



**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**



**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Gabriele de Azevedo Cardoso**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LYETX-I  
PARA ESTUDOS BIOFÍSICOS E ESTRUTURAIS DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO-  
MEMBRANA**

**Diamantina - MG**

**2017**



**Gabriele de Azevedo Cardoso**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LYETX-I  
PARA ESTUDOS BIOFÍSICOS E ESTRUTURAIS DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO-  
MEMBRANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

Coorientador: Victor Hugo de Oliveira Munhoz

**Diamantina - MG**

**2017**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

C268s

Cardoso, Gabriele de Azevedo

Síntese e caracterização do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I para estudos biofísicos e estruturais de interação peptídeo-membrana / Gabriele de Azevedo Cardoso. – Diamantina, 2017.

101 p. : il.

Orientador: Rodrigo Moreira Verly

Coorientador: Victor Hugo de Oliveira Munhoz

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Peptídeo antimicrobiano. 2. Interação peptídeo-membrana.  
3. Relação estrutura atividade. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 547**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**GABRIELE DE AZEVEDO CARDOSO**  
**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO LYETX-I**  
**PARA ESTUDOS BIOFÍSICOS E ESTRUTURAIS DE INTERAÇÃO PEPTÍDEO-**  
**MEMBRANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

APROVADO EM: 28/04/2017

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. PATRÍCIA MACHADO DE OLIVEIRA – UFVJM

---

Prof. Dr. ÁLVARO DUTRA DE CARVALHO JUNIOR - UFVJM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIANA TORQUATO QUEZADO DE MAGALHÃES – UFMG

---

Prof. Dr. VICTOR HUGO DE OLIVEIRA MUNHOZ – UFVJM

---

Prof. Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY – UFVJM  
Presidente

DIAMANTINA

2017



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos e me conceder bênçãos que possibilitaram a realização desse trabalho. Aos meus pais Jovino e Geysa, que sempre foram exemplos de determinação e esforço, sem os quais nada disso seria possível. Sempre me incentivaram com entusiasmo a cumprir cada passo de minha formação acadêmica e celebraram comigo todas as conquistas. Com seu amor incondicional me prepararam para a vida, me ensinaram a ter fé, caráter, ética e honestidade. Aos meus irmãos Jovino Júnior, Gabriel, Tiago e à minha avó Maria Beatriz, pelos momentos de descontração e alegria que me trouxeram energia positiva e ânimo sempre. À Paula, que esteve presente ao longo de toda essa trajetória, me incentivou e dividiu comigo momentos de muita luta e persistência. Sempre incentivando e me proporcionando momentos, oportunidades, sentimentos únicos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Moreira Verly, que me recebeu de braços abertos, e me ofereceu inúmeras oportunidades durante esse período. Sempre paciente e dedicado, me ensinou muito, e serei sempre grata. Seus ensinamentos vão além da vida acadêmica. Ao meu coorientador Prof. Dr. Victor Hugo de Oliveira Munhoz, pelos ensinamentos e por sua contribuição no desenvolvimento desse trabalho, sempre disposto a ajudar. Com vocês tive oportunidade de amadurecer muito cientificamente.

À amiga e colaboradora Talita, pelos ensinamentos e contribuição ao longo deste período, que disponibilizou boa parte do seu tempo para me auxiliar em experimentos. Aos amigos do grupo de pesquisa LASEB Lívia, Isabela, Eduardo, Lúcio, Carlos Filipe que me receberam e ajudaram muito durante os primeiros passos no mestrado. Ao Luiz e à Carol que me propiciaram diversos momentos de conversas científicas ou não, muito proveitosas.

Aos professores Jarbas Magalhães Resende, Marcelo Porto Bemquerer, Mariana Torquato Quezado de Magalhaes, Luciano Morais Lião, Burkhard Bechinger que com as parcerias estabelecidas proporcionaram a realização de todos os experimentos.

Aos amigos que fiz em Diamantina, Heliandro, Fernando, Andrew, Flávia, que foram o meu suporte, minha companhia, e o aconchego em muitos momentos.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.





## RESUMO

A necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos cresce à medida que se torna maior a resistência de microrganismos aos antibióticos usualmente empregados. Nesse sentido, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma excelente alternativa para o desenvolvimento de novos antibióticos. O presente trabalho propôs a síntese do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I para estudos de mecanismo de ação em membranas bacterianas, empregando diferentes técnicas biofísicas e estruturais. O peptídeo LyeTx-I, composto por 24 resíduos de aminoácidos, foi isolado pela primeira vez do veneno de aracnídeos da espécie *Lycosa erythrognata*. Utilizando como técnicas principais a ITC e a RMN para obtenção de parâmetros cinéticos, termodinâmicos e da interação peptídeo-membrana, foi possível avaliar a relação estrutura e atividade do peptídeo LyeTx-I. Foram utilizadas ainda, técnicas complementares de CD, extravasamento de CF, fluorescência de Trp, DLS e, potencial zeta para obter informações adicionais acerca do modo de interação do peptídeo. Observou-se a predominância de conformação helicoidal do peptídeo LyeTx-I, tanto em meios biomiméticos zwitteriônicos, quanto em meios aniônicos. Em meios aniônicos, observou-se maior conteúdo de  $\alpha$ -hélice, bem como maior constante de interação, enquanto que em presença de ambientes zwitteriônicos foram observadas menor helicidade e constante de interação. Os dados termodinâmicos, obtidos para ambos os meios, mostraram que o processo de interação peptídeo-membrana é dirigido principalmente pela componente entrópica, uma vez que a componente entálpica é menor. Os dados estruturais e termodinâmicos foram coerentes com os demais estudos biofísicos. Foi observada a partir da análise de extravasamento de CF maior capacidade de formação de poros no meio aniônico. Os dados de fluorescência intrínseca de Trp e de supressão de fluorescência por acrilamida mostraram maior mudança de ambiente químico para apolar, do resíduo de Trp-2, quando em presença de meio biomimético aniônico. Dessa forma, o peptídeo apresenta maior capacidade de permeabilizar a membrana aniônica. Além disso, o estudo comparativo entre os meios zwitteriônicos e aniônicos, permitiu verificar que, embora a interação eletrostática seja importante para a interação peptídeo-membrana, a permeabilização do LyeTx-I na membrana fosfolipídica é fundamental para a lise celular. Dessa forma, este estudo mostra que o peptídeo LyeTx-I apresenta elevada preferência por interação com bicamadas fosfolipídicas aniônicas, o que faz dele um potencial agente bactericida.

**Palavras-chaves:** *Peptídeo antimicrobiano, interação peptídeo-membrana, relação estrutura atividade.*



## ABSTRACT

The demand for the development of new antimicrobial agents increases in line with the resistance of microorganisms to the antibiotics usually employed. In this sense, antimicrobial peptides (AMPs) appear as an alternative to the classical antibiotics. The present work proposed the synthesis of the antimicrobial peptide LyeTx-I for studies of mechanism of action in bacterial membranes using a set of biophysical and structural techniques. LyeTx-I peptide is composed of 24 amino acid residues and was isolated for the first time from the venom of the *Lycosa erythrognata* arachnid species. In order to evaluate the structure-activity relationship of the LyeTx-I, we have employed ITC and NMR as main techniques to obtain the kinetic, thermodynamic and structural parameters of the peptide-membrane interaction. Complementary measurements of CD, CF extravasation, Trp fluorescence, DLS and zeta potential were also used as additional information about the mode of action of the peptide. The  $\alpha$ -helical conformation of the LyeTx-I peptide was observed either in presence of zwitterionic and anionic biomimetic media. Nevertheless, a higher  $\alpha$ -helix content and interaction constant was observed for LyeTx-I in all anionic media when compared to the zwitterionic environments. The thermodynamic data gathered in both media, showed that the peptide-membrane interaction is driven mainly by the entropic contributions, since the enthalpic component is smaller. The structural and thermodynamic data were consistent with the complementary biophysical experiments. It was observed from the CF extravasation a greater capacity of pore formation in the anionic medium. Intrinsic Trp fluorescence showed also a greater change of the residue of Trp-2 to the apolar chemical environment in the presence of anionic biomimetic medium. In this way, the peptide presents a higher capacity to permeabilize the anionic membrane. In addition, the comparative study between the zwitterionic and anionic media, reveals that, although the electrostatic interaction is important to the peptide-membrane interaction, the permeabilization of the LyeTx-I peptide in the phospholipid membrane is fundamental for the cellular lysis. Finally, the study clearly shows the high preference of LyeTx-I for interacting anionic phospholipid bilayers, which makes it a potential bactericidal agent.

**Key words:** *Antimicrobial peptide, peptide-membrane interaction, structure-activity relationship.*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Estruturas secundárias de diferentes PAMs: em (A) estruturas $\alpha$ -helicoidais como a Mangainina 2 (PDB – 2MAG) e LL-37 (PDB – 2K6O); em (B) estruturas em $\beta$ -folhas de Protegrina 1 (PDB – 1PG1) e Lactoferricina Bovina (PDB – 1LFC); em (C) estruturas estendidas da Tiritricina (PDB – 1D6X) e Indolicidina (PDB – 1G89), em (D) o homodímero da Homotarsinina (Figura Adaptada de (Verly <i>et al.</i> , 2017) e em (E) estrutura quaternária da Distinctina (PDB – 1XKM). .....	8
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do mecanismo de formação de perturbação na membrana. Em A mecanismo carpete, em B formação de barril e em C mecanismo detergente. Fonte: Adaptado de (Bahar e Ren, 2013). .....	9
<b>Figura 3:</b> Representação de nOes de estrutura secundária em $\alpha$ -hélice. Possíveis correlações (A) intra residuais e (B) inter residuais de núcleos de hidrogênios. Fonte: Adaptado Wüthrich, 1986. ....	11
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo das restrições de distâncias derivadas de ligação de hidrogênio (A) com valores limites de distância. Estrutura $\alpha$ -hélice com representação, em amarelo, das três restrições de ligação de hidrogênio encontradas para essa molécula (B). (Fonte: Adaptada de Nabuurs 2004). .....	13
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo da ligação peptídica com indicação dos ângulos de rotação $\varphi$ e $\psi$ . .....	14
<b>Figura 6:</b> Diagrama de Ramachandran e regiões para a estrutura em $\alpha$ -hélice. Regiões mais favoráveis (preto), regiões adicionalmente permitidas (cinza escuro), regiões generosamente permitidas (cinza claro) e regiões proibidas (Fuscaldi <i>et al.</i> ). .....	15
<b>Figura 7:</b> Representações das possíveis orientações de interação transmembrana e paralela à bicamada fosfolipídica de um peptídeo em $\alpha$ -hélice, com os respectivos deslocamentos químicos característicos representados ao lado. Fonte: (Bechinger e Sizun, 2003). .....	16
<b>Figura 8:</b> Gráfico de fluxo de calor em função do tempo para uma titulação calorimétrica exotérmica. ....	18
<b>Figura 9:</b> Gráfico qualitativo de uma titulação isotérmica para uma substância que apresenta um sítio de complexação. Fonte: Adaptada de (Wiseman <i>et al.</i> , 1989). .....	19
<b>Figura 10:</b> Foto ilustrativa da seringa de polipropilino utilizada para a síntese. ....	24
<b>Figura 11:</b> Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc. Fonte: Adaptada de (Chan e White, 2000). ....	24

- Figura 12:** Estrutura química representativa dos ativadores do grupo carboxila DIC (A) e HOBT (B) e da resina polimérica (C) utilizada como suporte sólido na síntese do peptídeo, em que “R” representa a cadeia polimérica da resina. ....25
- Figura 13:** Fluxograma representativo da sequência de etapas para realização da SPFS, onde AA corresponde a aminoácido. ....27
- Figura 14:** Etapas da reação da ninidrina com grupos amino de resíduos de aminoácidos para detecção de amina primária livre (Teste de *Kaiser*)(Resende, 2008). ....39
- Figura 15:** Perfil de CLAE da amostra bruta da síntese de LyeTx-I (A) e  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I (B). Amostra injetada (100  $\mu\text{L}$  de uma solução a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em coluna C18 *Vydac* 218TP510 (250 mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  214 nm. ....40
- Figura 16:** Espectro de massas MALDI-ToF obtidos no modo positivo para amostra bruta (A) e purificada (B) para peptídeo LyeTx-I sintetizado sem marcação isotópica. Espectro de MALDI-ToF, obtido para amostra do peptídeo LyeTx-I marcada isotopicamente nas posições L-13 com  $^{15}\text{N}$  e A-18 com  $^2\text{H}_3$ , amostra bruta (C) e purificada (D). ....41
- Figura 17:** Principais ligações suscetíveis a quebras e nomenclatura proposta por *Roepstorff-Fohlmann-Biemann* para os fragmentos de cadeias peptídicas formados a partir da fragmentação via espectrometria de massa (Figura adaptada de (Asmelash, 2016)). ....42
- Figura 18:** Espectros de massa MALDI-ToF MS/MS do peptídeo LyeTx-I, mostrando os fragmentos obtidos a partir da amostra purificada, adquiridos no modo positivo em equipamento *Bruker-UltraFlex*. ....43
- Figura 19:** Agregados de moléculas anfifílicas utilizadas como meios biomiméticos. Estrutura representativa de micela (A), bicamada lipídica (B) e vesículas ou lipossomas (C). Fonte: Adaptado de (Verly, 2010). Estrutura representativa das moléculas de detergente DPC, SDS e dos fosfolipídeos POPC e POPG. ....45
- Figura 20:** Espectros de CD obtidos para LyeTx-I (10  $\mu\text{M}$ ) em (A) soluções aquosas e na presença de micelas de SDS (100, 200 e 400  $\text{mM}$ ) e (B) na presença de LUVs de POPC e POPC:POPG (500  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl 10  $\text{mM}$ . ....47
- Figura 21:** estrutura química representativa da 5(6)-carboxifluoresceína. ....47
- Figura 22:** Variação da intensidade de fluorescência devido à liberação de CF das LUVs encapsuladas, provocada pela adição de LyeTx-I em concentrações variadas. Em A estão representadas as curvas correspondentes à titulação de LyeTx-I em LUVs de POPC (1,0  $\text{mM}$ ), em B, as curvas correspondentes à titulação em LUVs de POPC:POPG (3:1) de mesma

concentração. As concentrações de peptídeo estão identificadas ao lado direito de cada curva.48

- Figura 23:** Gráfico de porcentagem de extravasamento de CF em função da razão molar peptídeo/LUVs. .... 49
- Figura 24:** Estrutura química representativa do Triptofano (Trp)..... 50
- Figura 25:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I (10  $\mu$ M) em solução tampão Tris-HCl (10 mM), na presença de meios micelares de DPC e SDS (200 mM) e vesiculares de POPC e POPC:POPG (500  $\mu$ M). Em destaque os comprimentos de onda máximos de emissão para cada espectro..... 51
- Figura 26:** Estrutura química representativa da acrilamida..... 52
- Figura 27:** Gráficos da razão de intensidade de fluorescência ( $I/I_0$ ) do LyeTx-I (10  $\mu$ M) em função da concentração de acrilamida. Cada regressão linear representa a supressão de fluorescência causada pela titulação com acrilamida (4 mM) em peptídeo livre (1), peptídeo em presença de meios micelares (200 mM) de DPC (2) e de SDS (3), e em presença de meios vesiculares (500  $\mu$ M) de POPC (4) e de POPC:POPG (5)]. As retas construídas a partir dos dados obtidos de  $\lambda_{\text{máx}}$  estão representadas em preto, e as construídas com os dados de CM, estão representadas em vermelho. .... 53
- Figura 28:** Constantes de *Stern-Volmer* ( $k_{sv}$ ) para o LyeTx-I em diferentes meios biomiméticos. .... 54
- Figura 29:** Isotermas de titulação calorimétrica obtidas a partir da titulação de LUVs de POPC (5 mM) e POPC:POPG (3:1) (5 mM) em solução de LyeTx-I (25  $\mu$ M). Gráfico de fluxo de calor para cada injeção de LUVs-POPC (A) e LUVs-POPC:POPG (B) em função do tempo. Ajuste não linear de entalpia por razão molar de POPC/LyeTx-I (C) POPC:POPG/LyeTx-I (D) com subtração dos respectivos calores de diluição. .... 57
- Figura 30:** Gráfico da variação do potencial zeta (A) e do diâmetro hidrodinâmico (B) de LUVs POPC (500  $\mu$ M) e POPC:POPG (500  $\mu$ M) para a titulação de 5  $\mu$ L de LyeTx-I (50  $\mu$ M). .... 59
- Figura 31:** Espectro de RMN unidimensional (1D) obtido para o peptídeo LyeTx-I (2 mM) em presença de SDS- $d_{25}$  (200 mM) (A). Ampliação da região de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}_\text{N}$  do espectro 1D (B). Experimento realizado em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE III 500, operando a 500,13 MHz para núcleos de  $^1\text{H}$ . .... 62
- Figura 32:** Esquema representativo dos sistemas de *spin* com os respectivos deslocamentos químicos característicos para os diferentes resíduos de aminoácido. Disponível em: <http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/proteins/chempro5.html>. Acesso em abril 2016. .... 63
- Figura 33:** Mapa de contornos  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY, obtido em espectrômetro 500 MHz com 2 mM

de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> . Região de interação $d_{\alpha N}$ , $d_{\beta N}$ , $d_{\gamma N}$ e $d_{\delta N}$ . .....	64
<b>Figura 34:</b> Mapas de contornos $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC e $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC obtidos em espectrômetro 500 MHz para 2 mM de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> (A) e 1 mM de LyeTx-I e 200 mM de SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> (B). .....	66
<b>Figura 35:</b> Ampliação das regiões de correlação $d_{\alpha N}(i, i+n)$ (A) e $d_{\alpha\beta}(i, i+n)$ (B) do NOESY, obtido em espectrômetro 500 MHz para 2 mM de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> . .....	67
<b>Figura 36:</b> Diagrama de conectividade de NOESY: sequenciais $\text{NH}_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ , $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ , $\text{H}\beta_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ , e de média distância $\text{NH}_{(i)}\text{-NH}_{(i+2)}$ , $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+2)}$ , $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+3)}$ , $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-H}\beta_{(i+3)}$ , $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+4)}$ . .....	68
<b>Figura 37:</b> Comparação das estruturas obtidas por RMN para o LyeTx-I na presença de micelas de SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> (A) e DPC- <i>d</i> <sub>38</sub> (B). Inicialmente a sobreposição da cadeia principal das 10 estruturas de menor energia, seguida da sobreposição com destaque para o resíduo de Trp-2, na porção <i>N</i> -terminal. Visão frontal das duas estruturas e proposta de orientação da interação com bicamadas fosfolipídicas. Coloridos em verde, estão representados os resíduos apolares e em azul os resíduos polares. ....	69
<b>Figura 38:</b> Diagrama de Ramachandran para as 10 estruturas de menor energia de LyeTx-I (2 mM) em SDS- <i>d</i> <sub>25</sub> (200 mM). .....	72
<b>Figura 39:</b> Espectro unidimensional de $^{31}\text{P}$ desacoplado de $^1\text{H}$ , obtido para a amostra de bicamadas mecanicamente orientadas de POPC a 93% de umidade relativa, contendo o peptídeo LyeTx-I. Espectro obtido em equipamento <i>Bruker</i> <sup>®</sup> AMX400 <i>wide-bore</i> operando a 162,0 MHz para $^{31}\text{P}$ . .....	73
<b>Figura 40:</b> Em (A) Espectro de $^{15}\text{N}$ desacoplado de $^1\text{H}$ , obtido em espectrômetro <i>Bruker</i> <sup>®</sup> AMX400 operando a 40 MHz. Em (B) de $^2\text{H}$ , obtidos em espectrômetro <i>Bruker</i> <sup>®</sup> AVANCE 300 <i>wide-bore</i> , operando. ....	74
<b>Figura 41:</b> Proposta de mecanismo de interação do peptídeo LyeTx-I com bicamadas lipídicas (representadas em rosa claro, sendo A aniônica e B zwitteriônica). .....	76
<b>Figura 42:</b> Estrutura química dos resíduos de aminoácidos utilizado para a síntese dos peptídeos. ....	95



