam estruturação definida em meio aquoso, enquanto que, em meios miméticos de membranas (na presença de soluções de TFE:água, micelas de DPC e SDS e vesículas de POPC e POPC:POPG 3:1) apresentam altos graus de estruturação α -helicoidal. Esse tipo de comportamento é bem característico de vários peptídeos antimicrobianos, que, apesar de normalmente não apresentarem conformação preferencial em meio aquoso, adotam suas conformações ativas, quando em contato com as membranas de microrganismos. A ocellatina-F1 apresentou, em geral, maiores graus de estruturação entre os conteúdos helicoidais dos três peptídeos.

As ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 se ligam fortemente às membranas, independentemente da carga de superfície das vesículas. Contudo, o fato da ocellatina-F1 promover até 96 % de liberação de calceína de vesículas de POPC mostra que este peptídeo interage mais fortemente com as membranas. Os resultados mostram que o

peptídeo apresenta alta afinidade por membranas zwitteriônicas, bem como indica que o peptídeo apresenta atividade formadora de poro.

Na aquisição dos espectros de RMN, a obtenção de larguras de linha satisfatórias, na presença de micelas de SDS- d_{25} , com o aumento da temperatura experimental (30 °C para as ocellatinas-LB1 e -LB2 e 50 °C para ocellatina-F1) reforça os dados de CD e confirmam que as ocellatinas apresentam elevadas afinidades por membranas. A condição experimental ótima conseguida para a ocellatina-F1 sugere uma interação mais efetiva desse peptídeo com a membrana, do mesmo modo que, os resultados de extravasamento de calceína indicam que a ocellatina-F1 interage mais fortemente, causando o extravasamento de quase 100 % do marcador.

Os experimentos de RMN para as ocellatinas-LB1, -LB2 e -F1 na presença de soluções TFE/H₂O (60:40), bem como na presença de micelas de DPC e SDS apresentam grande número de correlações de NOE, o que demonstra uma ligação efetiva dos peptídeos aos meios testados. Esses resultados são compatíveis com as observações feitas a cerca das larguras de linha e também dos resultados obtidos por CD. Como esperado, a partir dos dados obtidos por CD, as ocellatinas estruturam-se em α -hélice em todos os meios analisados. Sendo que, a ocellatina-F1 apresenta-se mais estruturada na região C-terminal, principalmente em relação à ocellatina-LB2, certamente devido à presença dos resíduos extras de Asn-23, Lys-24 e Leu-25 na estrutura primária da ocellatina-F1. As estruturas α -helicoidais apresentam uma face hidrofóbica evidente nas estruturas obtidas na presença de micelas de DPC e SDS, onde os resíduos de Lys-20 e -24 da ocellatina-F1 diminuem o perímetro da sua face hidrofóbica em relação às ocellatinas-LB1 e -LB2, além disso, observa-se uma curvatura no eixo das hélices, em especial na presença de micelas de DPC, que é associada à orientação paralela dos peptídeos as membranas.

Os resultados demonstram que os três resíduos extras presentes na porção C-terminal da ocellatina-F1 desempenham um papel importante para interações mais efetivas, entre peptídeo e membrana, e também nas propriedades antimicrobianas, estruturais e capacidade de formação de poros. Assim, os resíduos extras de Asn-23, Lys-24 e Leu-25 presentes na região C-terminal da ocellatina-F1 parecem promover interações mais fortes peptídeo-membrana e atividades antimicrobianas mais elevadas, enquanto que o resíduo Asn-23 da ocellatina-2 parece diminuir seu potencial antimicrobiano, estruturação, bem como a capacidade de perturbar a estabilidade da membrana, quando comparados a ocellatina-LB1. Nesse sentido, investigações futuras

que promovam substituições sítio-dirigidas do resíduo de aminoácido Asn-23 na sequência da ocellatina-F1, a fim de otimizar ainda mais as suas atividades biológicas, estruturais e capacidade de formação de poros parecem ser bastante relevantes.

5 Referências bibliográficas

Agostini, F. P., Soares-Pinto, D. de O., Moret, M. A., Osthoff, C., Pascutti, P. G. Generalized simulated annealing applied to protein folding studies. *Journal of Computational Chemistry*. v. 27, n. 11, p. 1142-55, 2006.

Archilha, N. L. Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolipídeos. Dissertação de Mestrado - Instituto de Física, USP, São Paulo, 2009.

Al-Abdul-Wahid, M. S., Neale, C., Pomès, R., Prosser, R. S. A. Solution NMR Approach to the Measurement of Amphiphile Immersion Depth and Orientation in Membrane Model Systems. *Journal of the American Chemical Society*. v.131, p. 6452-9, 2009.

Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. v. 8, n. 3, p. 211-21, 2004.

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

Armstrong, K., Baldwin, R. L. Charged histidine affects alpha-helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges. *Proceedings of the national academy of sciences of the U. S. A.*, v. 90, p. 11337- 40, 1993.

Barbosa, B.P.A., Estudos por ressonância magnética nuclear das estruturas dos peptídeos Homotarsinina e Lyetx IMN Δ KAC e do alinhamento magnético de bicelas fosfolipídicas. Tese de Doutorado - Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2016.

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

Bax, A.; Davis, D. G. MLEV-17-Based Two Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, v. 65, p. 355- 60, 1985.

Bechinger, B. Towards membrane protein design: pH sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *Journal of Molecular Biology*. v. 263, p. 768-75, 1996.

Bechinger, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1462, p.157-83, 1999.

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

Bechinger, B., Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1758, p. 1529–39, 2006.

Bechinger, B., Resende, J., M., Aisenbrey, C. The structural and topological analysis of membrane-associated polypeptides by oriented solid-state NMR spectroscopy: Established concepts and novel developments. *Biophysical Chemistry*. v.153, p.115-25, 2011.

Bechinger, B., Salnikov, E. S. Lipid-controlled peptide topology and interactions in bilayers: structural insights into the synergistic enhancement of the antimicrobial activities of PGLa and magainin 2. *Biophysical Journal*. v. 16, n. 100(6), p.1473-80, 2011.

Berjanskii, M. V., Wishart, D. S. A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society*. v. 2, n. 127(43), p.14970-1, 2005.

Bi, X., Wang, C., Ma, L., Sun, Y., Shang, D. Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. *Journal of Applied Microbiology*. v. 115, p. 663–72, 2013.

Blondelle, S. E., Lohner, K., Aguilar, M. I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1462, p. 89-108, 1999.

Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. v.3, p.238-50, 2005.

Brünger, A. T.; Adams, P. D. e Rice, L. M. New applications of simulated annealing in X-ray crystallography and solution NMR. *Structure*, v.5, n.3, p.325-36, 1997.

Brunger, A. T., Krukowski, A., Erickson, J. W. Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, v.46, n.7, p.585-93, 1990.

Buck, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. v. 31, n. 3, p. 297-355, 1998.

Cabrera, M. P. S. Estudo da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas. Tese doutorado - Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

Calderon, L. A., Silva, A. A. E., Ciancaglini, P., Stábeli, P. G. Antimicrobial peptides from phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino Acids*. v. 40, p. 29-49, 2011.

Campana, E. H., Carvalhaes, C. G., Barbosa, P. P., Machado, A. M. O., Paula, A. M., Gales, A. C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Etest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 47, p. 157-164, 2011.

Caprino, L. A., Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *Journal of Organic Chemistry*. v. 37, p. 3404-09, 1972.

Cardozo-Filho, J. L.; Soares, A. A.; Bloch, C., Jr.; Silva, L. P.; Stabeli, R. G.; Calderon, L. A. Identification of peptides from Amazonian *Leptodactylus knudseni* skin secretion by MALDI TOF/TOF. UniProtKB/Swiss-Prot. P86711 (OCEK1_LEPKN) Reviewed. 2010; <http://www.uniprot.org/uniprot/P86711>, acessado 06 março de 2017.

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

Chen, W., Yin, X., Yin, Y. Rapid and Reliable Peptide de Novo Sequencing Facilitated by Microfluidic Chip-Based Edman Degradation. *Journal of Proteome Research*, v.7, p.766–70, 2008.

Collawn, J.F., Bebök, Z. Structure and Functions of Biomembranes, Current Topics in Membranes. V. 61, p. 1–21, 2008.

Conlon, J. M., Al-Ghaferi, N., Abraham, B., Sonnevend, A., King, J. D., Nielsen, P. F. Purification and Properties of Laticeptin, an Antimicrobial Peptide from Skin Secretions of the South American Frog *Leptodactylus laticeps*. *Protein and Peptide Letters*. v. 13, p. 411-415, 2006.

Conlon, J. M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. *Peptides*. v. 29, p. 1631–1632, 2008.

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

Costa, J.P., Cova, M., Ferreira, R., Vitorino, R. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 99, n. 5, p. 2023-40, 2015.

Costa, T. O. G., Almeida, R. A., Melo, J. T., Koolen, H. H. F., Silva, F. M. A., Leite, J. R. S. A., Prates, M. V., Bloch, C. Jr., Pinto A. C. Isolation and Amino Acid Sequencing by MALDI-TOF-MS/MS of a Novel Antimicrobial Anionic Peptide from the Skin Secretion of *Osteocephalus taurinus* (Anura, Hylidae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 23, p. 2133-6, 2012.