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Derivados de aminoácidos utilizados para a síntese do peptídeo LyeTx-I com suas respectivas massas molares .....	25
<b>Tabela 2:</b> Condições aplicadas na realização das medidas de extravasamento de carboxifluoresceína para o peptídeo LyeTx-I.....	30
<b>Tabela 3:</b> Comprimento de onda da emissão máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de fluorescência e centro de massa (CM) dos espectros do LyeTx-I livre e em presença de meios biomiméticos.....	51
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUVs de POPC (5 mM) e LUVs de POPC:POPG (5 mM) em LyeTx-I (25 $\mu$ M) a 25 °C .....	57
<b>Tabela 5:</b> Dados de cálculos estruturais do LyeTx-I em presença de micelas de SDS- $d_{25}$ .....	72
<b>Tabela 6:</b> Condições e acompanhamento da síntese do peptídeo LyeTx-I .....	92
<b>Tabela 7:</b> Condições e acompanhamento da síntese do peptídeo $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I .....	93
<b>Tabela 8:</b> Tabela de deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos do LyeTx-I em SDS (200 mM) .....	96
<b>Tabela 9:</b> Tabela de restrições de ângulos diedros do LyeTx-I em presença de SDS (200mM).....	98
<b>Tabela 10:</b> Tabela de restrições de distância obtidas para o LyeTx-I em presença de micelas de SDS (200mM).....	99



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta G^0$	Energia livre de Gibbs
$\Delta H^0$	Entalpia padrão
$\Delta S^0$	Entropia padrão
1D	Unidimensional
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC	Coerência Heteronuclear de Simples-Quantum, do inglês <i>Heteronuclear Single-Quantum Coherence</i>
$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HMQC	Correlação Heteronuclear Múltiplo-Quantum, do inglês <i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
$^1\text{H}^1\text{H}$ -NOESY	Espectroscopia de Efeito <i>Overhauser</i> Nuclear, do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
$^1\text{H}^1\text{H}$ -TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total, do inglês <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AA	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
Boc	<i>t</i> -butoxicarbonila
CD	Dicroísmo Circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
CF	Carboxifluoresceína
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Centro de massa espectral
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DD k	Dermadistinctina K
$D_h$	Diâmetro Hidrodinâmico
DIC	<i>N, N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico, do inglês <i>Dynamic Light scattering</i>
DMF	<i>N, N</i> -Dimetilformamida
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>

DOPC	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPC	Dodecilsfosfocolina
DRV	Desidratação e Reidratação de Vesículas, do inglês <i>Dehydration/Rehydration Vesicles</i>
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato
EDT	1,2-etanoditiol
EM	Espectrometria de Massas
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> , do inglês <i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonila
H	Helicidade molar
HOBt	1-hidroxibenzotriazola
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HTr	Homotarsinina
Hz	Hertz
IPA	Álcool Isopropílico
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica, do inglês <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
$I_{uni}$	Índice de unicidade
$J$	Constante de acoplamento escalar
$K_{app}$	Constante aparente de interação
$K_{eq}$	Constante de equilíbrio
$K_p$	Constante de partição
$K_{sv}$	Constante de <i>Stern Volmer</i>
LUVs	Vesículas Unilamelares, do inglês <i>Large Unilamellar Vesicle</i>
LyeTx	Lycotoxinas
m/z	Razão entre a carga e a massa
MALDI-ToF-MS	Dessorção/ionização de Matriz Assistida por Laser acoplada com espectrometria de massa por tempo de voo, do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/ionization coupled with Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos

MLVs	Vesículas Multilamelares, do inglês <i>Multilamellar Vesicle</i>
<i>n</i>	Constante estequiométrica
nOes	Efeito nuclear Overhauser
ns	Número de varreduras, do inglês <i>number of scans</i>
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PDI	Índice de polidispersividade, do inglês <i>polydispersity index</i>
PIPE	4-metilpiperidina
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
POPG	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> - glicero-3-fosfoglicerol
ppm	Partes por milhão
PSVS	<i>Protein structure validation software</i>
QUEEN	Validação Quantitativa de Restrições Experimentais de RMN, do inglês <i>Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz Quadrada dos Desvios Médios Quadrados, do inglês <i>Root-Mean-Square Deviation</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecylsulfate</i>
SF	<i>so fast</i>
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
TPPI	Do inglês <i>Time Proportional Phase Incrementation</i>
sw	Janela espectral, do inglês <i>Spectral window</i>
T	Temperatura
TBI	<i>Triple Resonance Broadband Inverse</i>
TD	Domínio do tempo, do inglês <i>time domain</i>
TFA	Ácido Trifluoroacético, do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	Triisopropililano
ToF	Tempo de voo, do inglês <i>Time of flight</i>
<i>t<sub>r</sub></i>	Tempo de retenção
Tris	Tris-hidroxiaminometilmetano
trt	Trifenilmetila
UV-vis	Ultra violeta e visível

V

Volume

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\delta$	Deslocamento químico
$\psi$	Ângulo diedro psi
$\varphi$	Ângulo diedro phi
$\zeta$	Potencial zeta
$\lambda$	Comprimento de onda (nm)
$\Delta$	Varição
[ ]	Concentração





## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
ABSTRACT .....	v
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xvii
SUMÁRIO.....	xix
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs).....	3
2.2. Síntese de peptídeo em fase sólida.....	5
2.3. Relação estrutura atividade .....	6
2.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	10
2.5. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	17
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivos Gerais .....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
3. Metodologia.....	22
3.1 Materiais e Reagentes.....	22
3.2 Síntese do Peptídeo LyeTx-I.....	23
3.3 Purificação do Peptídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
3.4 Caracterização por Espectrometria de Massas e Sequenciamento.....	28
3.5 Preparação das LUVs .....	28
3.6 Quantificação de fosfolípídeo por espectrofotometria na região de Ultra-violeta e visível (UV-vis) .....	29

3.7 Dicroísmo Circular (CD) .....	29
3.8 Extravasamento com carboxifluoreína .....	29
3.9 Fluorescência de Triptofano (Trp).....	31
3.9.1 <i>Fluorescência intrínseca de Trp</i> .....	31
3.9.2 <i>Supressão de Fluorescência por acrilamida</i> .....	32
3.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) .....	32
3.11 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta .....	33
3.12 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução .....	33
3.13 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em fase sólida .....	36
4. Resultados e Discussões.....	38
4.1 Obtenção e caracterização do peptídeo LyeTx-I .....	38
4.2 Estudos estruturais e de interação em meios biomiméticos.....	43
4.2.1 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i> .....	46
4.2.2 <i>Extravasamento de Carboxifluoreína</i> .....	47
4.2.3 <i>Fluorescência intrínseca de Trp</i> .....	49
4.2.4 <i>Supressão de Fluorescência por acrilamida</i> .....	52
4.2.5 <i>Calorimetria de Titulação Isotérmica</i> .....	55
4.2.6 <i>Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial de superfície</i> .....	59
4.2.7 <i>Ressonância Magnética Nuclear em solução</i> .....	61
4.2.8 <i>Ressonância Magnética Nuclear em fase sólida</i> .....	73
5. Conclusões e perspectivas.....	77
6. Referências Bibliográficas .....	79
8. Anexo .....	90
8.1 Figuras e tabelas .....	90

## 1. Introdução

A LyeTx-I é um peptídeo antimicrobiano composto de 25 resíduos de aminoácidos (IWLTKLFLGKLNKHLAKQQLAKL-NH<sub>2</sub>), com caráter catiônico. Esse peptídeo é isolado do veneno da aranha *Lycosa erythrognatha*, também conhecida como aranha lobo (Yan e Adams, 1998). Estudos publicados em 2004 por Prates e colaboradores (Prates *et al.*, 2004), demonstraram que o LyeTx-I apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*) e atividade antifúngica (*Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*), acompanhada de uma baixa atividade hemolítica. Essas características fazem do LyeTx-I um potencial agente antimicrobiano e importante alvo de estudos (Yan e Adams, 1998; Prates *et al.*, 2004).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) representam a maior classe de peptídeos naturais e são encontrados em diversos organismos vivos. Além das propriedades antimicrobianas, esses peptídeos também têm apresentado atividades antitumorais, antivirais entre outras, que os colocaram em posição de destaque como alternativa para o desenvolvimento de novo arsenal terapêutico (Nguyen *et al.*, 2011). Em sua maioria os PAMs atuam como componente do sistema imune inato (Bachere *et al.*, 2004; Izadpanah e Gallo, 2005; Verly, 2010; Gaspar *et al.*, 2013). Esses peptídeos também são encontrados em grande quantidade em locais lesionados nos seres vivos, principalmente quando ocorrem processos inflamatórios (Izadpanah e Gallo, 2005; Jenssen, Håvard *et al.*, 2006)

O modo de ação dos PAMs vem sendo estudado, e alguns fatores indicam que esses compostos exercem suas atividades diretamente na membrana celular, ao invés de interagirem apenas com alvos intracelulares específicos como os antibióticos convencionais, o que dificulta o desenvolvimento de resistência bacteriana (Hancock e Sahl, 2006; Cho *et al.*, 2009). Os peptídeos antimicrobianos, em sua maioria, não apresentam conformação definida quando em solução aquosa. Entretanto, ao entrarem em contato com a bicamada fosfolipídica, adquirem uma conformação, ou estrutura secundária, que permite melhor interação com a membrana bacteriana (Bechinger, Burkhard e Lohner, Karl, 2006). Apesar de existirem diversas conformações possíveis, as estruturas secundárias mais comumente observadas para PAMs são a  $\alpha$ -hélice e a  $\beta$ -folha.

Os modelos de mecanismo de ação, atualmente propostos para peptídeos antimicrobianos indicam que a interação ocorre por uma contribuição dos efeitos

eletrostáticos e hidrofóbicos (Sanderson, 2005; Wang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). Entretanto, os mecanismos de permeabilização da membrana bacteriana ainda não são totalmente elucidados. Inicialmente, foram propostos três mecanismos para peptídeos estruturados em  $\alpha$ -hélice: *carpet-like* (formação de carpete), *barrel-stave* (formação de barril) e *detergent-like* (efeito detergente) (Shai, 2002; Bechinger, Burkhard e Lohner, Karl, 2006; Ong *et al.*, 2014). Mais recentemente, alguns mecanismos de ação de PAMs, como o de auto-associação, começaram a ser abordados. Esse fenômeno é mais comumente observado em peptídeos anfipáticos, uma vez que ele envolve a formação de superestruturas compostas por diversas cadeias peptídicas estabilizadas por interações intermoleculares, do tipo ligação de dissulfeto, entre si (Bahar e Ren, 2013; Lee *et al.*, 2013). Este fenômeno pode modificar a carga superficial, e a estrutura secundária, influenciando a interação de peptídeos com as membranas fosfolipídicas (Tian *et al.*, 2015). Alguns peptídeos que atuam em alvos intracelulares, também precisam atravessar a membrana celular e, portanto, interagir com ela de alguma maneira. O modo de ação intracelular pode envolver inibição da síntese de um determinado componente da parede celular, ou de componentes metabólicos da célula, além da inibição de atividade enzimática, ou ainda, alterações na formação da membrana citoplasmática (Ritchie *et al.*, 2009)

De modo geral, o processo de interação peptídeo-membrana é uma etapa importante para que os peptídeos desempenhem atividade biológica. A fim de aprofundar os estudos acerca do modo de interação de peptídeos, diversos meios biomiméticos podem ser preparados, tais como vesículas fosfolipídicas, micelas, bicelas, nanodiscos entre outros (Ritchie *et al.*, 2009; Verly, 2010). Esses meios biomiméticos podem ser preparados em diferentes composições e utilizados em diversas técnicas para estudos estruturais e biofísicos. Dentre as técnicas aplicadas nesse tipo de estudo, pode-se ressaltar Dicroísmo Circular (CD), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial zeta ( $\zeta$ ), Calorimetria de Titulação Isotérmica ITC e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), entre outras. Nesse sentido, este trabalho, propõe a utilização dessas técnicas físico-químicas e de análise estrutural, bem como outras técnicas biofísicas, como extravasamento de carboxifluoresceína (CF), fluorescência intrínseca de triptofano (Trp), para o estudo do modo de interação do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I com membranas fosfolipídicas de composições variadas.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

O crescente número de microrganismos infecciosos, resistentes aos antibióticos convencionais, representa um problema de saúde pública cada vez mais preocupante (Abraham *et al.*, 2005). O aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos convencionais tem resultado na recorrência de infecções graves em todo o mundo (Malanovic e Lohner, 2016). Contudo, o desenvolvimento de novos fármacos capazes de desenvolver atividade biológica por meio de mecanismos diferenciados ainda é limitado (Abraham *et al.*, 2005). Nesse contexto, o uso de substâncias naturais, ou de análogos sintéticos, como novos agentes antimicrobianos é bastante promissor. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs), componentes do sistema imune inato, também conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro, consistem em uma das estratégias de defesa mais antigas contra infecções da maioria dos organismos vivos. Devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas (antibiótico, anti-inflamatório, antiviral, antitumoral, imunomodulatório, entre outros), os PAMs se tornaram alternativa promissora para o desenvolvimento de novas drogas (Nguyen *et al.*, 2011; Perez Espitia *et al.*, 2012; Kosikowska e Lesner, 2016; Malanovic e Lohner, 2016).

Emil Fischer, foi o primeiro a adotar a hipótese de que proteínas eram constituídas de aminoácidos unidos entre si por ligações que ele denominou “ligações peptídicas”. Essa hipótese baseou-se em testes de hidrólise de proteínas, elucidando os produtos formados pela hidrólise, síntese de polímeros de aminoácidos, e comparação das propriedades das proteínas com polímeros sintéticos. A primeira proteína caracterizada, por sequenciamento e determinação estrutural, foi a insulina em 1945 por Sanger (Sanger, 1945), tendo sua estrutura completamente elucidada, incluindo as posições das ligações dissulfeto, em 1955 (Juliano, 1990). Esses compostos são encontrados em diversos organismos vivos, e muitas vezes isolados para estudos químicos e biológicos (Perez Espitia *et al.*, 2012; Kosikowska e Lesner, 2016).

Os primeiros estudos com peptídeos antimicrobianos naturais datam de 1939, quando a gramicidina foi isolada de bactérias do solo *Bacillus brevis* (Dubos, 1939a; b). Esse peptídeo apresentou atividade contra diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A gramicidina também foi o primeiro peptídeo a ser introduzido no mercado como princípio ativo de antibiótico de uso tópico, muito aplicado em oftalmologia. Entretanto, a

real explosão de interesse no uso terapêutico de peptídeos aconteceu por volta dos anos 80, quando essas substâncias começaram a ser isolados de diferentes espécies de anuros e insetos (Sorensen *et al.*, 2006; Kosikowska e Lesner, 2016). As cecropinas e as mangaininas são exemplos de peptídeos que foram isolados e caracterizados pela primeira vez na década de 80 (Kosikowska e Lesner, 2016).

Ao longo dos anos, os PAMs têm sido encontrados em diversos tipos de organismos, inclusive em veneno de artrópodes, especialmente escorpiões e aranhas. Os estudos com aracnídeos do gênero *Lycosa sp.* datam de 1989, quando foi publicado o primeiro estudo acerca da atividade antimicrobiana do veneno da aranha *Lycosa singoriensis* (Yonghua e Xianming, 1989; Santos *et al.*, 2009). Em 1998 foram isoladas as lycotoxinas I e II do veneno da aranha *L. carolinensis*. Esses peptídeos foram caracterizados com estruturas anfipáticas  $\alpha$ -helicoidais típica de PAMs, e apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e -negativas (Yonghua e Xianming, 1989; Budnik *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). A partir daí diversos trabalhos explorando peptídeos provenientes do veneno dos representantes desse gênero vêm sendo desenvolvidos, bem como análogos desses peptídeos naturais (Santos *et al.*, 2009; Fuscaldi *et al.*, 2016).

Entretanto, muitas vezes a quantidade de PAMs que pode ser extraída dos organismos é pequena para o desenvolvimento de alguns estudos biológicos, estruturais e biofísicos (Nguyen *et al.*, 2011; Kosikowska e Lesner, 2016). Nesse sentido, é crescente o número de pesquisas explorando a síntese de peptídeos para o estudo de suas propriedades e aplicações em diversas áreas (Perez Espitia *et al.*, 2012). A síntese possibilita ainda explorar novas estruturas a partir de modificações em peptídeos naturais, como a utilização de marcadores, o desenvolvimento de epítomos específicos, entre outras estratégias (Nguyen *et al.*, 2011).

Já existem PAMs utilizados como fármacos comerciais. A Polimixina-B consiste em um medicamento a base de polipeptídeos derivados da *B. polymyxa* (*B. aerosporus*). É um antibiótico utilizado para o tratamento de infecções do trato urinário, meninges e sangue, causadas por cepas bacterianas susceptíveis como *P. Aeruginosa*, *H. Influenzae*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* (Bulaj; Kosikowska e Lesner, 2016).

Fuzeon<sup>®</sup> é uma droga indicada para o tratamento da infecção por HIV-1 em combinação com outros agentes anti-retrovirais. O Fuzeon é um peptídeo, composto de 36 resíduos de aminoácidos, capaz de se ligar à cadeia de repetição heptavalente (HR1) da glicoproteína gp41 do HIV e com isso inibir o seu rearranjo estrutural. Dessa forma, o Fuzeon é capaz de bloquear a entrada do vírus na célula (Bulaj; Kosikowska e Lesner, 2016).

A Gramicidina também é um peptídeo já utilizado como antibiótico componente de pomadas dermatológicas e medicamentos. A gramicidina apresenta atividade biológica contra bactérias Gram-positivas (Bulaj; Kosikowska e Lesner, 2016). Esses são alguns exemplos de medicamentos à base de peptídeos já comercializados.

## 2.2. Síntese de peptídeo em fase sólida

Existem basicamente três métodos de síntese de peptídeos: a síntese enzimática, a síntese via DNA recombinante e a síntese química, que se divide entre síntese em solução, ou clássica, e a síntese em fase sólida. A primeira delas consiste na aplicação de enzimas proteolíticas que em condições específicas, são capazes de promover a formação das ligações peptídicas (Clapés *et al.*, 1990; Guzmán *et al.*, 2007). A síntese química em solução utiliza-se de métodos convencionais de síntese orgânica, embora trabalhos mais recentes vêm apresentando novas estratégias empregando grupos protetores específicos (Carpino *et al.*, 2003; Tsuda e Okada, 2012; Wu *et al.*, 2014). E por fim a síntese em fase sólida, na qual o peptídeo é sintetizado ancorado em um suporte sólido insolúvel, do qual só é removido ao final (Juliano, 1990; Nguyen *et al.*, 2011; Stawikowski e Fields, 2012).

A síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) apresenta algumas vantagens comparadas às demais. Por se tratar de um processo de síntese linear, geralmente apresenta melhor rendimento global e menor formação de subproduto em comparação com a síntese em solução. Essa metodologia inicia-se a partir de um suporte sólido polimérico insolúvel nas condições de síntese, funcionalizada com um ligante capaz de ancorar o peptídeo. Dentro da SPFS duas estratégias são as mais comumente exploradas, empregando os grupos protetores *t*-butoxicarbonila Boc ou 9-fluorenilmetoxicarbonila (Fmoc) (Coin *et al.*, 2007). Na primeira metodologia, todos os derivados de aminoácidos utilizados para a síntese contêm o grupo amino protegido pelo grupo protetor Boc e, na segunda, pelo Fmoc. Essa diferença altera as condições de reação para cada estratégia (Nguyen *et al.*, 2011). A SPFS via estratégia Fmoc foi empregada para obtenção dos peptídeos deste trabalho e, portanto, será mais detalhada adiante.

O grupo amino protetor Fmoc é removido em meio básico, normalmente empregando-se soluções de piperidina ou de derivados de piperidina (Chan e White, 2000). Diversos trabalhos mostram que este grupo pode ser removido em presença de bases orgânicas fortes como 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), azida de sódio (Chen *et al.*, 2014) ou fluoreto de tetrabutilamônio (Ueki e Amemiya, 1987). Entretanto, esses meios são

mais propensos a ocorrências de reações secundárias. Após a desproteção, é feito o acoplamento do derivado de aminoácido ativado por catalisadores como carbodiimidas e ésteres. A síntese consiste em etapas sucessivas de desproteção e acoplamento até a obtenção da sequência peptídica desejada. Ao final da síntese é feita a clivagem do peptídeo da resina, removendo os grupos protetores de cadeia lateral, que são reativos em meio ácido, e liberando-o da resina. Durante o processo de clivagem, são formados carbocátions, intermediários altamente reativos e, para evitar a formação de subprodutos provenientes de reações com esses compostos, são adicionadas espécies nucleofílicas como 1,2-etanoditiol (Strömstedt *et al.*) e triisopropilsilano (TIS) (Chan e White, 2000).

Apesar de a SPFS ser considerada bastante eficiente, algumas dificuldades podem ser encontradas durante a sua realização. Já foram observados problemas associados às etapas de desproteção e acoplamento de determinados resíduos de aminoácidos, principalmente devido ao impedimento estérico ou à agregação das cadeias peptídicas em construção. Entretanto, esses problemas podem ser contornados com a utilização de bases orgânicas fortes como DBU, aumento do tempo reacional, usando ativadores mais fortes, ou com a aplicação de solventes capazes de solvatar as cadeias laterais. Existem ainda dificuldades relacionadas a alguns resíduos de aminoácidos específicos, como o ácido aspártico – que pode sofrer reações secundárias em sua cadeia lateral, formando estruturas como a aspartamina ou piperidida – e a prolina – que pode formar derivados como a dicetopiperazina. Pode ser observada também a ocorrência de oxidação de grupos tio éteres, caracterizados por uma diferença de massa de 16 Da. Apesar desses problemas, as alternativas para solucioná-los são bastante acessíveis e têm possibilitado a obtenção de bons resultados (Coin *et al.*, 2007).

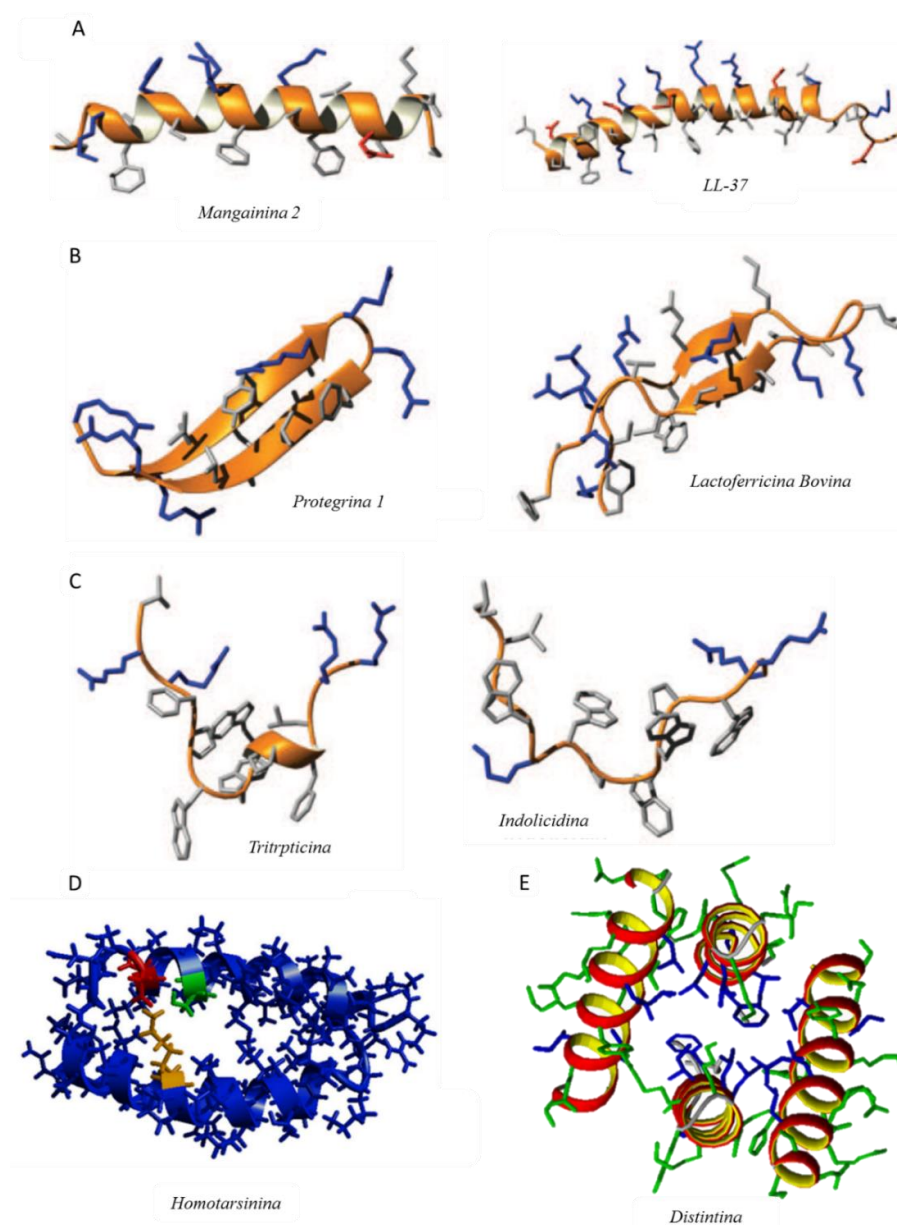
### 2.3. Relação estrutura atividade

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos exercem atividade biológica ainda não são completamente elucidados. É difícil identificar ou definir uma sequência padrão capaz de desempenhar atividade biológica efetiva (Kosikowska e Lesner, 2016). Muitos peptídeos atuam nas membranas celulares de bactérias para exercer atividade, em contraste com os antibióticos convencionais que geralmente atuam em alvos específicos. Essa característica confere uma vantagem para os PAMs em relação aos antibióticos convencionais. Estudos com PAMs como da classe da mangainina e da indolicina, mostraram múltiplos modos de ação, o que sugere que eles podem mudar de estratégia para aumentar a eficiência e evitar o desenvolvimento de mecanismos de resistência (Lohner e Prenner, 1999).



É possível identificar características estruturais cruciais para a atividade dos PAMs (Powers e Hancock, 2003; Brand *et al.*, 2012). Em primeiro lugar, a maioria dos PAMs apresenta carga líquida positiva, o que torna possível a atração eletrostática com membranas celulares aniônicas de microrganismos, sendo ao mesmo tempo pouco reativa com células eucariotas, que comumente apresentam carga líquida nula. Outra característica específica dos PAMs é a hidrofobicidade, que define as propriedades membranolíticas e a penetração celular (Wang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016). A anfipaticidade das sequências peptídicas está diretamente relacionada à conformação que os peptídeos adotam ao entrarem em contato com a membrana celular, sendo mais comumente encontradas para essa classe de peptídeos as conformações em  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha (FIG. 1A e B respectivamente, p. 8). A maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas bem definidas em suas estruturas secundárias (Bechinger, 2004; Santos *et al.*, 2009; Kosikowska e Lesner, 2016). As estruturas  $\alpha$ -helicoidais são as mais comuns e já foram caracterizadas em grande número de moléculas das classes, filoseptinas (Ribeiro *et al.*, 2007), mangaininas (exemplificada pela magainina 2, FIG. 1A, p. 8) (Zasloff, 1987), catelicidinas (Jenssen, H. *et al.*, 2006), dermaseptinas (Jiang *et al.*, 2015), cecropinas (Steiner *et al.*, 1981), entre outros. Estruturas  $\beta$ -folha são mais comuns para peptídeos das classes protegrinas (FIG. 1B, p. 8) (Sokolov *et al.*, 1999) e defensinas humanas ou de primatas (Yang *et al.*, 2001), devido à presença de duas ligações dissulfeto. Existem outras estruturas secundárias de peptídeos como as estruturas curvas estabilizadas por ligações dissulfeto simples, ou pela presença de prolinas em sua sequência primária (Resende *et al.*, 2008). Estruturas estendidas também já foram descritas na literatura, sendo característica principal destas uma sequência peptídica curta, com predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos (FIG. 1C, p. 8) (Schibli *et al.*, 1999; Sitaram *et al.*, 2003). Estruturas mais complexas como a da homotarsinina (Verly *et al.*, 2017), que consiste em uma estrutura terciária estabilizada pela interação das cadeias do homodímero (FIG. 1D, p. 8), e da distintina (FIG. 1E, p. 8) (Resende *et al.*, 2009), descrita por uma estrutura quaternária formada pelo arranjo espacial de duas moléculas do heterodímero, também já foram descritas na literatura, entretanto, são menos comuns para peptídeos antimicrobianos. Essas estruturas apresentam interação das cadeias peptídicas por meio de ligação dissulfeto.

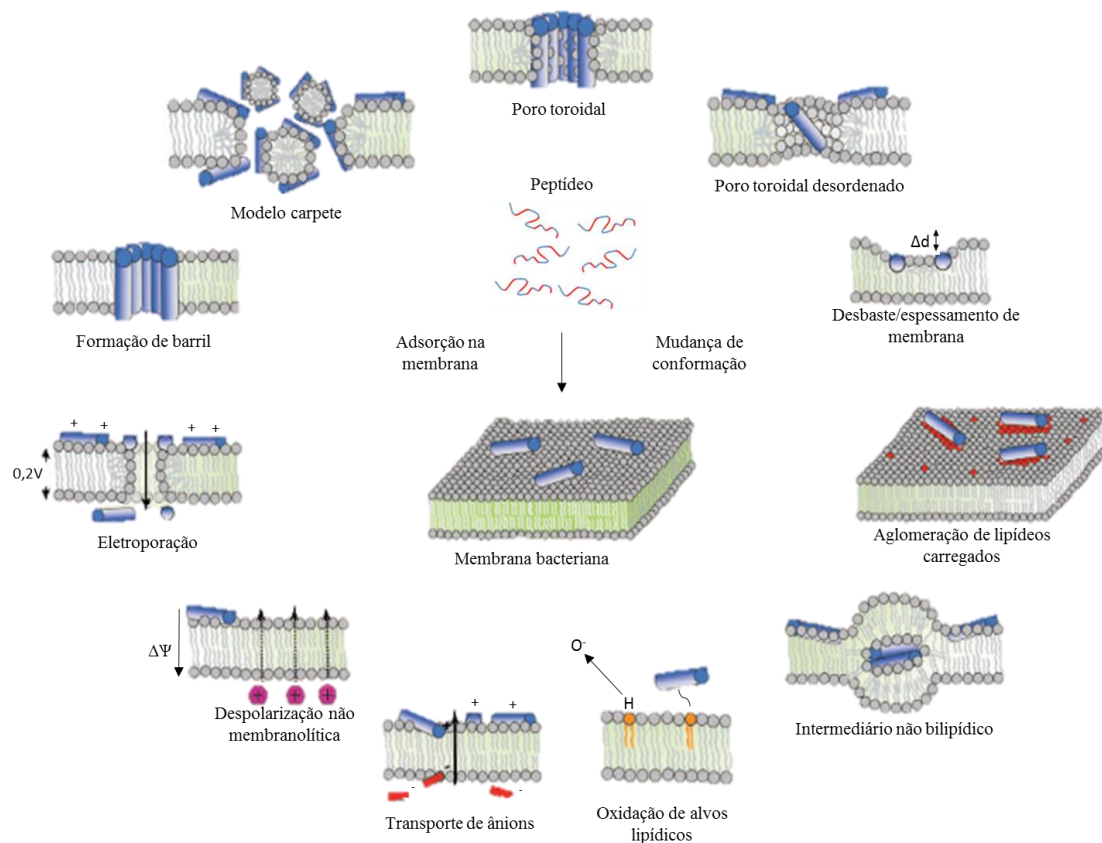
**Figura 1:** Estruturas secundárias de diferentes PAMs: em (A) estruturas  $\alpha$ -helicoidais como a Mangainina 2 (PDB – 2MAG) e LL-37 (PDB – 2K6O); em (B) estruturas em  $\beta$ -folhas de Protegrina 1 (PDB – 1PG1) e Lactoferricina Bovina (PDB – 1LFC); em (C) estruturas estendidas da Tritrpticina (PDB – 1D6X) e Indolicidina (PDB – 1G89), em (D) o homodímero da Homotarsinina (Figura Adaptada de (Verly *et al.*, 2017) e em (E) estrutura quaternária da Distintina (PDB – 1XKM).



A maioria dos peptídeos antimicrobianos apresenta estrutura desenovelada em meio aquoso, e precisa estar em presença da interface da membrana para adotar estruturas anfipáticas (Yeaman e Yount, 2003; Bechinger, 2004; Li *et al.*, 2012). Mesmo para os peptídeos que atuam em alvos intracelulares a interação com a membrana é fundamental para que ele a atravesse.

Os mecanismos de permeabilização da membrana e de atividade antimicrobiana dos PAMs ainda não são completamente elucidados. Existem algumas propostas de possíveis mecanismos de formação de poros na membrana. Para peptídeos estruturados em  $\alpha$ -hélice foram propostos diversos mecanismos, sendo os mais comuns, o mecanismo de formação de carpete (*carpet-like*), o de formação de barril (*barrel-stave*) e mecanismo detergente (*detergent-like*) (Shai, 2002; Bechinger, B. e Lohner, K., 2006). Contudo, os estudos de interação peptídeo-membrana apontam para a combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos que possibilitam modos de interação variados dos PAMs com membranas celulares (Sanderson, 2005; Bahar e Ren, 2013). Nesse sentido, compreender melhor a relação estrutura e atividade dos PAMs com relação as membranas celulares é muito importante para possibilitar o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Nguyen *et al.*, 2011; Kosikowska e Lesner, 2016). A Figura 2 apresenta um esquema com diversos mecanismos de perturbação de membranas fosfolipídicas propostos para peptídeos  $\alpha$ -helicoidais.

**Figura 2:** Representação esquemática de diferentes propostas de mecanismos de perturbação na membrana que ocorrem após adsorção inicial de peptídeo antimicrobiano (PAM).  
Fonte: Adaptada de Nguyen *et al.* (2011).



Diversos trabalhos têm mostrados que o emprego de técnicas estruturais e biofísicas, quando exploradas em conjunto para o estudo da interação peptídeo-membrana, podem ser o caminho para o entendimento dos mecanismos de ação de PAMs (Schote e Seelig, 1998; Bhunia *et al.*, 2007; Yumoto *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2010; Venugopal *et al.*, 2010). Dentre as diferentes técnicas utilizadas, podem-se destacar algumas como: o Dicroísmo Circular (CD), que possibilita um estudo conformacional de peptídeos em presença de meios biomiméticos; o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta ( $\zeta$ ), que permitem avaliar a variação do diâmetro hidrodinâmico e da carga superficial dos meios vesiculares à medida que eles interagem com peptídeos; medidas de extravasamento de marcadores químicos, que permitem uma avaliação da capacidade lítica de peptídeo; a Calorimetria de Titulação Isotérmica ITC, que propicia um estudo termodinâmico completo da interação peptídeo-membrana e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em fase sólida e em solução, que juntas fornecem informações estruturais e de dinâmica molecular do peptídeo ao interagir com membranas biomiméticas.

Neste trabalho serão detalhadas e tomadas como técnicas principais a RMN e a ITC, as demais técnicas foram aplicadas de forma complementar.