Dathe, M., Schümann, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O., Bienert, M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry*, v. 35, p. 12612-22, 1996.

Dathe, M., Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1462, p. 71-87, 1999.

Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. Specificity and mechanism of action and of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal*. v.351, p.95-105, 2000.

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

Escribá, P.V., Busquets, X., Inokuchi, J., Balogh, G., Török, Z., Horváth, I., Harwood, J.L., Vígh, L. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Prog Lipid Res*. v. 59, p. 38-53, 2015.

Fändrich, M., Dobson, C. M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO Journal*. V. 1(21), p. 5682-90, 2002.

Fillion, M., Noël, M., Lorin, A., Voyer, N., Auger, M. Investigation of the mechanism of action of novel amphipathic peptides: insights from solid-state NMR studies of oriented lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1838, n. 9, p. 2173-9, 2014.

Dolci, A., Panteghini, M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clinica Chimica Acta*. 2013.

Dourado, F. S., Leite, J. R., Silva, L. P., Melo, J. A., Bloch, C. Jr., Schwartz, E. F. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus sypfax*. *Toxicon*. v. 50, n. 4, p. 572-80, 2007.

Edman, P., Högfeltdt, E., Sillén, LG., Kinell, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. v. 4, p. 283–93, 1950.

Edman, P., Begg, O., A Protein Sequenator, *European Journal of Biochemistry*. v. 1, p. 80-91, 1967.

Edwards, K. A., Baeumner, A. J. Analysis of liposomes. *Talanta*. v. 68, p. 1432–41, 2006.

Eisenberg, D., Schwarz, E., Komarony, M., Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*. v. 179, p. 125-42, 1984.

Ferreira, R. V. Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados. Tese Doutorado - Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2013.

Frost, D. R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.6. 2013. Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Accessed 15 Sept 2016.

Gesell, J., Zasloff, M., Opella, S. J. Two-dimensional ¹H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an α -helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 9, p. 127–35, 1997.

Giovannini, M. G., Poulter, L., Gibson, B. W., Williams, D. H. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochemical Journal*. v. 243, p. 113-20, 1987.

Góngora-Benítez, M., Tulla-Puche, J., Albericio, F. Handles for Fmoc Solid-Phase Synthesis of Protected Peptides. *ACS Combinatorial Science*. v. 15, p. 217–28, 2013.

Gopal, R., Kim, Y. J., Seo, C. H., Hahma, K. S., Parka, Y. Reversed sequence enhances antimicrobial activity of a synthetic peptide. *Journal of Peptide Science*. v. 17, p. 329–34, 2011.

Greenfield, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*. v. 235, n. 1, p. 1-10, 1996.

Hara, T., Mitani, Y., Tanaka, K., Uematsu, N., Takakura, A., Tachi, T., Kodama, H., Kondo, M., Mori, H., Otaka, A., Nobutaka, F., Matsuzaki, K. Heterodimer formation between the Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa in Lipid Bilayers: A Cross-Linking Study. *Biochemistry*. v. 40, n. 41, p. 12395-9, 2001.

Hale, J. D., Hancock, R. E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. v. 5, n. 6, p. 951-9, 2007.

Hancock, R. E. W., Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*. v.16, n.2, p.82-8, 1998.

Haney, E. F., Vogel, H.J. NMR of Antimicrobial Peptides. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. v. 65, p. 1-51, 2009.

Hansen, S. K., Bertelsen, K., Paaske, B., Nielsen, N. C., Vosegaard, T. Solid-state NMR methods for oriented membrane proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. v. 88–89, p. 48–85, 2015.

Ilić, N., Novković, M., Guida, F., Xhindoli, D., Benincasa, M., Tossi, A., Juretić, D. Selective antimicrobial activity and mode of action of adepantins, glycine-rich peptide antibiotics based on anuran antimicrobial peptide sequences. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1828, p. 1004–12, 2013.

Johnson, R. S., Martin, S. A, Biemann, K., Stults, J. T., Watson, J. T. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Analytical Chemistry*. v. 59, n. 21, p. 2621-5, 1987.

Kang, S. J., Kim, D. H., Mishig-Ochir, T., Lee, B. J. Antimicrobial Peptides: Their Physicochemical Properties and Therapeutic Application, *Archives of Pharmacal Research*. v. 35, n. 3, p. 409-13, 2012.

Karabancheva-Christova, T. G., Carlsson, U., Balali-Mood, K., Black, G. W., Christov, C. Z. Conformational Effects on the Circular Dichroism of Human Carbonic Anhydrase II: A Multilevel Computational Study. *PLOS ONE*. v. 8, n. 2, 2013.