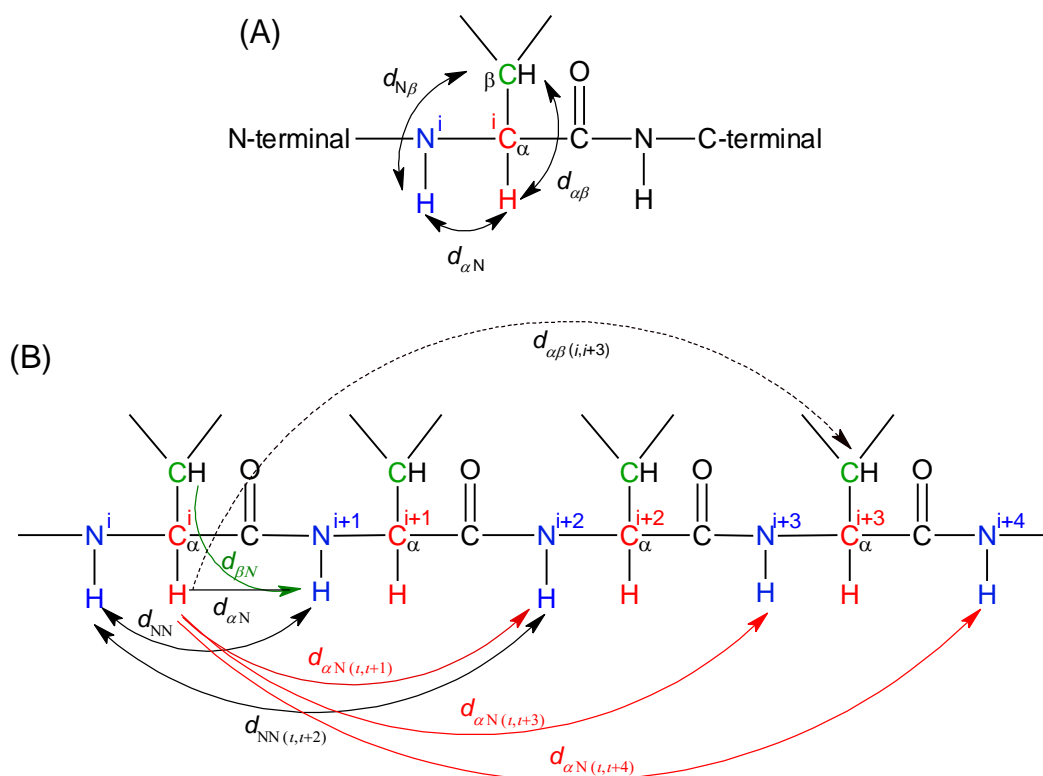
#### 2.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta importante para elucidação estrutural de biomoléculas e estudos de dinâmica molecular particularmente de peptídeos e proteínas (Wüthrich, 1986). Com isso, essa técnica passou a ser aplicada também nos estudos de modo de interação peptídeo-membrana, por meio de análises conformacionais de peptídeos em meios biomiméticos. As primeiras determinações estruturais de biomacromoléculas ocorreram nos anos de 1980, com estudos de isetotoxinas de escorpião em solução aquosa (Arseniev *et al.*, 1984). Foi nessa época que Braun e colaboradores apresentaram a determinação estrutural do glucagon (Braun *et al.*, 1981).

Ainda neste período, a RMN bidimensional (2D) começou a ser explorada para a determinação de conformações preferenciais de biomacromoléculas. A conversão dos dados obtidos a partir desses espectros 2D em informações estruturais foi feita a partir de métodos e simulações computacionais teóricas. Esse método de determinação estrutural ganhou credibilidade quando a determinação estrutural do tendamistato por RMN (Kline *et al.*, 1986) apresentou resultados semelhantes à difração de raios-X (Pflugrath *et al.*, 1986). Em 1986, Kurt Wüthrich propôs um método de atribuição sequencial, que possibilitou sistematizar a

determinação de estruturas tridimensionais a partir de experimentos bidimensionais de RMN. A proposta de Wüthrich (1986), combina as correlações intrarresiduais obtidas por acoplamentos via ligação (acoplamento escalar  $J$ ), observadas no mapa de contornos  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), com acoplamentos espaciais observados no espectro de  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*). O primeiro possibilita identificar correlações intrarresiduais característicos dos sistemas de *spin* de cada aminoácido, caracterizando o tipo de resíduos correspondente. O segundo fornece informações a respeito da vizinhança espacial do aminoácido analisado a partir de correlações intra e iter residuais, denominados de NOEs (efeito *Overhauser* nuclear). As correlações de NOEs interresiduais mais comuns são denominadas sequenciais ( $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ ,  $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ ,  $d_{\beta\text{N}}(i,i+1)$ ), e permitem determinar quais resíduos de aminoácidos são vizinhos entre si na sequência peptídica. Outras correlações, ditas de média distância, também são comumente observadas, porém são específicas para cada tipo de estrutura secundária (Williamson, 1993). A Figura 3, por exemplo, apresenta um esquema das principais correlações intra residuais (A) e espaciais e interresiduais (B) observados para uma conformação em  $\alpha$ -hélice.

**Figura 3:** Representação de NOEs de estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice. Possíveis correlações (A) intrarresiduais e (B) interresiduais de núcleos de hidrogênios. Fonte: Adaptado Wüthrich, 1986.

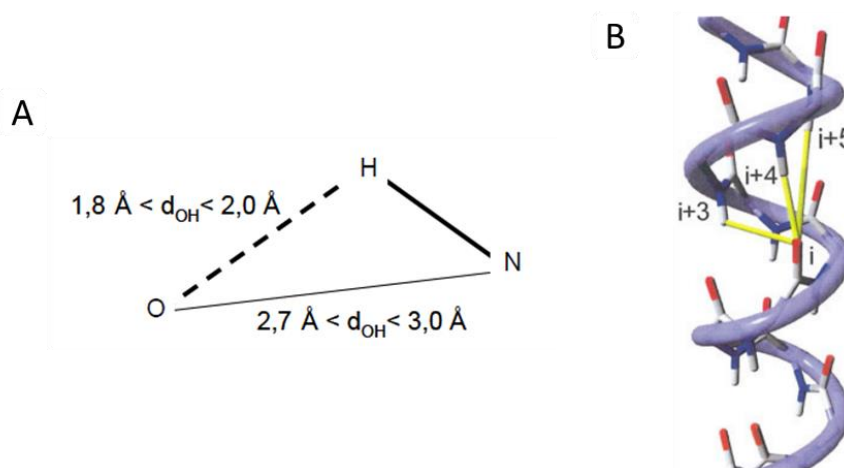


Os mapas de contornos heteronucleares do tipo  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMQC, muitas vezes são utilizados em conjunto com os demais experimentos bidimensionais para resolver ambiguidades na atribuição de peptídeos e proteínas. Caso sinais de diferentes resíduos de aminoácidos apresentem sobreposição, os experimentos heteronucleares permitem a identificação dos dois sinais. Isso ocorre porque os mapas de contornos  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HMQC identificam correlações apenas via ligação ( $^1J$ ), e cada resíduo apresenta um deslocamento químico característico para carbono e nitrogênio (Grzesiek e Bax, 1993; Munhoz, 2012).

A etapa final para obtenção de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas consiste na conversão das informações obtidas a partir dos mapas de contornos em restrições geométricas conformacionais (Wüthrich, 1986; Cavanagh, 2006). Essas restrições podem ser divididas em três grupos: restrições de distância, restrições de ângulos diedros (ou ângulos de torção) e restrições orientacionais (Williamson, 1993).

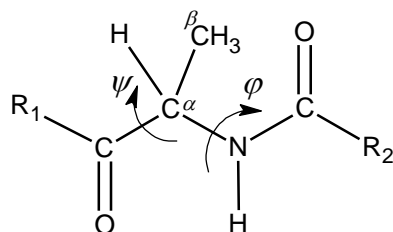
As restrições de distância dividem-se em duas categorias: as obtidas a partir de NOEs e as restrições de ligação de hidrogênio. A diferença entre essas duas restrições de distância envolve a metodologia de aquisição dos dados de RMN e elas promovem efeitos diferentes no cálculo final das estruturas (Munhoz, 2012). A primeira delas envolve a transferência de magnetização que ocorre pelo espaço, e torna possível a interação de dois núcleos, mesmo que eles estejam distantes na sequência primária do peptídeo, denominado acoplamento dipolar efeito *Overhauser* nuclear. A restrição obtida a partir de NOEs tem uma relação direta com o volume e a intensidade dos sinais. Embora seja possível calcular diretamente o volume dos sinais de NOEs, é mais comum classificá-los de acordo com sua intensidade: fortes, médios e fracos, correspondendo aos limites superiores de distância de 2,80, 3,40 e 5,00 Å, respectivamente (Markley *et al.*, 1998; Opella e Marassi, 2004). O segundo tipo de restrições também considera máximos e mínimos de distância, entretanto, essas restrições são tomadas duas a duas. Neste caso, os limites são estipulados considerando a distância média para interações de hidrogênio (1,8-2,0 Å) (FIG. 4A, p.13) (Nabuurs *et al.*, 2004). Este tipo de restrição é muito útil para estruturas em  $\alpha$ -hélice, devido às ligações de hidrogênio intra residuais formadas entre átomos de hidrogênio amídicos e oxigênios carbonílicos distantes na cadeia peptídica por três, quatro ou cinco resíduos de aminoácidos ( $i$ ,  $i+3$ ,  $i+4$  e  $i+5$ ) conforme evidenciado na Figura 4B (p.13).

**Figura 4:** Esquema representativo das restrições de distâncias derivadas de ligação de hidrogênio (A) com valores limites de distância. Estrutura  $\alpha$ -hélice com representação, em amarelo, das três restrições de ligação de hidrogênio encontradas para essa molécula (B). (Fonte: Adaptada de Nabuurs 2004).



As restrições de ângulos diedros, também conhecidos como ângulos de rotação  $\varphi$  e  $\psi$ , também podem ser determinados a partir de dados de experimentos de RMN. Para isso são utilizados os valores de constante de acoplamento escalar do tipo  $J^3$ . Entretanto, os valores de  $J^3$  são normalmente obtidos a partir de experimentos de  $^1\text{H}$  unidimensionais (1D) acoplados. É difícil obter, para peptídeos e proteínas, experimentos 1D com boa resolução e pouca sobreposição de sinais (Delaglio *et al.*, 2001). Além disso, a conversão dos dados de restrições de ângulos diedros deve ser feita manualmente. Outra forma de calcular esses valores de restrições angulares é a partir dos valores de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da cadeia principal do peptídeo (Wishart e Sykes, 1994). Nesse caso são utilizados os programas TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999), ou sua versão mais recente TALOS+ (Shen *et al.*, 2009). Para isso o programa TALOS+<sup>®</sup>, integrante do NMRPIPE<sup>®</sup>, utilizando um banco de dados de deslocamentos químicos de inúmeras estruturas de peptídeos e proteínas, obtidos de experimentos de alta resolução, calcula uma relação entre os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com os ângulos de diedros  $\varphi$  e  $\psi$  (FIG. 5, p.14), característicos da cadeia principal polipeptídica. Dessa forma, a partir de diversos tratamentos estatísticos o programa é capaz de prever com precisão significativa as restrições angulares (Shen *et al.*, 2009).

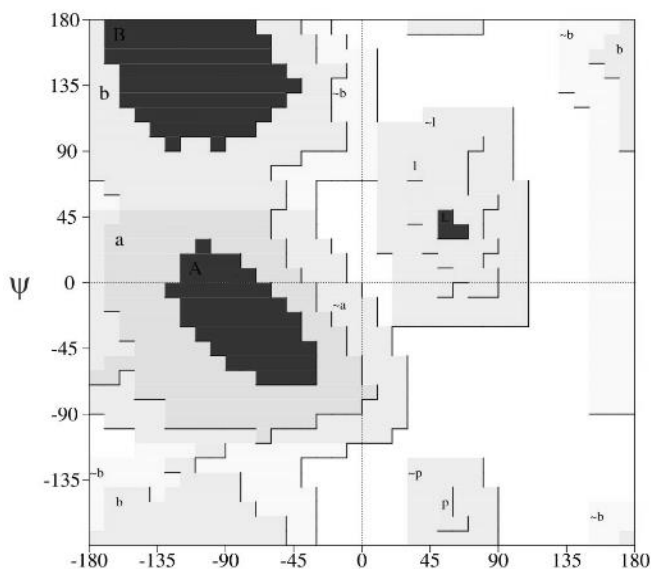
**Figura 5:** Esquema representativo da ligação peptídica com indicação dos ângulos de rotação  $\varphi$  e  $\psi$ .



Os ângulos diedros  $\varphi$  e  $\psi$  além de contribuírem para a obtenção da estrutura tridimensional mais acurada, são indicadores importantes da qualidade da conformação de regiões definidas de cadeias peptídicas. A combinação desses dois ângulos é restrita por fatores estéricos, que pode ser avaliada a partir de regiões do diagrama de Ramachandran (FIG. 6, p. 15). O diagrama é composto de quatro regiões com valores estericamente permitidos para  $\varphi$  e  $\psi$ : as regiões mais favoráveis, as adicionalmente permitidas, as generosamente permitidas e as proibidas. As regiões mais favoráveis correspondem a conformações de melhor qualidade. A região adicionalmente permitida indica conformações no limite para contatos atômicos desfavoráveis. A região generosamente permitida indica conformações permitidas para a maioria dos resíduos se houver flexibilidade nos ângulos de ligação. E por fim, a região proibida corresponde a conformações quase totalmente impedidas por fatores estéricos.



**Figura 6:** Diagrama de Ramachandran e regiões para a estrutura em  $\alpha$ -hélice. Regiões mais favoráveis (preto), regiões adicionalmente permitidas (cinza escuro), regiões generosamente permitidas (cinza claro) e regiões proibidas (Fuscaldi *et al.*).



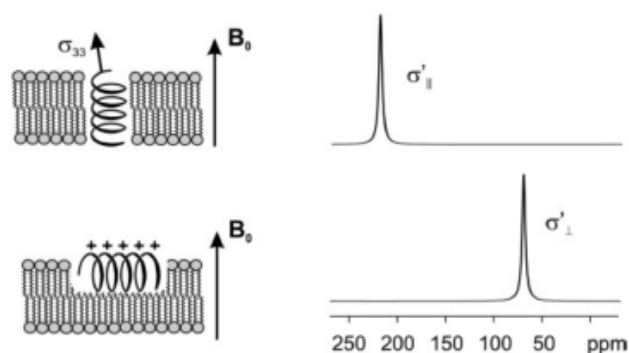
Com isso é possível obter estrutura tridimensional de peptídeos e proteínas, bem como avaliar a qualidade da mesma. Informações adicionais a respeito estrutura e da interação peptídeos e proteínas ativos em membranas têm sido obtidas a partir da técnica de RMN em fase sólida. Diversas metodologias utilizando a RMN em fase sólida têm sido empregadas para diferentes tipos de amostras, estejam elas nas formas pulverizada, forma cristalina ou incorporadas em bicamadas fosfolipídicas, uniaxialmente orientadas ou não (Cross e Opella, 1994; Bechinger, 1999; Rienstra *et al.*, 2002).

Os estudos com biomacromoléculas em bicamadas orientadas são muito úteis para estudos da orientação e da topologia dessas moléculas. Para isso, são utilizados peptídeos marcados isotopicamente com  $^2\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  associados a bicamadas lipídicas orientadas (Cross, 1997; Münster *et al.*, 2002; Aisenbrey *et al.*, 2010).

Existe uma anisotropia do deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  do nitrogênio amídico da cadeia principal que fornece informações a respeito da orientação do eixo principal da hélice em relação à bicamada fosfolipídica. Essa dependência entre a orientação do peptídeo e o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  permite avaliar a topologia da interação. Peptídeos que exibem conformação em  $\alpha$ -hélice e interagem transmembrana apresentam o vetor do eixo da hélice paralelo ao campo externo  $B_0$  e, conseqüentemente, deslocamentos químicos elevados de  $^{15}\text{N}$ , maiores que 200 ppm. Em contrapartida, se o peptídeo interage paralelamente à superfície da

membrana fosfolipídica, ele possui o vetor do eixo da hélice perpendicular ao campo magnético  $B_0$  e, neste caso, o deslocamento químico de  $^{15}\text{N}$  diminui sensivelmente ficando entre 60 e 80 ppm, conforme evidenciado na Figura 7 (Bechinger e Seelig, 1991; Aisenbrey e Bechinger, 2004).

**Figura 7:** Representações das possíveis orientações de interação transmembrana e paralela à bicamada fosfolipídica de um peptídeo em  $\alpha$ -hélice, com os respectivos deslocamentos químicos característicos representados ao lado. Fonte: (Bechinger e Sizun, 2003).



Em contrapartida, a análise dos espectros de RMN de  $^2\text{H}$  de um peptídeo sintetizado com um derivado de aminoácido de alanina marcado isotopicamente no grupo metila, com três átomos de deutério, permite definir a orientação da ligação  $\text{C}_\alpha - \text{C}_\beta$  da alanina em relação ao eixo principal da hélice (Bechinger, 1999).

Os resultados obtidos em fase sólida para os experimentos de RMN de  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$  são complementares. Em conjunto, eles permitem descrever a orientação do peptídeo helicoidal em relação a bicamada fosfolipídica. A estrutura anfipática  $\alpha$ -helicoidal e o alinhamento do peptídeo antimicrobiano PGLa em membrana lipídica de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) foi determinada com alta precisão por RMN de  $^2\text{H}$  em fase estado sólido (Strandberg *et al.*, 2006). Para isto, neste trabalho foram sintetizados uma série de oito peptídeos marcados com alanina-3,3,3- $d_3$ , substituindo-se alternadamente um dos resíduos nativo de alanina, glicina ou isoleucina. Ainda estudando-se amostras orientadas em RMN em fase sólida, também foi determinada a orientação das cadeias lineares do peptídeo antimicrobiano heterodimérico distinctina (Resende *et al.*, 2009). Neste trabalho, as duas cadeias da distinctina foram marcadas com  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$ , em resíduos selecionados, e o peptídeo foi reconstituído em bicamadas fosfolipídicas orientadas de POPC. Verificou-se que a cadeia 2 se insere de forma estável na membrana em orientação paralela à sua superfície, enquanto a

cadeia 1 adota um alinhamento mais inclinado. Os dados sugerem que a cadeia 2 exerça a função de ancorar o heterodímero na membrana, enquanto a cadeia 1 interage mais livremente com a bicamada.

## 2.5. Calorimetria de Titulação Isotérmica ITC

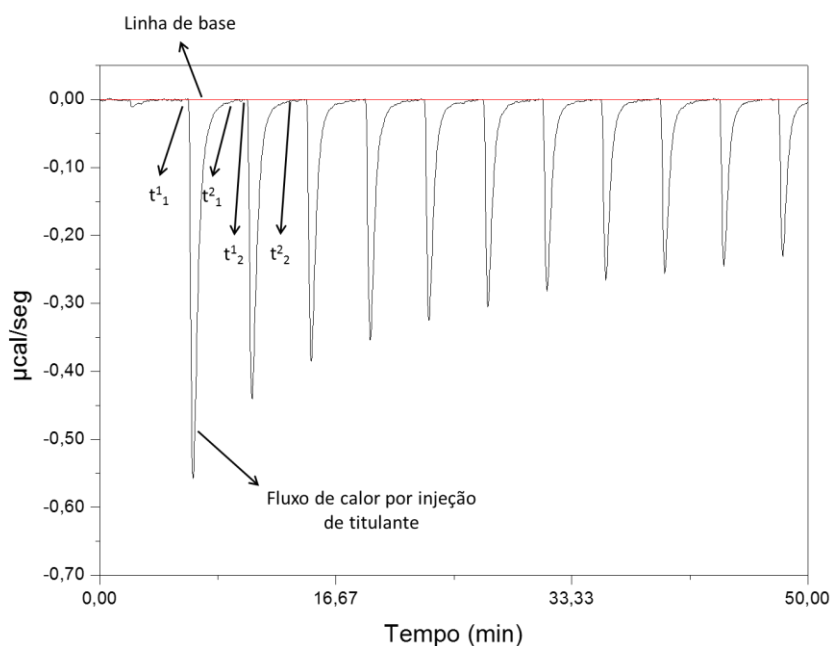
A calorimetria de titulação isotérmica ITC é uma poderosa ferramenta usada no estudo de interações intermoleculares em solução (Hiemenz e Rajagopalan, 1997). Ela permite a obtenção do perfil termodinâmico completo das interações (Seelig, 1997; Yau *et al.*, 1998). Essa técnica utiliza como sonda, a medida direta do fluxo de calor envolvido em uma interação. A partir das curvas calorimétricas obtidas, é possível determinar os parâmetros termodinâmicos da interação, como  $\Delta H^0$ ,  $\Delta G^0$  e  $\Delta S^0$ . A partir desses parâmetros é possível ainda extrair outras informações como constante de interação ( $K_{app}$ ) e até mesmo evidências a respeito do mecanismos de interação (Seelig, 1997; Galdiero *et al.*, 2013). Considerando que a associação de peptídeos a bicamadas lipídicas de membranas envolve a quebra e formação de interações intermoleculares e que, associado a estes fenômenos existem fluxos de calor, essa técnica mostra-se muito útil em investigações de interações peptídeo-membrana (Seelig, Joachim, 2004; Verly *et al.*, 2007; Sikorska *et al.*, 2016).

O equipamento de ITC é composto por uma célula de titulação, onde fica o titulado, e outra de referência, ambas idênticas. O titulante fica em uma micro-seringa que atua também como agitador mecânico, para homogeneizar o sistema. A micro-seringa injeta automaticamente o titulante na célula de reação. A temperatura entre as células de amostra e de referência é mantida constante e equilibrada. Para manter temperatura constante, a célula de referência é mantida sob pequeno aquecimento constante. Na célula de amostra o aquecimento não é constante, mas ajustado a cada injeção para corrigir a diferença de temperatura entre as células. A cada injeção, o calor envolvido na interação é medido a partir de um sistema de resposta eletrônica do sistema de retroalimentação eletrônica (*eletronic feedback system*) que conecta as duas células. Assim, uma reação exotérmica provocará um aumento da temperatura na célula de amostra em relação à célula de referência, o que resultará numa diminuição do fluxo de calor na célula para estabilizar o sistema de células do calorímetro.

Em um experimento calorimétrico, uma injeção de titulante gera uma perturbação energética que evolui durante um intervalo de tempo compreendido entre  $t^1_i$  e  $t^2_i$  (FIG. 8,

p.18). Esse intervalo de tempo deve ser suficientemente grande para que o equilíbrio do sistema seja restabelecido (Hiemenz e Rajagopalan, 1997; Seelig, J., 2004).

**Figura 8:** Gráfico de fluxo de calor em função do tempo para uma titulação calorimétrica exotérmica.



Caso a reação seja endotérmica, a interação provocará uma diminuição da temperatura da célula de amostra, e com isso o fluxo de calor deve aumentar para equilibrar a temperatura com a célula de referência (Hiemenz *et al.*, 1997). O equipamento fornece, portanto a curva de fluxo de calor semelhante à apresentada na Figura 8.

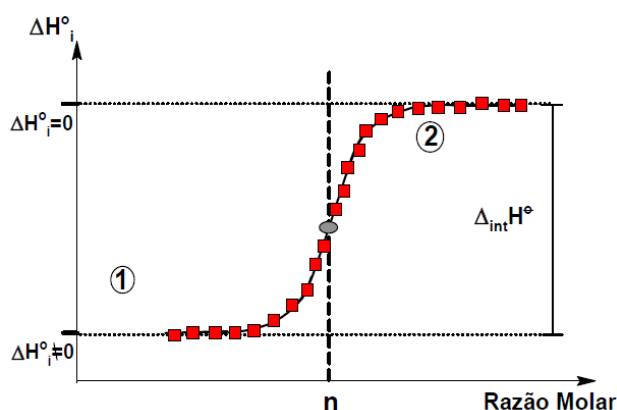
O calor envolvido em cada perturbação é determinado por integração numérica de cada pico no intervalo de tempo  $t^2_i - t^1_i$  (*spacing* – que deve ser padronizado em cada experimento) (Turnbull e Daranas, 2003). A equação que descreve o sistema é dada por:

$$\overline{\Delta_{comp}H} = \left( \frac{dQ_p}{d[X]_{tot}} \right)_P = \int_{t^1_i}^{t^2_i} F dt \quad \text{Equação 1}$$

A integração de cada pico permite a obtenção do gráfico de titulação calorimétrica a partir do qual serão obtidos os parâmetros termodinâmicos da interação, conforme mostrado na Figura 9 (p. 19). A contribuição entálpica de cada sinal é plotada em função da razão molar. Assim, o ponto de inflexão da curva corresponde numericamente ao coeficiente estequiométrico do sistema ( $n$ ). A partir do ajuste matemático da curva calorimétrica, é

possível extrair também a constante aparente do sistema ( $K_{app}$ ), a variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) e a componente entrópica do sistema ( $\Delta S^0$ )

**Figura 9:** Gráfico qualitativo de uma titulação isotérmica para uma substância que apresenta um sítio de complexação. Fonte: Adaptada de (Wiseman *et al.*, 1989).



Dessa forma, pode ser obtida uma descrição termodinâmica completa para a interação peptídeo-membrana, o que é bastante útil para entender os modos de ação dos peptídeos antimicrobianos (Seelig, J., 2004; Henriksen e Andresen, 2011). No trabalho de Hicks e colaboradores, foram desenvolvidos uma série de peptídeos antimicrobianos seletivos a células procarióticas frente células eucariotas (Hicks, 2007; Russell, 2010). Eles elaboraram ensaios de dicroísmo circular (CD), calorimetria isotérmica ITC e extravasamento de calceína para determinar o mecanismo de ligação do peptídeo representativo 1 (Ac-GF-Tic-Oic-GK-Tic-Oic-GF-Tic-Oic-GK-Tic-KKKK-CONH<sub>2</sub>), como peptídeo-modelo de membrana. Todos os experimentos foram realizados utilizando lipossomas de POPC e POPC:POPG (4:1), como ambientes biomiméticos de membrana eucariotas e procarióticas, respectivamente. Os dados de CD, ITC e extravasamento trabalhados em conjunto indicam claramente que o composto 1 interage através de mecanismos muito diferentes com as duas membranas. No caso de lipossomas de POPC, o peptídeo interage de forma endotérmica com as vesículas. Por outro lado, em lipossomas de POPC:POPG, uma fase endotérmica é observada a baixas razões molares fosfolípídeo/peptídeo, seguida por uma fase exotérmica à medida que a concentração de fosfolípídeo aumenta. O mecanismo de ligação predominante à POPC parece estar limitado a interações de superfície, enquanto o mecanismo de ligação a POPC:POPG (4:1) envolve, muito provavelmente, a formação de poros.

A interação da galidermina lantibiótica e do glicopeptídico antibiótico vancomicina com membranas bacterianas foi também estudada usando a calorimetria de titulação isotérmica (Al-Kaddah *et al.*, 2010). Ambos os peptídeos interferem na biossíntese da parede celular, inibindo o precursor lipídio II da parede celular, porém diferem claramente nas suas atividades antibióticas contra diferentes cepas bacterianas. As constantes de interação da vancomicina e da galidermina com modelos de membranas constituídos por 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DOPC) e Lipídeo II foram determinadas por ITC, revelando elevada afinidade para ambos ( $K_D$  0,30  $\mu\text{M}$  e 0,27  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, a galidermina mostrou também forte afinidade para membranas DOPC puras (0,53  $\mu\text{M}$ ), conforme dados obtidos por ITC. Estes resultados indicam que a galidermina, em contraste com a vancomicina, combina inibição da parede celular e interferência com a integridade da membrana bacteriana para uma atividade antimicrobiana potente.

O fato de as técnicas apresentadas fornecerem informações complementares entre si faz com que o uso combinado das mesmas, para elucidação estrutural e avaliação dos mecanismos de ação de PAMs, possibilite a obtenção de uma descrição detalhada da interação peptídeo membrana, e será explorado neste trabalho.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivos Gerais

Esse trabalho teve como objetivo a investigação detalhada da interação do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I com membranas fosfolipídicas de diferentes composições, a partir de estudos biofísicos e estruturais.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar o peptídeo antimicrobiano LyeTx-I pelo método de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS), purificá-lo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e caracterizá-lo por espectrometria de massa utilizando a técnica de *Matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI-ToF);
- ✓ Realizar estudos termodinâmicos por calorimetria de titulação isotérmica (do inglês *Isothermic Titulation Calorimetry* – ITC), para determinação dos parâmetros termodinâmicos de interação do peptídeo LyeTx-I com vesículas biomiméticas;
- ✓ Realizar estudos de variação de diâmetro hidrodinâmico (*Dinamic Light Scattering* - DLS) e potencial zeta ( $\zeta$ ) de vesículas fosfolipídicas em função da titulação de solução do LyeTx-I;
- ✓ Avaliar o potencial de perturbação da membrana para esse peptídeo a partir de experimentos de extravasamento de carboxifluoresceína (CF);
- ✓ Realizar estudos de interação deste peptídeo com meios biomiméticos de diferentes composições a partir da fluorescência intrínseca de triptofano, presente na sequência primária;
- ✓ Realizar estudos conformacionais do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I por dicroísmo circular (do inglês *Circular Dichroism* – CD) e ressonância magnética nuclear (RMN) em diferentes meios biomiméticos.

## 4. Metodologia

### 4.1 Materiais e Reagentes

Para a realização da síntese e purificação do peptídeo LyeTx-I, foram utilizados:

- ✓ Fmoc-Ala-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-(3,3,3-D<sub>3</sub>)Ala-OH – *Cambridge Isotope Laboratories*<sup>®</sup>
- ✓ Fmoc-Asn(trt)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Phe-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Gly-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Gln(trt)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-His(trt)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Ile-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Leu-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-(<sup>15</sup>N)Leu-OH – *Cambridge Isotope Laboratories*<sup>®</sup>
- ✓ Fmoc-Lys(Boc)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Fmoc-Trp(Boc)-OH – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Ácido trifluoroacético (TFA) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Triisopropilsilano (TIS) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ *N,N*-dimetilformamida (DMF) – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ Álcool isopropílico (IPA) – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ Diclorometano (DCM) – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ 4-metilpiperidina (PIPE) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Resina Fmoc Rink<sup>®</sup> amida, com grau de substituição 0,63 mmol.g<sup>-1</sup> – *NovaBiochem*<sup>®</sup>;
- ✓ Piridina – *Merck*<sup>®</sup>;
- ✓ Cianeto de potássio (KCN) – *Lafan Química Fina*<sup>®</sup>;
- ✓ Fenol – *Synth*<sup>®</sup>;
- ✓ Etanol – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ Ninidrina – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ Éter di-isopropílico – *Vetec*<sup>®</sup>;



- ✓ Água deionizada Milli-Q<sup>®</sup> Tipo1;
- ✓ Acetonitrila grau UV-HPLC – *Isofar*<sup>®</sup>;
- ✓ Balança analítica – *Shimadzu*<sup>®</sup> modelo ATX 224;
- ✓ Agitador vórtex – *Biomixer*<sup>®</sup>.

Para o preparo dos meios biomiméticos e quantificação dos fosfolipídeos, foram utilizados:

- ✓ 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) – *Avanti*<sup>®</sup> *Polar Lipidics, Inc*<sup>®</sup>;
- ✓ 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol (POPG) – *Avanti*<sup>®</sup> *Polar Lipidics, Inc*<sup>®</sup>;
- ✓ Dodecilsulfato de sódio (SDS) – *Vetec*<sup>®</sup>
- ✓ Dodecilsulfato de sódio (SDS) – *Vetec*<sup>®</sup>
- ✓ Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>;
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) – *Isofar*<sup>®</sup>;
- ✓ 5(6)-carboxifluoresceína – *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>
- ✓ Tiocianato de amônio (NH<sub>4</sub>SCN) – *Vetec*<sup>®</sup>;
- ✓ Cloreto férrico hexaidratado (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) – *CRQ*<sup>®</sup>;
- ✓ Clorofórmio – *Dinâmica*<sup>®</sup>;
- ✓ Microextrusor *Avanti*<sup>®</sup>, *Polar Lipids, Inc*<sup>®</sup>;
- ✓ Membranas de policarbonato de 0,1 µm – *Avanti*<sup>®</sup> *Polar Lipidics, Inc*<sup>®</sup>;
- ✓ Ultrassom – *ALT Sonic Clean*<sup>®</sup>.

#### 4.2 Síntese do Peptídeo LyeTx-I

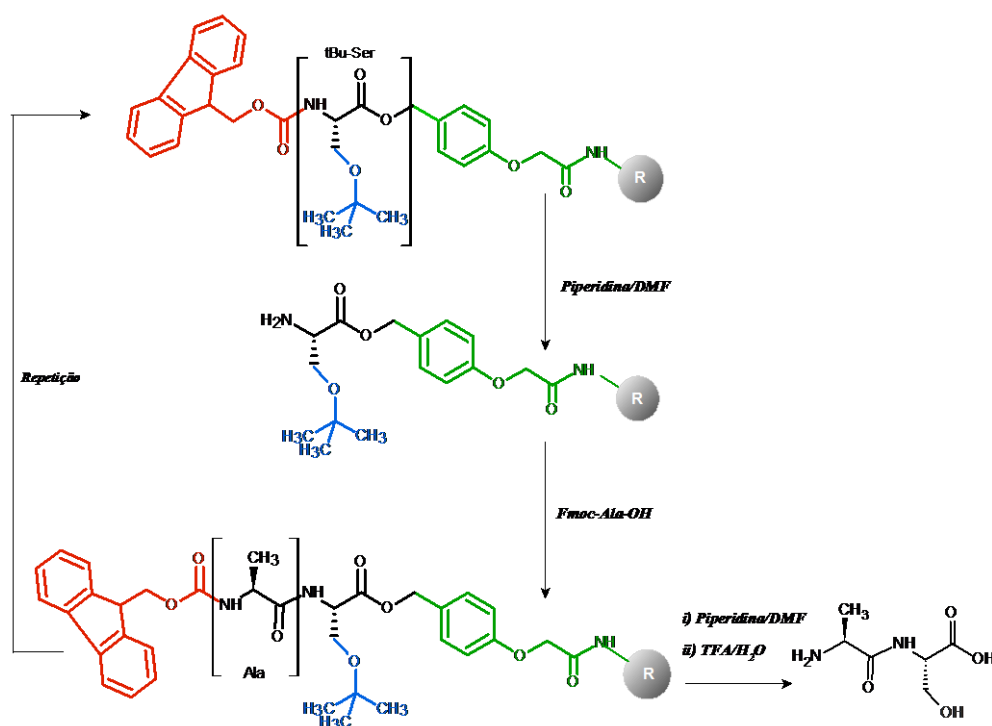
A síntese dos peptídeos LyeTx-I sem e com marcação isotópica foi realizada manualmente, utilizando-se uma seringa de polipropileno de 3,0 mL adaptada com filtro poroso (Figura 10, p.24). Seguindo a metodologia padrão de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS), via estratégia 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) (Chan e White, 2000), conforme esquematizado na Figura 11 (p. 24). Por este método, o derivado de aminoácido da porção carboxi-terminal foi inicialmente ligado ao suporte sólido – resina Fmoc Rink<sup>®</sup> amidada (FIG. 12C, p.25) com grau de 0,63 mmol.g<sup>-1</sup> – funcionalizado com um grupo amino. Esse tipo de resina fornece peptídeo amidado na extremidade carboxi-terminal ao final do processo. A síntese do LyeTx-I foi planejada para um rendimento equivalente a 150 mg.

**Figura 10:** Foto ilustrativa da seringa de polipropileno utilizada para a síntese.



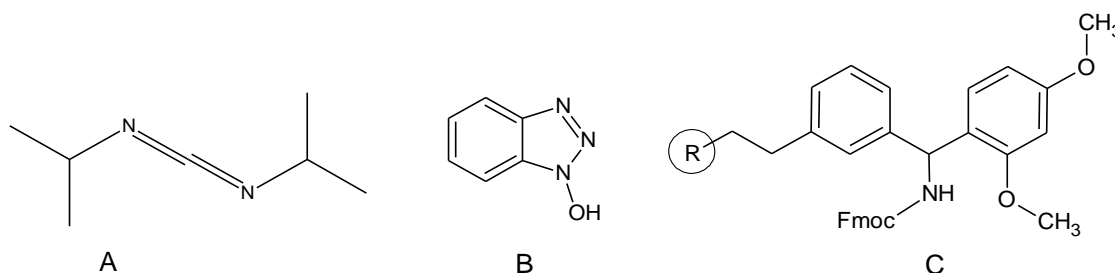
Todos os derivados de aminoácidos empregados na SPFS foram adquiridos contendo grupo amino protegido com Fmoc e cadeias laterais, quando reativas, protegidas com *t*-butoxicarbonila (Boc), trifenilmetila (trt) ou *t*-butila (*t*-Bu). Os derivados de aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo LyeTx-I (IWL TALKFLGKNLGKHLAKQLAKL-NH<sub>2</sub>) estão apresentados na Tabela 1 (p. 25). Para síntese do peptídeo LyeTx-I marcado isotopicamente com <sup>15</sup>N, no grupo amino do resíduo de Leu-13, e com <sup>2</sup>H, na cadeia lateral do resíduo de Ala-18 LyeTx-I (IWL TALKFLGKNL(<sup>15</sup>N)GKHLA(<sup>2</sup>H)KQLAKL-NH<sub>2</sub>), foram empregados ainda os derivados de Fmoc-(<sup>15</sup>N)Leu-OH e Fmoc-(3,3,3-D<sub>3</sub>)Ala-OH.