Katayama, H., Ohira, T., Aida, K., and Nagasawa, H. Significance of a carboxylterminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides*, v. 23, p. 1537-46, 2002.

Kellner, R., Talbo, G., Houthaeve, T., Mann, M. Edman Degradation and MALDI Sequencing Enables N- and C-Terminal Sequence Analysis of Peptides. *Techniques in Protein Chemistry*. v.6, p. 47–54, 1995.

Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 10, n. 2, p. 119-39, 2005.

King, J. D., Rollins-Smith, L. A., Nielsen, P. F., John A., Conlon, J. M. Characterization of peptide from skin secretions of male specimens of the frog, *Leptodactylus fallax* that stimulates aggression in male frogs. *Peptides*. v. 26, n. 4, p. 597-601, 2005.

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

Laadhari, M., Arnold, A. A., Gravel, A. E., Separovic, F., Marcotte, I. Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by 2H solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. v. 1858, n. 12, p. 2959–64, 2016.

Ladokhin, A. S., Fernández-Vidal, M., White, S. H. CD Spectroscopy of Peptides and Proteins Bound to Large Unilamellar Vesicles. *Journal of Membrane Biology*. v. 236, p. 247–53, 2010.

Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M W., Kaptein, R., Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 8, n. 4, p. 477–86, 1996.

Lazarev, V. N., Govorun, V. M. Antimicrobial Peptides and Their Use in Medicine. *Applied Biochemistry and Microbiology*. v. 46, n. 9, p. 803–14, 2010.

Lee, D., Walter, K. F. A., Brückner, A. K., Hilty, C., Becker, S., Griesinger, C. Bilayer in Small Bicelles Revealed by Lipid-Protein Interactions Using NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. v. 130, p. 13822-23, 2008.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

Leite, J. R., Silva, L. P., Rodrigues, M. I., Prates, M. V., Brand, D. G., Lavaca, B. M., Azevedo, R. B., Bocca, A. L., Albuquerque, S., Bloch, C. Jr. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. v. 26, n. 4, p. 565-73, 2005.

Leite, J.M.A., Jr., Silva, L.P., Silva-Leite, R.R., Ferrari, A.S., Noronha, S.E., Silva, H.R., Bloch, C.Jr., Leite, J.R.S.A.J. *Exp. Zool.* v. 313 (A), p. 1–8, 2010.

Libério, M. S., Bastos, I. M. D., Júnior, O. R. P., Fontes, W., Santana, J. M., Castro, M. S. The Crude Skin Secretion of the Pepper Frog *Leptodactylus labyrinthicus* Is Rich in Metallo and Serine Peptidases. *Plos One*. v. 9, n. 6, 2014.

Libério, M. S., Joanitti, G. A., Azevedo, R. B., Cilli, E. M., Zanotta, L. C., Nascimento, A. C., Sousa, M. V., Pires Júnior, O. R., Fontes, W., Castro, M. S. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. *Amino Acids*. v.40, n.1, p. 51-9, 2011.

Libério, M. S. Caracterização química e biológica da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus*: peptídeos antimicrobianos e anticarcinogênicos, fosfolipases e peptidases. Tese doutorado - Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Lobas, A. A., Verenchikov, A. N., Goloborodko, A. A., Levitsky, L. I., Gorshkov, M. V., Combination of Edman degradation of peptides with liquid chromatography/mass spectrometry workflow for peptide identification in bottom-up proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. v.27, p. 391–400, 2013.

Machado, L.D., de Carvalho, E.V., Silva, F.V., Cabreira, P.V., Franco, O.L. Elucidating Unusual Modes of Action and Resistance of Antibacterial Peptides. *Curr Top Med Chem*. v. 17, n. 5. p. 520-536, 2017.

Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M. Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. *Química Nova*. v. 27, n. 5, 2004.

Manzini, M. C. Efeito da carga dos lipossomas na interação do BP100 em modelos de membrana. Dissertação Mestrado - Instituto de Química, USP, São Paulo, 2011.

Marani, M. M., Dourado, F. S., uelemes, P., Araujo, A. R., Perfeito, M. L., Barbora, E. A., Éras, L. M., Coelho, A. L., Andrade, E. B., Eaton, P., Longo, J. P., Azevedo, R. B., Delerue-Matos, C., Leite, J. R. Characterization and biological activities of Ocellatin peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. *Journal of Natural Products*. v. 78, n. 7, p. 1495-504, 2015.

Marr, K. A., Seidel, K., White, C., Bowden, R. A. Candidemia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients: Evolution of Risk Factors after the Adoption of Prophylactic Fluconazole. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 181, n. 1, p. 309-16, 2000.