**Figura 11:** Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida via estratégia Fmoc. Fonte: Adaptada de (Chan e White, 2000).



Os derivados de aminoácidos foram previamente convertidos a ésteres ativos (ésteres OXt) imediatamente antes da reação, usando-se como ativadores *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (FIG. 12A e B).

**Figura 12:** Estrutura química representativa dos ativadores do grupo carboxila DIC (A) e HOBt (B) e da resina polimérica (C) utilizada como suporte sólido na síntese do peptídeo, em que “R” representa a cadeia polimérica da resina.



**Tabela 1:** Derivados de aminoácidos utilizados para a síntese do peptídeo LyeTx-I com suas respectivas massas molares

Aminoácido	Derivado de aminoácido	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )
Alanina (A)	Fmoc-Ala-OH	311,3
	Fmoc-(3,3,3-D <sub>3</sub> )Ala-OH	314,3
Asparagina (N)	Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7
Fenilalanina (F)	Fmoc-Phe-OH	387,4
Glicina (G)	Fmoc-Gly-OH	297,3
Glutamina (Q)	Fmoc-Gln(Trt)-OH	610,7
Histidina (H)	Fmoc-His(Trt)-OH	619,7
Isoleucina (I)	Fmoc-Ile-OH	353,4
Leucina (L)	Fmoc-Leu-OH	353,4
	Fmoc-( <sup>15</sup> N)Leu-OH	354,4
Lisina (K)	Fmoc-Lys (Boc)-OH	468,5
Treonina (T)	Fmoc-Thr( <i>t</i> -Bu)-OH	397,5
Triptofano (W)	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6

Inicialmente, o derivado de aminoácido da porção carboxi-terminal (Fmoc-Leu-OH) foi ativado e ligado ao suporte sólido funcionalizado. Para este primeiro acoplamento utilizou-se um excesso estequiométrico de 4 vezes de derivado de aminoácido, DIC e HOBt. Para as demais reações de acoplamento, foram empregados excessos de 3 vezes dos reagentes, sempre dissolvidos em 3,0 mL de solução de DMF:DCM (1:1). Após o acoplamento do primeiro derivado de aminoácido à resina, seguiu-se à remoção do grupo Fmoc (desproteção do grupo amino) da peptidil-resina, utilizando uma solução básica de PIPE em DMF (25% v/v). Em seguida, prosseguiu-se com o acoplamento do resíduo de aminoácido subsequente. O procedimento de síntese consistiu-se de repetições de etapas de acoplamento e de remoção do grupo Fmoc, até a obtenção da sequência peptídica desejada. A peptidil-resina foi sempre lavada alternadamente com DMF e IPA por três vezes, seguida de uma lavagem final com DCM, após cada etapa de desproteção e acoplamento.

O acompanhamento das reações de acoplamento e desproteção foi realizado com o auxílio do teste de Kaiser. Trata-se de um teste químico colorimétrico qualitativo para confirmação da presença de grupo amino livre, também conhecido como teste de ninidrina (Troll e Cannan, 1953). Os testes foram realizados pela adição de gotas das três soluções descritas abaixo, sobre uma pequena amostra de grãos da resina contidos em tubos de ensaio:

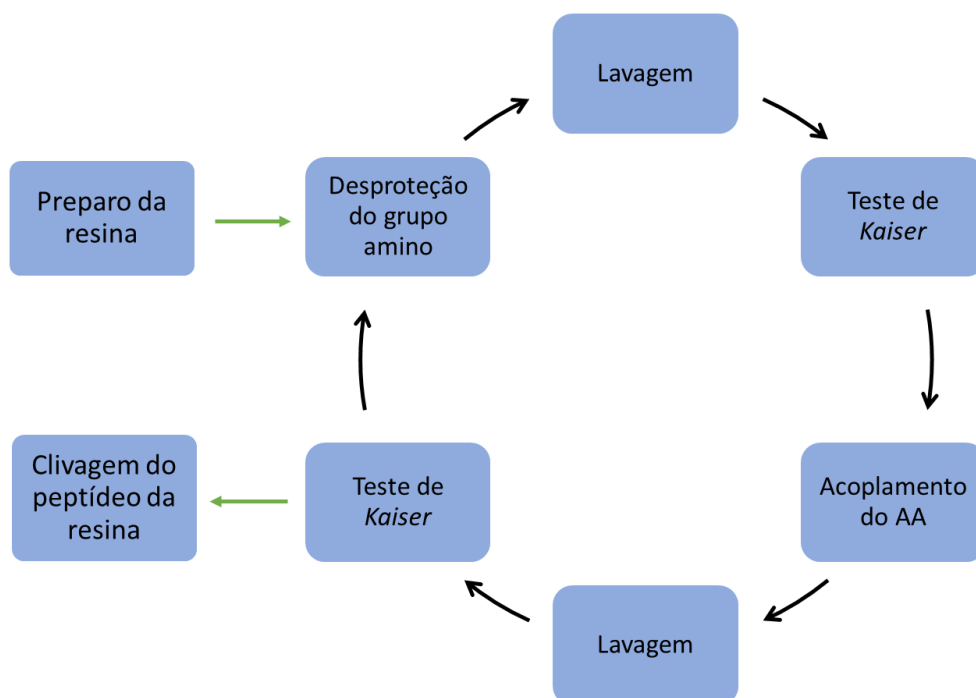
- Solução 1 - Piridina a 2 % (v/v) em solução aquosa de KCN  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;
- Solução 2 - Solução de fenol a 80 % (m/v) em etanol;
- Solução 3 - Solução de ninidrina a 5 % (m/v) em piridina.

Ao final da síntese, foi realizada a etapa de clivagem para quebra da ligação entre o peptídeo e a resina, bem como a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos protegidos. Essa última etapa foi conduzida em meio ácido, com o emprego de TFA na presença de TIS como sequestrador de carbocátions. O tempo de reação e a composição da solução de clivagem dependem da resina e da sequência peptídica sintetizada. Isso porque os grupos protetores das cadeias laterais dos derivados de aminoácidos podem ser diferentes. Assim sendo, cada síntese requer condições reacionais e nucleófilos específicos para garantir total remoção dos grupos protetores bem como a estabilização dos carbocátions formados nesta etapa. Para o LyeTx-I foi preparada uma solução contendo 95% TFA, 2,5% água, 2,5% TIS. Essa solução foi succionada para a seringa de reação e mantida sob agitação por 2,5 h (Chan e White, 2000).

Após as reações de clivagem, a solução ácida contendo peptídeo livre foi filtrada e evaporada por fluxo de nitrogênio gasoso. Depois de concentrada a solução resultante,

precipitou-se o peptídeo contido nela pela adição de di-isopropílico (5 mL), previamente resfriado (à aproximadamente  $-5^{\circ}\text{C}$ ), e centrifugou-se o sistema a 3200 rpm durante 5 min, descartando-se a solução etérea sobrenadante. O procedimento foi repetido por mais duas vezes a partir do peptídeo já precipitado. A amostra sólida do peptídeo foi então solubilizada em água deionizada Milli-Q<sup>®</sup> Tipo 1 para liofilização em um liofilizador Terroni LS3000<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) do departamento de Farmácia da UFVJM. A Figura 13 apresenta um fluxograma simplificado da sequência de protocolos realizados para obtenção dos peptídeos de interesse.

**Figura 13:** Fluxograma representativo da sequência de etapas para realização da SPFS, onde AA corresponde a aminoácido.



#### 4.3 Purificação do Peptídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A purificação do peptídeo bruto sintetizado foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) *Varian*<sup>®</sup> (Varian, Inc.) modelo *Pro Star 315* com detector na região do ultravioleta modelo *Pro Star 335*, válvula de injeção marca *Rheodyne*<sup>®</sup>, do Departamento de Química da UFVJM. Foi utilizada a coluna analítica em fase reversa *Vydac*<sup>®</sup> C18 (250 × 4,6 mm) e *loop* de 100 µL. As fases móveis utilizadas foram uma solução aquosa contendo

TFA 0,1 % v/v e uma solução de TFA em acetonitrila com 0,08 % v/v de TFA.

#### 4.4 Caracterização por Espectrometria de Massa e Sequenciamento

O peptídeo foi analisado em espectrômetro do tipo MALDI-ToF/ToF em modo refletido, *Bruker Daltonics*<sup>®</sup> *Autoflex Speed* e *Bruker Daltonics*<sup>®</sup> *Ultraflex Extreme III* na Embrapa, Setor de Recursos Genéticos e Biotecnologia – Unidade Brasília DF, equipado com *Laser Smart beam*<sup>TM</sup> operando em modo positivo e controlados pelo *software FlexControl 3.0* (*Bruker Daltonics*<sup>®</sup>). Os espectros foram obtidos no modo MS positivo e a faixa de massa utilizada para as amostras foi de 700 a 3500 Da e analisados utilizando o *software FlexAnalysis 3.0* (*Bruker Daltonics*<sup>®</sup>). A sequência primária do LyeTx-I foi determinada utilizando-se os *softwares MMass* e *PepSeq*.

O preparo da solução matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico, (CHCA) foi realizado a partir de 5 mg de CHCA dissolvido em 250  $\mu$ L de acetonitrila, 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q e 50  $\mu$ L de solução aquosa de TFA a 3 % v/v para a obtenção de uma solução de CHCA a 10 mg.mL<sup>-1</sup> (50 mmol.L<sup>-1</sup>). Em seguida, as amostras ressuspendidas foram adicionadas à solução da matriz na proporção de 1:3 (peptídeo:solução) em volume. Por fim, as soluções foram aplicadas sobre superfície de uma placa de aço (MTP *AnchorChip 800/384*, *Bruker Daltonics*<sup>®</sup>, *Billerica*, MA, EUA), previamente lavada com água Milli-Q, metanol e álcool isopropílico.

#### 4.5 Preparação das LUVs

As vesículas unilamelares grandes (LUVs, do inglês *large unilamellar vesicles*) foram preparadas a partir dos fosfolípidos POPC e POPG em solução tampão de Tris-HCl a 10 mmol.L<sup>-1</sup> (NaCl 20 mM) em pH 8,5. As vesículas de caráter zwitteriônico foram obtidas a partir de POPC, e as vesículas de caráter aniônico, foram obtidas pela combinação de POPC:POPG na proporção molar (3:1). O preparo foi realizado segundo a metodologia de desidratação/reidratação de vesículas (DRV) proposta por Kirby (Kirby e Gregoriadis, 1984). Para isso, o fosfolípido foi solubilizado em clorofórmio, e rotaevaporado (60 °C) para obtenção do filme lipídico. O filme lipídico foi reidratado em tampão Tris-HCl, com agitação em vórtex e sonicação. A fim de garantir a obtenção de vesículas unilamelares, foi realizado tratamento térmico com 8 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido, descongelamento em banho-maria à 40 °C e sonicação por 3 minutos. As LUVs foram extrusadas 10 vezes em

microextrusor manual *Avanti, Polar Lipids, Inc*<sup>®</sup>, com membranas de policarbonato de 100 nm.

#### 4.6 Quantificação de fosfolípídeo por espectrofotometria na região de Ultra-violeta e visível (UV-vis)

O teor de fosfolípídeos nas preparações de lipossomas foi determinado tendo como base o método colorimétrico proposto por (Stewart, 1980). Este método baseia-se na capacidade de complexação dos fosfolípídeos com ferrotiocianato de amônio em meio orgânico, resultando numa absorção de luz visível em  $\lambda_{\text{máx}}$  de 488 nm. As medidas de absorção foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis *Varian*<sup>®</sup> (Varian, Inc.) modelo *Cary 50* (Austália), do Departamento de Química da UFVJM. Foram determinadas as concentrações das suspensões estoque de lipossomas utilizadas para todas as análises.

#### 4.7 Dicroísmo Circular (CD)

Estudos conformacionais de CD foram realizados com o peptídeo LyeTx-I (10  $\mu\text{M}$ ), em diferentes meios biomiméticos. Para isso, prepararam-se soluções 500  $\mu\text{M}$  de vesículas de POPC e POPC:POPG (3:1) em Tris-HCl (10 mM) pH 8,5, contendo 20 mM de NaCl. Foram preparadas também soluções micelares de diferentes concentrações de SDS (100, 200 e 400  $\mu\text{M}$ ) em água deionizada Milli-Q. O espectropolarímetro utilizado foi um JASCO<sup>®</sup> J-810 (Tóquio, Japão), com sistema de controle de temperatura *Peltier Jasco - PFD-425S* acoplado, do Departamento de Química da UFMG. As análises foram realizadas em uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico, a 25 °C, com janela espectral de 190 a 260 nm. Foram acumuladas quatro varreduras para cada curva. O tratamento de dados e os cálculos de deconvolução para obtenção dos teores de estruturas secundárias foram realizados a partir dos programas *Spectra Analysis*<sup>®</sup> e *CDpro*<sup>®</sup> (Sreerama e Woody, 2000; 2004) respectivamente.

#### 4.8 Extravasamento com carboxifluoresceína

Para os estudos de extravasamento foram preparadas LUVs de POPC e POPC:POPG (3:1) a uma concentração de 1,0 mM, em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,5)

contendo 1,0 mM de 5(6)-carboxifluoresceína (CF). Para isso, foi utilizada a mesma metodologia de preparo de lipossoma descrita no item 3.5, porém com o tampão utilizado contendo CF. A suspensão de LUVs obtida foi então purificada em coluna *Sephadex-G25* (1,2 cm ×20 cm) com solução tampão de 10 mM de Tris-HCl, contendo 100 mM de NaCl, em pH 8,5. Imediatamente antes da realização dos experimentos de extravasamento, foi realizada a remoção do excesso de CF livre em cromatografia por exclusão, à temperatura ambiente. A fase estacionária (1,00 g) foi previamente preparada em suspensão com 12 mL de tampão Tris-HCl, sob agitação durante 24 h. Em seguida, foi montada a coluna de *Sephadex-G25* em uma seringa de polipropileno de 5 mL, preenchendo-se 2/5 da seringa com fase estacionária. A suspensão de LUVs/CF foi então transferida para a coluna cromatográfica e a solução límpida de LUVs foi coletada em um tubo *Falcon*<sup>®</sup> de 15 mL. As LUVs foram extrusadas em micro-extrusor *Avanti Polar Lipids*<sup>®</sup>, *Inc*, com membranas de policarbonato de 100 nm.

As medidas de fluorescência de carboxifluoresceína foram realizadas em espectrômetro de fluorescência *Spectra Max*<sup>®</sup> (*Sunnyvale*<sup>®</sup>, Estados Unidos) do Departamento de Farmácia da UFVJM. Utilizou-se placa de medida *Greiner Bio-one*<sup>®</sup> (Brasil) com 190 poços de 300 µL. Para cada um dos poços, transferiram-se 150 µL da dispersão de LUVs (1 mM) e o volume da solução de peptídeo (0,15 mM) adicionado a cada poço variou de 0 a 60 µL, completando-se, por fim, o volume total de 300 µL, conforme detalhado na Tabela 2. As medidas foram realizadas a 25 °C em experimento contínuo.

**Tabela 2:** Condições aplicadas na realização das medidas de extravasamento de carboxifluoresceína para o peptídeo LyeTx-I.

<b>Amostra</b>	<b>Volume final (µL)</b>	<b>Volume de LUVs (µL)</b>	<b>Volume de LyeTx-I (µL)</b>	<b>Volume de tampão (µL)</b>	<b>Volume de Triton<sup>TM</sup>-X (µL)</b>
<b>1</b>	300	150	0	150	0
<b>2</b>	300	150	5	145	0
<b>3</b>	300	150	10	140	0
<b>4</b>	300	150	20	130	0
<b>5</b>	300	150	40	110	0
<b>6</b>	300	150	60	90	0
<b>7</b>	300	150	0	0	150



O aumento de fluorescência de CF foi determinado em função do tempo, tendo como controle total de fluorescência a amostra contendo LUVs e solução aquosa de Triton<sup>TM</sup>-X 100 (10 % v.v<sup>-1</sup>). A porcentagem de extravasamento de CF foi determinada utilizando a Equação 2 proposta por (Alvarez *et al.*, 2003, Verly *et al.*, 2007):

$$\% \text{ de Extravasamento} = \frac{I_{(t)} - I_0}{I_T - I_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde  $I_{(t)}$  é a intensidade de fluorescência no tempo  $t$ ,  $I_0$  corresponde à intensidade de fluorescência após a adição de peptídeo e  $I_T$  é a intensidade de fluorescência após a adição de Triton<sup>TM</sup>-X 100 (10 % v.v<sup>-1</sup>).

#### 4.9 Fluorescência de Triptofano (Trp)

##### 4.9.1 Fluorescência intrínseca de Trp

As medidas de fluorescência intrínseca de triptofano (Trp) foram realizadas em espectrofotômetro *Cary Eclipse fluorescence* (Varian, Inc.<sup>®</sup>) com unidade de controle de temperatura *Peltier*. As análises foram realizadas à 25 °C em cubeta de quartzo de 1 cm<sup>3</sup>. As amostras foram excitadas a 280 nm e o sinal de emissão, coletado entre 300 a 450 nm, utilizando-se *slits* (fendas) de 5 nm em todas as medidas. O sinal adquirido foi uma média de 3 varreduras.

As amostras foram preparadas contendo 30 µM de LyeTx-I. Foi realizada a leitura do peptídeo livre em água Milli-Q, na ausência de qualquer interface. Foram preparadas também amostras do peptídeo na presença de micelas de SDS ou DPC, ambos na concentração de 200 mM em água Milli-Q e na presença de vesículas de POPC ou POPC:POPG (3:1), ambos na concentração de 500 µM em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,5, contendo 20 mM de NaCl.

Calculou-se o centro de massa de cada um dos espectros a partir da Equação 3:

$$CM (nm) = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad \text{Equação 3}$$

em que  $\lambda_i$  é o comprimento de onda de emissão e  $F_i$  a fluorescência emitida, ambos entre 300 e 420 nm.

#### 4.9.2 Supressão de Fluorescência por acrilamida

A inserção do triptofano nas interfaces foi avaliada a partir do experimento de supressão de fluorescência por acrilamida. As mesmas condições de equipamento e amostras do experimento de fluorescência intrínseca foram utilizadas para realização das análises de supressão de fluorescência de Trp. Para a supressão da fluorescência do resíduo de triptofano (Trp-2) do LyeTx-I, foi preparada uma solução estoque de acrilamida 4,0 M para a titulação, tanto na presença, quanto na ausência de uma interface biomimética. A titulação com a acrilamida foi realizada até a concentração de 0,2 M, em todas as amostras.

A determinação do coeficiente de *Stern-Volmer* ( $k_{SV}$ ), diretamente proporcional à exposição do resíduo de Trp à acrilamida, ocorreu de acordo com a Equação 4:

$$\frac{I_0}{I_i} = 1 + k_{SV}[Q] \quad \text{Equação 4}$$

em que  $I_0$  é a intensidade inicial e  $I_i$  a intensidade na concentração  $[Q]$  de acrilamida.

#### 4.10 Calorimetria de Titulação Isotérmica ITC

As análises de calorimetria de titulação isotérmica ITC foram realizadas em microcalorímetro VP-ITC da Malvern® (Malvern, Reino Unido), a 25° C no LASEB, UFVJM. A calibração do equipamento foi realizada com água deionizada Milli-Q® tipo 1, os dados foram tratados em *software Microcal Origin*® 7.0 para ITC. As soluções utilizadas foram previamente degaseificadas em acessório *Microcal Thermovac*® da marca Malvern®.

Cada experimento consistiu de 30 injeções sucessivas de 5 µL de titulante (LUVs) na cela de reação preenchida com 1,4 mL de solução de peptídeo, em intervalos de 300 s. Para eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a célula calorimétrica, foi descartada a primeira injeção de 1 µL. Experimentos de diluição de LUVs e de peptídeos foram realizados por injeções das amostras em tampão Tris-HCl.

As isotermas obtidas para cada análise foram analisadas no *Microcal Origin 7.0* para ITC, *software* do próprio equipamento, descontando os experimentos de diluição.

#### 4.11 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

A avaliação do efeito do peptídeo na estabilidade de LUVs de POPC e POPC:POPG (3:1) foi realizado por medidas de diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) e potencial zeta ( $\zeta$ ), empregando-se um analisador de partículas *Zetasizer nano ZS* da Malvern® modelo BI-900 (Worcestershire, Reino Unido) no Departamento de Farmácia da UFVJM.

Utilizou-se uma cubeta de 700  $\mu\text{L}$  adquirida da Malvern® - modelo DTS1060. A intensidade da luz aplicada sobre as amostras foi determinada a partir do espalhamento de luz a  $90^\circ$ , realizou-se espalhamento de luz monocromática (laser de Ne 4 mW,  $\lambda$  633 nm) e potenciais acima de 500 mV. Foram realizadas titulações de 5  $\mu\text{L}$  de solução de peptídeo (50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em dispersão de LUVs de POPC e POPC:POPG (3:1) (500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), à temperatura ambiente.

Para a obtenção de cada ponto da titulação, determinou-se a média de três leituras sucessivas para  $D_h$  e 5 leituras para potencial  $\zeta$ . Além disso, afim de confirmar a repetibilidade do comportamento das curvas de titulação, foram realizadas triplicatas isoladas, para cada um dos meios.

#### 4.12 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  foram obtidos em um espectrômetro *Bruker*® AVANCE III 500, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás (UFG) e no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ambos operando a 500,13 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$ , a 125,75 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$  e 50.68 MHz para  $^{15}\text{N}$ . Os dados foram coletados a partir do *software Topspin 3.1 – Bruker BioSpin*®. Foi preparada uma solução contendo 2 mM de LyeTx-I e 200 mM de SDS- $d_{25}$  dissolvido em água acidificada (pH 4,0) com 10 % (v/v) de  $\text{D}_2\text{O}$  e 1 % (v/v) de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS), utilizado como padrão de referência interna. A amostra foi mantida em repouso por cerca de 30 min para estabilização do meio micelar.

Os experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  foram realizados empregando-se o programa de pulsos *zg30* para homogeneização do campo (*shimming*), calibração de pulso e determinação do valor de frequência de irradiação do sinal da água (*ol*). Além disso, realizaram-se também experimentos unidimensionais de  $^1\text{H}$  com supressão do sinal de água por WATERGATE, aplicando-se os programas de pulsos *zgcppr* e *zggpw5*. Os experimentos

bidimensionais homonucleares de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY e o heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC foram realizados usando uma sonda banda larga inversa de tripla ressonância (TBI - *Triple Resonance Broadband Inverse*).

Os parâmetros empregados para o experimento de TOCSY foram janela espectral (Sorensen *et al.* 2006) de 6009,6 Hz (12 ppm), número de pontos no domínio do tempo (TD) de 4096 em F2 e 256 em F1. Aplicou-se o programa de pulsos *dipsi2esgpph* (Hwang & Shaka, 1995; Shaka et al., 1988) com 96 varreduras (*ns*) e 16 varreduras de espera. O pulso de radiofrequência utilizado foi  $90^\circ$  (*p1*) de 10,88  $\mu\text{s}$  e com tempo de mistura (*d9*) de 80 ms e modo de aquisição STATES-TPPI.

A aquisição dos experimentos de NOESY foram realizadas tendo como parâmetros janela espectral (Sorensen *et al.*) de 6009,15 Hz (12 ppm), número de pontos no domínio do tempo (TD) de 4096 em F2 e 512 varreduras em F1. Foi aplicada a sequência de pulsos *noesyegpph* (Liu, M. E. A., 1998) com 114 varreduras (*ns*) e 16 varreduras de espera. O pulso de radiofrequência empregado  $90^\circ$  (*p1*) de 11,13  $\mu\text{s}$  em. Os experimentos de TOCSY e NOESY foram analisados com tempo de mistura (*d8*) e 250 ms em modo de aquisição TPPI.

O experimento de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC em meio de SDS foi obtido utilizando-se o programa de pulsos *hsqcetgp* (Stelten e Leibfritz, 1996). Aplicaram-se como parâmetros: janela espectral (Sorensen *et al.* 2006.) de 11319,0 Hz (90 ppm) em F1 e 6009,6 Hz (12 ppm) em F2, número de pontos no domínio do tempo (TD) de 4096 em F2. Foram realizadas 150 varreduras em F1, sendo 16 varreduras de espera, no modo de aquisição *Echo-AntiEcho*-TPPI.

O experimento SF- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMQC foi obtido aplicando-se janelas espectrais (Sorensen *et al.* 2006) de 6009,15 (12,01 ppm) em F1 e 1773,7 Hz (34,99 ppm) em F2, programa de pulsos *sfhmqcf3gpph* (Schanda *et al.*, 2005), número de pontos no domínio do tempo (TD) de 1024 em F2 e 44 em F1. Foram realizadas 150 varreduras e o modo de aquisição STATES-TPPI com desacoplamento durante a aquisição.

O processamento dos dados foi realizado em plataforma *Linux* na distribuição Fedora, versão 14, empregando-se o pacote computacional NMRPIPE<sup>®</sup> (Delaglio *et al.*, 1995). Os assinalamentos dos mapas de contornos de RMN foram realizados com o auxílio do programa NMRVIEW<sup>®</sup> versão 5.0.4 (Johnson e Blevins, 1994).

Seguindo procedimento padrão de atribuição sequencial desenvolvido por (Wüthrich, 1986) foram atribuídas as correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  intra e interresiduais de cadeias principal e cadeias laterais nos mapas de contornos TOCSY e NOESY. Os mapas de contornos heteronucleares  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HMQC foram utilizados para eliminar

ambiguidades e determinar os deslocamentos químicos  $^{13}\text{C}$  de  $\text{C}_\alpha$  e  $\text{C}_\beta$  e  $^{15}\text{N}$  de nitrogênios amídicos.

A intensidade dos sinais de NOEs e os deslocamentos químicos foram convertidos em distâncias semiquantitativas e ângulos diedros respectivamente. Estes foram empregados como restrições geométricas, para realização dos cálculos de dinâmica molecular (Shen *et al.*, 2009), no programa XPLOR-NIH<sup>®</sup> (Rice e Brünger, 1994; Schwieters *et al.*, 2006). Os volumes de sinais de NOE foram classificados como forte, médio e fraco e convertidos em limites superiores de distância 2,8; 3,4 e 5,0 Å, respectivamente. Sendo os NOEs de curta distância relativos às correlações ( $i, i+1$ ), média distância ( $i, i+k$ ) com  $2 \leq k \leq 4$ , longa distância os sinais de correlações ( $i, i+k$ ) com  $k > 4$ . Os deslocamentos químicos foram utilizados para determinação das restrições ângulos de diedros  $\varphi$  e  $\psi$  pelo programa TALOS+<sup>®</sup> integrante do NMRPIPE<sup>®</sup>.

O conjunto de restrições geométricas foi analisado segundo a contribuição e consistência de cada restrição, avaliando-se os parâmetros de unicidade de informação ( $I_{\text{uni}}$ ), por meio o programa QUEEN (*Quantitative Evaluation of Experimental NMR Restraints*) (Nabuurs *et al.*, 2004).

Utilizando-se o programa XPLOR-NIH, foram feitos os cálculos para obtenção das estruturas tridimensionais, segundo o protocolo de arrefecimento simulado por dinâmica de ângulos de torção (*simulated annealing*) *nmr\_torsion*. (Rice e Brünger, 1994; Schwieters *et al.*, 2006). Os cálculos foram realizados considerando-se uma temperatura inicial de 50000 K com total 1000 de etapas de dinâmica molecular em altas temperaturas. A simulação de resfriamento foi realizada em duas etapas. Na primeira delas, alteraram-se as posições atômicas por meio de variação dos ângulos de torção e, na segunda, as posições dos átomos foram alteradas pela variação de coordenadas cartesianas. Para a primeira etapa, aplicou-se um resfriamento de 50000 K até 1000 K, com etapas sucessivas de -49 K. Na segunda etapa, a variação de temperatura de resfriamento simulado foi de de 1000 K até 300 K, em etapas de -50 K. O limite máximo permitido para violações de restrições de distância aplicado para os cálculos foi de 0,5 Å, e utilizou-se como topologia e parâmetros para o cálculo os arquivos *parallhdg.pro* e *topallhdg.pro*. As 100 estruturas geradas foram refinadas com o cálculo de refinamento do protocolo *prot\_sa\_refine\_nogyr.inp* (Rice e Brünger, 1994; Schwieters *et al.*, 2003; Schwieters *et al.*, 2006).

As dez (10) estruturas de menor energia foram analisadas por meio do programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996). Para avaliar a qualidade das estruturas foi construído o diagrama Ramachandran, através da plataforma *on-line Protein Structure Validation Software*

*Suite* (PSVS) ([psvs-1\\_4-dev.nesg.org/](http://psvs-1-4-dev.nesg.org/)), e, também na plataforma PSVS, foram realizados os cálculos dos desvios médios quadráticos (*Root of Mean Square Deviations* - RMSD) definidos pela Equação 5 (Verly, 2010).

$$RMSD(N; x, y) = \left[ \frac{\sum_{i=1}^N w_i \|x_i - y_i\|^2}{N \sum_{i=1}^N w_i} \right]^{1/2} \quad \text{Equação 5}$$

#### 4.13 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em fase sólida

Os experimentos de RMN em fase sólida de  $^{31}\text{P}$  e  $^{15}\text{N}$  desacoplados de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro *Bruker*<sup>®</sup> AMX400 *wide-bore*. Os experimentos de  $^2\text{H}$  em fase sólida foram realizados em espectrômetro *Bruker Avance 300 wide bore*.

Para obtenção dos espectros de  $^{31}\text{P}$  desacoplado de hidrogênio, utilizou-se sonda comercial estática de dupla ressonância para RMN no estado sólido, com bicamadas lipídicas orientadas. Aplicou-se um campo magnético de 162,0 MHz, com orientação normal da bicamada paralela ao campo magnético externo. Empregou-se uma sequência de pulsos de eco de *Hahn* (Rance e Byrd, 1983) com os seguintes parâmetros: janela espectral de 75 kHz, tempo de aquisição de 13,6 ms, 2048 pontos, pulsos de 90° com largura de 2.5 μs, intervalo de tempo de eco 40 μs, intervalo de tempo de espera 5 s e 64 transientes. Utilizou-se como referência externa (0 ppm) uma solução de ácido fosfórico a 85 % v/v.

A obtenção dos experimentos de  $^{15}\text{N}$  desacoplados de hidrogênio foi realizada utilizando sonda comercial *E-free* de dupla ressonância para RMN no estado sólido. Aplicou-se um campo magnético de 40,0 MHz, com orientação da normal da bicamada paralela ao campo magnético externo. Uma amostra de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  foi utilizada como padrão de referência externa cujo sinal característico ocorre em 41,5 ppm. Foram empregados os seguintes parâmetros: pulsos de 90° com largura de 8 μs, tempo de tranca (*lock*) de campo de 700 μs, intervalo de tempo de espera de 3,5 s, 512 pontos de domínio de tempo, 18.000 aquisições e janela espectral de 33 KHz.

O peptídeo foi solubilizado em aproximadamente 2 mL de 3,3,3-trifluoroetanol (TFE). Para determinação do pH da solução considerando alto grau de hidratação do sistema, aplicou-se uma pequena quantidade da solução alcoólica sobre um papel indicador e, após a evaporação do solvente, o papel foi umedecido em água deionizada, revelando, portanto, o pH do meio. O ajuste do pH da solução foi realizado com mínimos volumes de soluções 1 M de

HCl e NaOH. Após o ajuste do pH solubilizou-se na mesma solução estoque de peptídeo, a quantidade determinada de POPC. Evaporou-se o solvente da solução, até a obtenção de um líquido viscoso, com fluxo de N<sub>2(g)</sub>. A mistura contendo peptídeo e fosfolipídeo foi distribuída sobre placas de vidro ultrafinas 8 × 22 mm<sup>2</sup>, *Marienfeld*<sup>®</sup>, (Lauda-Königshofen, Alemanha) e mantida sob vácuo por uma noite para completa remoção do TFE. As amostras foram hidratadas em câmara de hidratação com umidade relativa de 93 % por cerca de 7 dias. Ao final, as placas de vidro foram empilhadas e seladas com fita teflon<sup>®</sup> e plástico.

## 5. Resultados e Discussões

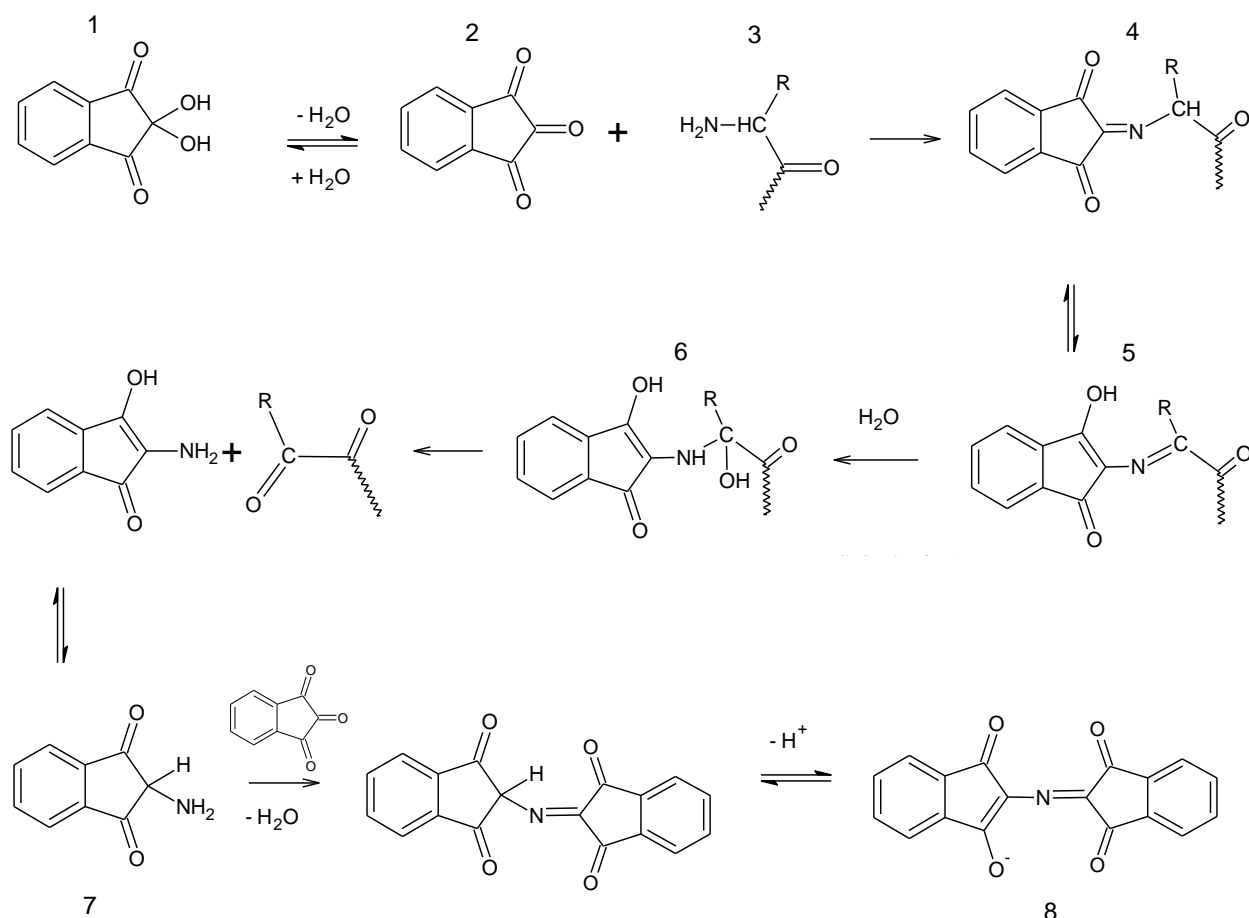
### 5.1 Obtenção e caracterização do peptídeo LyeTx-I

Conforme descrito na p. 23, as sínteses dos peptídeos LyeTx-I sem marcação e com marcação isotópica nas posições Leu-13 com  $^{15}\text{N}$  e Ala-18 com  $^2\text{H}$  foram realizadas manualmente segundo a metodologia de SPFS, via estratégia Fmoc (Chan e White, 2000). Para a ligação do derivado de aminoácido C-terminal à resina (reações de acoplamento) e a formação das ligações peptídicas foram utilizados os ativadores do grupo carboxila, DIC e HOBt. O tempo de reação, a quantidade de excesso de derivados de aminoácidos e o resultado dos testes de *Kaiser*, realizado sempre após cada etapa de desproteção do grupo  $\alpha$ -amino e acoplamento, para acompanhamento das sínteses, estão apresentados nas Tabela 6 (p. 92) e Tabela 7 (p. 93) – ANEXO.