Mason, A. J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B. The antibiotic and DNA transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes, *FASEB Journal*, v. 20, p. 320-22, 2005.

Matsuzaki, K., Nakamura, A., Murase, O., Sugishita, K., Fujii, N., Miyajima, K., Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry*. v.36, p. 2104-11, 1997.

Merrifield, R. B. "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide". *Journal of the American Chemical Society*. v. 85, n. 14, p. 2149-54, 1963.

Merz W. G., *Candida Lusitaniae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 20, n. 6, p. 1194-95, 1984.

Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, v. 61, n. 46, p. 10827–52, 2005.

Murray, Robert K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A. *Bioquímica Ilustrada de Harper (Lange)*. 29. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

Nascimento, A. C. C., Wagner Fontes, W., Antonio Sebben, A., Mariana S. Castro, M. S. Antimicrobial Peptides From Anurans Skin Secretions. *Protein and Peptide Letters*. v. 10, n. 3, p. 227-38, 2003

Nascimento, A. C., Zanotta, L. C., Kyaw, C. M., Schwartz, E. N., Schwartz, C. A., Sebben, A., Sousa, M. V., Fontes, W., Castro, M. S. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion os the South Américan frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). *The Protein Journal*. v. 23, n. 8, p. 501-8, 2004.

Nascimento, A., Chapeaurouge, A., Perales, J., Sebben, A., Sousa, M. V., Fontes, W., Castro, M. S. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. *Toxicon*. v. 50, p. 1095–1104, 2007.

National Commitee for Clinical Laboratory Standarts - NCCLS . *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, p.19087-1898, USA, 2003.)

National Commitee for Clinical Laboratory Standarts - NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, p.19087-1898, Estados Unidos, 2002.

Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil, 2002.

Neto, R. S. C., Vigerelli, H., Jared, C., Antoniazzi, M. M., Chaves, L. B., da Silva, L. C. R., de Melo, R. L., Sciani, J. M., Pimenta, D. C. Synergic effects between ocellatin-F1 and bufotenine on the inhibition of BHK-21 cellular infection by the rabies virus. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. v. 21(50), 2015.

Nilges, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M. Determination of threedimensional structures of proteins from interproton distance data by dynamical simulated annealing from a random array of atoms Circumventing problems associated with folding. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, v. 239, n. 1, p. 129-36, 1988.

Oren, Z., Shai, Y. Cyclization of a Cytolytic Amphipathic α -Helical Peptide and Its Diastereomer: Effect on structure, Interaction with Model Membranes, and Biological Function. *Biochemistry*. v. 39, n. 20, p. 6103-14, 2000.

Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Carver, J. A., Bowie, J. H. Investigating the importance of the Flexible Hinge in Caerin 1.1: Solution Structures and Activity of Two Synthetically Modified Caerin Peptides. *Biochemistry*. v. 43, p. 937-944, 2004.

Pereira, H. A. Novel Therapies Based on Cationic Antimicrobial Peptides. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. v. 7, p. 229-34, 2006.

Piantini, U., Sørensen, O. W., Ernst, R. R. Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks. *Journal of the American Chemical Society*, v. 104, p. 6800-1, 1982.

Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P., Nascimento, N. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. v. 20, n. 1, p. 53-69, 2013.

Prates, M. V. Peptídeos Catiônicos de *Phyllomedusa Tarsius* (Amphibia): estrutura e atividade biológica. Dissertação de Mestrado - UnB, Brasília, 1999.

Pukala, T. L., Brinkworth, C. S., Carver, J. A., Bowie, J. H. Investigating the importance of the flexible hinge in caerin 1.1: solution structures and activity of two synthetically modified caerin peptides. *Biochemistry*. v. 3, n. 43(4), p. 937-44, 2004.

Reddy, K. V. R., Yedery, R.D., Aranha, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 24, p. 536-47, 2004.

Reid, G. E., Tichy, S. E., Pérez, J., O'Hair, R. A. J., Simpson, R. J., Kenttälmaa, H. I., N-Terminal Derivatization and Fragmentation of Neutral Peptides via Ion-Molecule

Reactions with Acylium Ions: Toward Gas-Phase Edman Degradation? *J. American Chemical Society*. v. 123, p. 1184-1192, 2001.

Resende, J. M., Moraes, C.M., Prates, M.V., Cesar, A., Almeida, F. C. L., Mundim, N. C. C. R., Valente, A. P., Bemquerer, M. P., Piló-Veloso, D., Bechinger, B. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: The role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. *Peptides*. v. 29, p. 1633-44, 2008.

Resende, J. M., Mendonça Moraes, C., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v. 106, p. 16639-44, 2009.

Resende, J. M., Verly, R. V., *et al.* Manuscrito em preparação. Membrane interactions of Phylloseptin-1, -2, and -3 peptides by oriented solid-state NMR spectroscopies. 2014.

Rollins-Smith, L. A., King, J. D., Nielsen, P. F., Sonnevend, A., Conlon, J. M. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). *Regulatory Peptides*. v. 15, n. 124, p. 173-8. 2005.

Santos, D. M., Verly, R. M., Piló- eloso, D., Maria M. • Carvalho, M. A. R., Cisalpino, P. S., Soares, B. M., Diniz, C. G., Farias, L. M., Moreira, D. F. F., Frézard, F., Bemquerer, M. P., Pimenta, A. M. C., Lima, M. E. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids*. v. 39, p. 135-44, 2010.

Schmidtchen, A., Pasupuleti, M., Malmsten, M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. *Advances in Colloid and Interface Science*. v. 8686, n. 13, p. 75-4, 2013.

Seelig, J. Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1331, p. 103-16, 1997.

Seo, M. D., Won H. S., Kim, J. H., Mishig-Ochir, T., Lee, B. J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*. v. 17, p. 12276-86, 2012.

Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., Dyson, H. J. Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *Journal of the American Chemical Society*. v. 123(13), p. 2970-8, 2001.

Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. v. 66, n. 4, p. 236-48, 2002.

Shen, Y., Bax, A. Protein structural information derived from NMR chemical shift with the neural network program TALOS-N. *Methods in Molecular Biology*. v. 1260, p. 17-32, 2015.

Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G., Bax, Ad. TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 44, n. 4, p. 213–223, 2009.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D. G., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. v. 7, n. 539, p. 2011-75, 2011.

Silva, C. N., Nunes, K. P., Torres, F. S., Cassoli, J. S., Santos, D. M., Almeida, F. M., Matavel, A., Cruz, J. S., Santos-Miranda, A., Nunes, A. D., Castro, C. H., Machado de Ávila, R. A., Chávez-Olórtegui, C., Láuar, S. S., Felicori, L., Resende, J. M., Camargos, E. R., Borges, M. H., Cordeiro, M. N., Peigneur, S., Tytgat, J., de Lima, M. E. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a *Phoneutria nigriventer*. Toxin, Potentiates Erectile Functions via No/cGMP. *Journal of Urology*. v. 194, n. 4, p. 1481-90, 2005.

Sorkin, R., Kampf, N., Dror, Y., Shimoni, E., Klein, J. Origins of extreme boundary lubrication by phosphatidylcholine liposomes. *Biomaterials*. v. 34, n. 22, p. 5465-75, 2013.

Sousa, J.C., Berto, R.F., Gois, E. A., Fontenele-Cardi, N. C., Honório, J. E. Jr., Konno, K., Richardson, M., Rocha, M. F., Camargo, A. A., Pimenta, D.C., Cardi, B. A.,

Carvalho, K. M. Leptoglycin: a new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). *Toxicon*. v. 54, n. 1, p. 23-32, 2009.

Sreerama, N., Woody, R. W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*. v. 287, n. 2, p. 252-60, 2000.

Sreerama, N., Woody, R. W. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science*. v. 13, p. 100-12, 2004.

Stillwell, W. An Introduction to Biological Membranes: Composition, Structure and Function. *Elsevier Science*, 590p, 2016.

Strandberg, E., Ulrich, A. S. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*. v. 23A, n. 2, p. 89-120, 2004.

Surewicz, W. K., Mantsch H. H., Chapman, D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry*. v. 19, n. 32(2), p. 389-94, 1993.

Takeuchi, K., Takahashi, H., Sugai, M., Iwai, H., Kohno, T., Sekimizu, K., Natori, S., Shimada, I. Channel-forming Membrane Permeabilization by an Antibacterial Protein, Sapecin: determination of membrane-buried and oligomerization surfaces by NMR. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 279, n.6, p. 4981-87, 2004.

Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*. v. 51, n. 2, p. 149-77, 2012.

Toh, M. R., Chiu, G. N. C. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 8, n. 2, p. 88-95, 2013.

Verly, R. M., Rodrigues, M. A., Daghasanli, K. R., Denadai, A. M., Cuccovia, I. M., Bloch, C. Jr., Frézard, F., Santoro, M. M., Piló-Veloso, D, Bemquerer, M. P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. *Peptides*. v. 29, n. 1, p. 15-24, 2008.

Verly, R. M., de Moraes, C. M., Resende, J. M., Aisenbrey, C., Bemquerer, M. P., Piló-Veloso, D., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Bechinger, B. Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by Multidimensional Solution and Oriented ^{15}N and ^{31}P Solid-State NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal*. v. 96, n. 6, p. 2194–203, 2009.

Verly, R. M. Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos. Tese de Doutorado - Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, 2010.

Verly, R. M., Resende, J. M., Magalhães, M. T. Q., *et al.* Manuscrito, Structural and thermodynamic studies of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin in biomimetic environments. 2016.

Voievoda, N., Therese Schulthess, T., Bechinger, B., Seelig, J. Thermodynamic and Biophysical Analysis of the Membrane-Association of a Histidine-Rich Peptide with Efficient Antimicrobial and Transfection Activities. *The Journal of Physical Chemistry*. v. 119, n. 30, p. 9678-87, 2015.

Vold, R. R., Prosser, R. S., Deese, A. J. Isotropic solutions of phospholipids bicelles: A new membrane mimetic for high resolution NMR studies of polipeptides. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 9, p. 329-51, 1997.

Walk, T. B., Submuth, R., Kempter, C., Gnau, V., Jack, R. W., Jung, G., Identification of Unusual Amino Acids in Peptides Using Automated Sequential Edman Degradation Coupled to Direct Detection by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry. *Biopolymers*. v. 49, p. 329–40, 1999.

Wang, G., Li, X., Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*. v. 44, p. 1087-93, 2016.

Wang, K., Yan, J., Chen, R., Dang, W., Zhang, B., Zhang, W., Song, J., Wang, R. Membrane-Active Action Mode of Polybia-CP, a Novel Antimicrobial Peptide Isolated from the Venom of Polybia paulista. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 56, n. 6, p. 3318, 2012.

Warschawski, D. E., Arnold, A. A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, É., Marcotte, I. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1808, n. 8, p. 1957-74, 2011.

Wegener, K. L., Carver, J. A., Bowie, J. H. The Solution Structures and Activity of Caerin 1.1 and Caerin 1.4 in Aqueous Trifluoroethanol and Dodecylphosphocholine Micelles. *Biopolymers*. v. 69, n. 1, p. 42–59, 2003.

Westerhoff, H. V., Zasloff, M., Rosner, J. L., Hendler, R. W., De Waal, A., Vaz Gomes, A., Jongma, P. M., Riethorst, A., Juretić, D. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *European Journal of Biochemistry*. v. 228, n. 2, p. 257-64, 1995.

Whitmore, L., Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*. v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. v. 3, n. 2, p.163-75, 2008.

Wilken, J., Kent, S. B. H. Chemical protein synthesis. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 9, p. 412-26, 1998.

Wilker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bernel, W. Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 31, p. 287-92, 1993.

Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology*. v. 15, n. 15(5), p. 905-17, 2010.

Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S., Sykes, B. D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR*. v. 5, n. 1, p.67-81, 1995.

Wishart, D. S., Sykes, B. D., Richards, F. M. The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry*. v. 18, n. 31(6), p. 1647-51, 1992.

Wong, H., Bowie, J. H. Carver, J. A. The solution structure and activity of caerin 1.1, an antimicrobial peptide from the Australian green tree frog, *Litoria splendida*. *European Journal of Biochemistry*. v. 247, p. 545-557, 1997.

Wüthrich, K. The development of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for protein structure determination. *Accounts of Chemical Research*. v. 22, n. 1, p. 36–44, 1989.

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

Xu, X., Lai, R. The Chemistry and Biological Activities of Peptides from Amphibian Skin Secretions. *Chemical Reviews*. v. 115, n. 4. 1760-846, 2015.

Zelezetsky, I., Tossi, A. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1758, p. 1436–1449, 2006.

Zhanga, D., Liua, H., Zhangc, S., Chenc, X., Li, S., Zhanga, C., Bid, X. H. K., Chend, X., Jiang, Y., An effective method for de novo peptide sequencing based on phosphorylation strategy and mass spectrometry. *Talanta*. v. 84, p. 614–622, 2011.

Zhao, H. Mode of Action of Antimicrobial Peptides. Dissertação acadêmica - Institute of Biomedicine, University of Helsinki, Helsinki, 2003.

6 Anexos

6.1 Anexo A

06/03/2017

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Account Info

Help



Chapter: Chapter 1 Structure and Functions of Biomembranes
Book: Current Topics in Membranes
Author: James F. Collawn, Zsuzsa Bebök
Publisher: Elsevier
Date: Jan 1, 2008

Logged in as:
Karla Gusmão
Account #:
3001071721

LOGOUT

Copyright © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Karla Gusmão ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your order details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License number	Reference confirmation email for license number
License date	Mar, 06 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Current Topics in Membranes
Licensed Content Author	James F. Collawn, Zsuzsa Bebök
Licensed Content Date	2008
Licensed Content Volume	61
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	21
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Português
Order reference number	
Original figure numbers	FIGURE 1
Title of your thesis/dissertation	Sequenciamento, síntese, atividade biológica e estudos estruturais por RMN de peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>
Expected completion date	Nov 2016
Estimated size (number of pages)	120
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Minas Gerais 3100-480 Brazil Attn: Karla Gusmão
Billing Type	Invoice
Billing address	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Brazil 3100-480 Attn: Karla Gusmão
Total	0.00 USD

CLOSE WINDOW

Copyright © 2017 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/2

6.2 Anexo B

11/10/2016

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Account Info

Help



ACS Publications
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Title: Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model

Logged in as:

Karla Gusmão

LOGOUT

Author: William C. Wimley

Publication: ACS Chemical Biology

Publisher: American Chemical Society

Date: Oct 1, 2010

Copyright © 2010, American Chemical Society

Quick Price Estimate

Permission for this particular request is granted for print and electronic formats, and translations, at no charge. Figures and tables may be modified. Appropriate credit should be given. Please print this page for your records and provide a copy to your publisher. Requests for up to 4 figures require only this record. Five or more figures will generate a printout of additional terms and conditions. Appropriate credit should read: "Reprinted with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

I would like to... ?	<input type="text" value="reuse in a Thesis/Dissertation"/>	<p>This service provides permission for reuse only. If you do not have a copy of the article you are using, you may copy and paste the content and reuse according to the terms of your agreement. Please be advised that obtaining the content you license is a separate transaction not involving Rightslink.</p> <p>Note: Individual Scheme and Structure reuse is free of charge and does not require a license. If the scheme or structure is identified as a Figure in the article, permission is required.</p>
Requestor Type ?	<input type="text" value="Non-profit"/>	
Portion ?	<input type="text" value="Table/Figure/Micrograph"/>	
Number of Table/Figure/Micrographs ?	<input type="text" value="1"/>	
Format ?	<input type="text" value="Print"/>	
Select your currency	<input type="text" value="USD - \$"/>	
Quick Price	<input type="text" value="Click Quick Price"/>	
<input type="button" value="QUICK PRICE"/> <input type="button" value="CONTINUE"/>		

To request permission for a type of use not listed, please contact [the publisher](#) directly.

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

6.3 Anexo C

11/10/2016

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 11, 2016

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

License Number	3966200467763
License date	Oct 11, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics
Licensed Content Title	How to study proteins by circular dichroism
Licensed Content Author	Sharon M. Kelly,Thomas J. Jess,Nicholas C. Price
Licensed Content Date	10 August 2005
Licensed Content Volume Number	1751
Licensed Content Issue Number	2
Licensed Content Pages	21
Start Page	119
End Page	139
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Order reference number	
Original figure numbers	Fig. 1
Title of your thesis/dissertation	Sequenciamento, síntese, atividade biológica e estudos estruturais por RMN de peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>
Expected completion date	Nov 2016
Estimated size (number of pages)	120
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Minas Gerais 3100-480 Brazil Attn: Karla Gusmão
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServ/let>

1/5

6.4 Anexo D

11/10/2016

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 11, 2016

This Agreement between Karla Gusmão ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3966220250601
License date	Oct 11, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	The EMBO Journal
Licensed Content Title	The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation
Licensed Content Author	Marcus Fändrich, Christopher M. Dobson
Licensed Content Date	Nov 1, 2002
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Fig. 1
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Sequenciamento, síntese, atividade biológica e estudos estruturais por RMN de peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>
Expected completion date	Nov 2016
Expected size (number of pages)	120
Requestor Location	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Minas Gerais 3100-480 Brazil Attn: Karla Gusmão
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing Address	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Brazil 3100-480 Attn: Karla Gusmão
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/5

6.5 Anexo E

12/10/2016

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 12, 2016

This Agreement between Karla Gusmão ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3966570723137
License date	Oct 12, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Computational Chemistry
Licensed Content Title	Generalized simulated annealing applied to protein folding studies
Licensed Content Author	Flavia P. Agostini,Diogo De O. Soares-Pinto,Marcelo A. Moret,Carla Osthoff,Pedro G. Pascutti
Licensed Content Date	May 26, 2006
Licensed Content Pages	14
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Sequenciamento, síntese, atividade biológica e estudos estruturais por RMN de peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro <i>Leptodactylus labyrinthicus</i>
Expected completion date	Nov 2016
Expected size (number of pages)	120
Requestor Location	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Minas Gerais 3100-480 Brazil Attn: Karla Gusmão
Publisher Tax ID	EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing Address	Karla Gusmão Rua costa Monteiro, 144/601 Belo Horizonte, Brazil 3100-480 Attn: Karla Gusmão
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/5