No teste de *Kaiser*, os grupos amino livres reagem com moléculas de ninidrina, segundo as etapas apresentadas na Figura 14 (p. 39), formando uma substância altamente conjugada que confere aos grãos da resina uma coloração azulada, indicando resultado positivo para grupos amino livres. Na primeira etapa a ninidrina **1** passa por um processo de desidratação para formação do composto **2**, altamente insaturado e conjugado. Em seguida, o composto **2** reage com o grupo amino livre de **3** para a formação de **4**. Ocorre migração de próton no composto **4** para formação de **5**, que é reidratado, formando o composto **6**. Numa etapa seguinte, o composto **7** reage com o composto **2**, já presente no meio, que, em meio básico, forma então o azul de Ruhemann **8**, que confere a coloração característica da peptidil-resina com o grupo amino terminal desprotegido. O ensaio químico também foi empregado para caracterização de reações de acoplamento. Neste caso, após a introdução de um novo derivado de aminoácido protegido com grupamento Fmoc, a peptidil-resina não reage com a ninidrina e, conseqüentemente, não há alteração na coloração dos grãos da resina (resultado negativo).



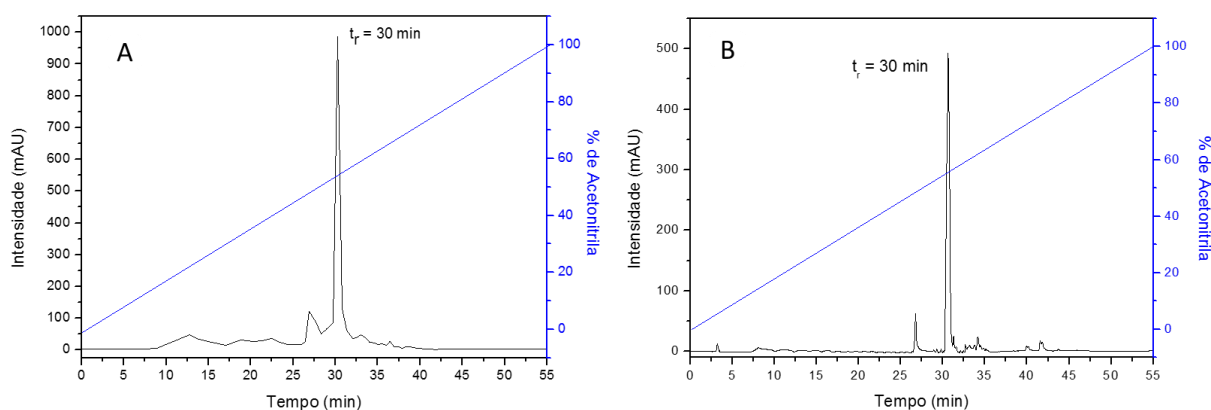
**Figura 14:** Etapas da reação da ninidrina com grupos amino de resíduos de aminoácidos para detecção de amina primária livre (Teste de *Kaiser*)(Resende, 2008).



Conforme evidenciado nos testes, o processo de síntese não apresentou dificuldade tanto para obtenção de LyeTx-I quanto <sup>2</sup>H<sup>15</sup>N-LyeTx-I. Todos os derivados de aminoácidos foram acoplados na primeira tentativa. Na síntese do peptídeo marcado isotopicamente, os derivados marcados foram reacoplados apenas para garantir a obtenção do peptídeo de interesse e possibilitar a realização dos experimentos de RMN em fase sólida.

Ao final das sínteses, foi realizada a etapa de clivagem para separação do peptídeo do suporte polimérico e remoção dos grupos protetores de cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Chan e White, 2000). Em seguida, os peptídeos brutos foram liofilizados e submetidos à análise em CLAE para avaliação da qualidade da síntese e purificação do produto. As sínteses apresentaram elevada eficiência caracterizada pela presença de apenas um pico proeminente em um tempo de retenção (*t<sub>r</sub>*) de 30 minutos, conforme observado nos cromatogramas da Figura 15 (p. 40). Entretanto, devido à presença de subprodutos em diferentes tempos de retenção foi necessária a purificação das amostras brutas das sínteses.

**Figura 15:** Perfil de CLAE da amostra bruta da síntese de LyeTx-I (A) e  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I (B). Amostra injetada (100  $\mu\text{L}$  de uma solução a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em coluna C18 Vydac<sup>®</sup> 218TP510 (250 mm x 10 mm) equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição: solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorbância foi monitorada em  $\lambda_{\text{máx}}$  214 nm.

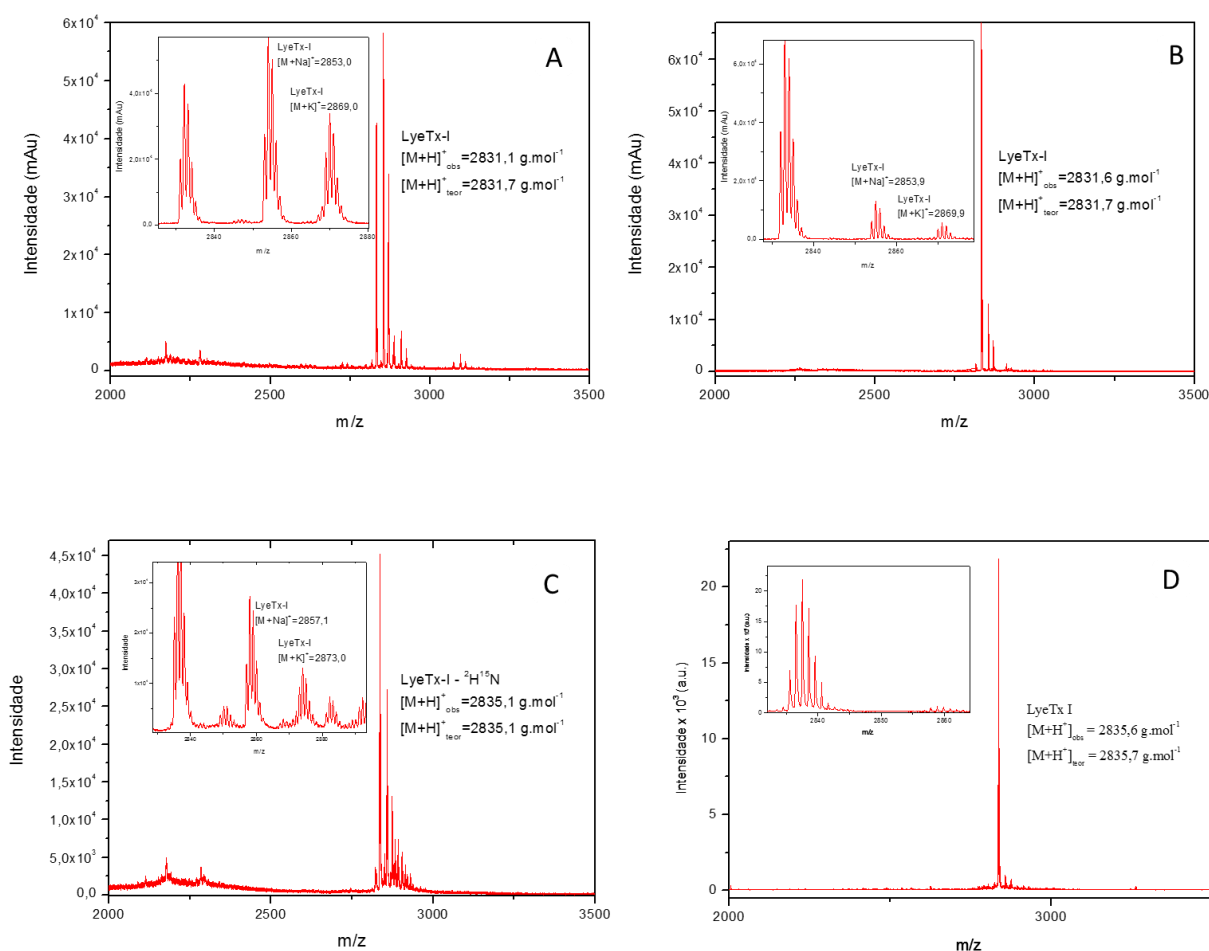


As alíquotas coletadas das análises cromatográficas entre 30 e 32 minutos foram caracterizadas por espectrometria de massa em equipamento do tipo MALDI-ToF/ToF. Os espectros de massas das amostras de produto bruto e purificado das sínteses de LyeTx-I, estão apresentados na Figura 16 (p. 41). É possível identificar, para a amostra bruta de LyeTx-I (Figura 16A, p. 41), os sinais correspondentes aos íons  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  2831,08, assim como os adutos formados com íons de sódio,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  2853,01, e de potássio,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  em  $m/z$  2869,01. No espectro obtido para a amostra de LyeTx-I purificada (FIG. 16B, p. 41), foram observados sinais referentes aos mesmos íons correspondentes  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  2831,64, e os adutos formados com íons de sódio,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  2853,95, e de potássio,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  em  $m/z$  2869,90.

O peptídeo  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I, foi também caracterizado por MALDI-ToF. Nos espectros obtidos para as amostras bruta e purificada da LyeTx-I marcada, verificou-se a presença dos sinais em ( $m/z$ ) iguais aos valores observados para o peptídeo não marcado, acrescidos de 4, diferença devida à marcação isotópica utilizada, e equivalente à massa molecular esperada. O espectro de massas obtido está representado na Figura 16. É possível identificar para a amostra bruta (FIG. 16, p. 41) os sinais correspondentes aos íons  $[\text{M}+\text{H}]^+$  em  $m/z$  2835,15, assim como os adutos formados com íons de sódio,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$

2857,06, e de potássio,  $[M+K]^+$  em  $m/z$  2873,02. Esse peptídeo foi utilizado para os ensaios em RMN de fase sólida.

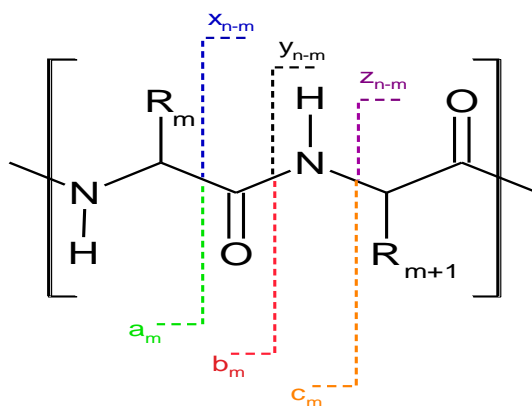
**Figura 16:** Espectro de massas MALDI-ToF obtidos no modo positivo para amostra bruta (A) e purificada (B) para peptídeo LyeTx-I sintetizado sem marcação isotópica. Espectro de MALDI-ToF, obtido para amostra do peptídeo LyeTx-I marcada isotopicamente nas posições L-13 com  $^{15}N$  e A-18 com  $^2H_3$ , amostra bruta (C) e purificada (D).



Foi realizado ainda, o sequenciamento dos peptídeos sintetizados a fim de se confirmar a sequência primária dos mesmos em equipamento *Bruker-UltraFlex*. Foi aplicado método MS/MS, a fragmentação ocorreu em uma célula de *LIFT*, para promover a fragmentação do íon molecular a partir de quebras de ligações da cadeia principal do peptídeo. Cada tipo de ligação quebrada produz íons característicos, que possibilitam a identificação dos resíduos de aminoácidos presentes na sequência primária. A análise baseia-se principalmente na observação de íons derivados de duas séries, *-b* e *-y*, que correspondem

aos íons formados da quebra de ligações peptídicas a partir das extremidades *N*-terminal e *C*-terminal, respectivamente. A Figura 17 apresenta um esquema ilustrativo das possíveis fragmentações e as séries de íons formados para uma sequência peptídica, segundo a nomenclatura proposta por *Roepstorff-Fohlmann-Biemann* (Roepstorff e Fohlman, 1984; Asmelash, 2016).

**Figura 17:** Principais ligações suscetíveis a quebras e nomenclatura proposta por *Roepstorff-Fohlmann-Biemann* para os fragmentos de cadeias peptídicas formados a partir da fragmentação via espectrometria de massa. Fonte: Adaptada de Asmelash, (2016).

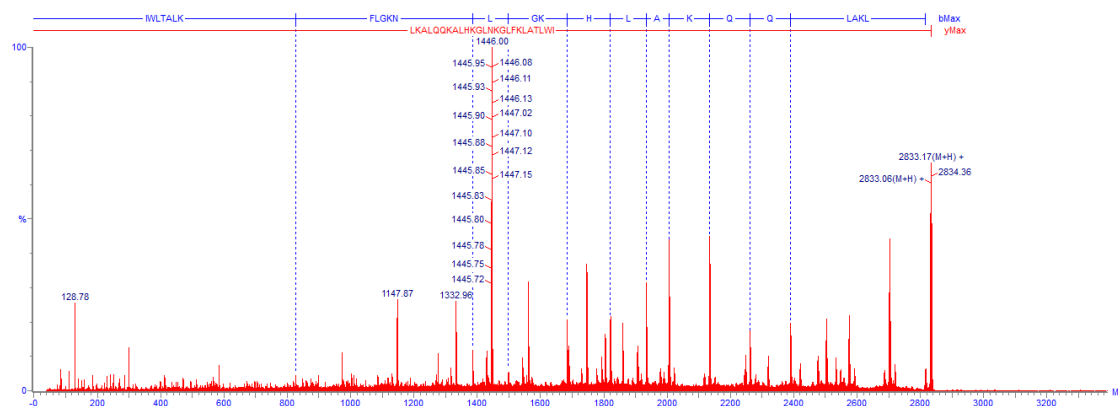


Em que  $n$  corresponde ao número total de resíduos de aminoácidos presentes na sequência primária e  $m$ , ao o número de resíduos correspondentes

O sequenciamento foi realizado empregando-se amostras purificadas das sínteses de LyeTx-I. A série *-b* foi o ponto de partida para identificação dos íons correspondentes a cada resíduo de aminoácido.

A Figura 18 (p. 43) apresenta o espectro obtido para o peptídeo LyeTx-I não marcado isotopicamente, adquirido em modo positivo, em um equipamento *Bruker-UltraFlex*. Com identificação dos íons correspondentes à série *b*, foi possível a caracterização da estrutura primária de LyeTx-I presente na amostra sintetizada.

**Figura 18:** Espectros de massa MALDI-ToF MS/MS do peptídeo LyeTx-I, mostrando os fragmentos obtidos a partir da amostra purificada, adquiridos no modo positivo em equipamento *Bruker-UltraFlex*.



Após caracterizar e confirmar a obtenção do peptídeo de interesse, foram elaborados experimentos para estudos estruturais e de interação peptídeo-membrana. Foram utilizados diferentes meios biomiméticos a fim de se compreender a relação entre a estrutura e a atividade do peptídeo LyeTx-I. Para as análises estruturais e de interação peptídeo-membrana foram utilizadas amostras purificadas do peptídeo LyeTx-I, sem marcação isotópica. Apenas para estudos de orientação, foram realizados experimentos de RMN em fase sólida, utilizando a amostra isotopicamente marcada de LyeTx-I.

## 5.2 Estudos estruturais e de interação em meios biomiméticos

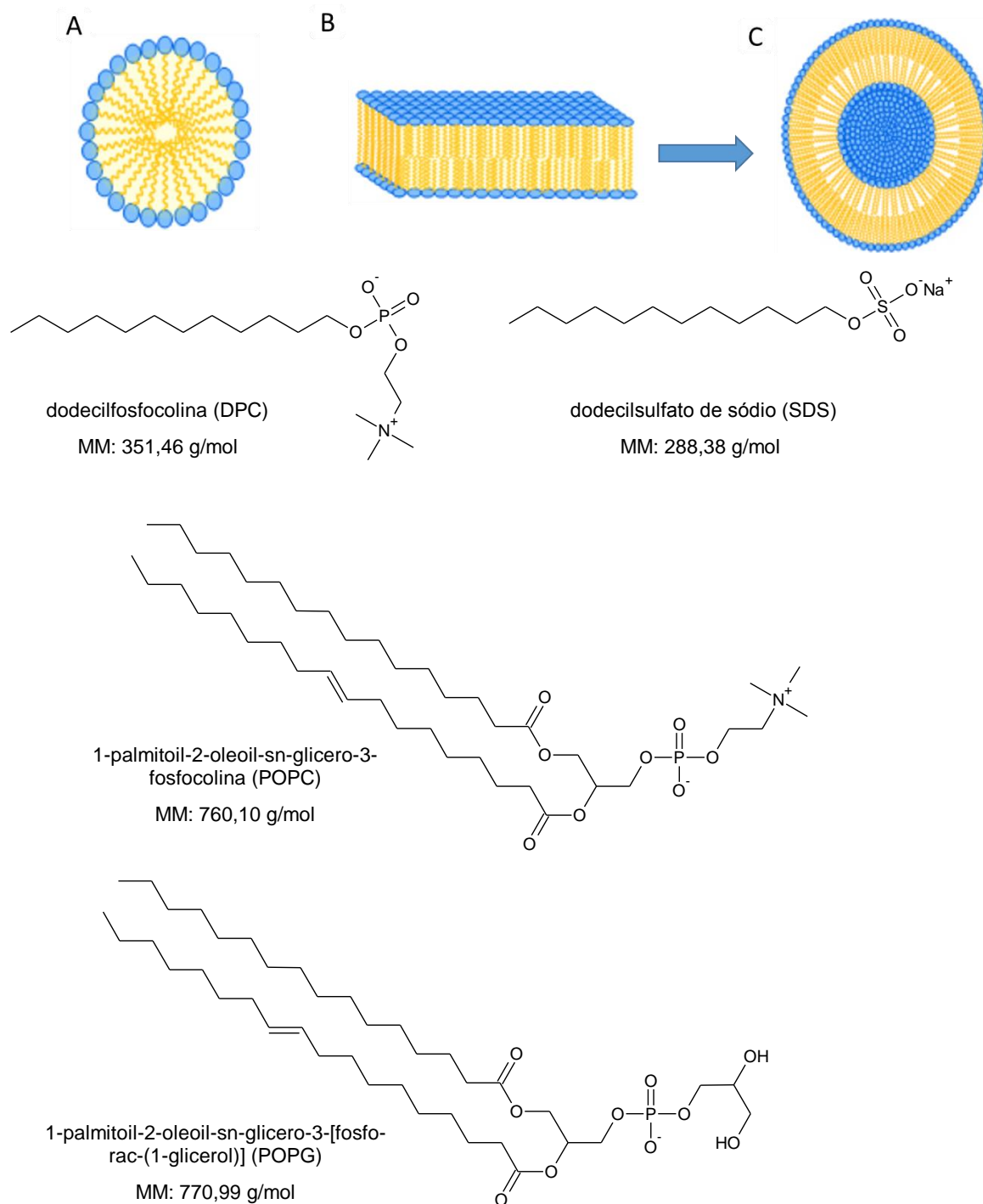
A fim de se compreender melhor o modo de ação de LyeTx-I, foram propostos neste trabalho estudos da interação peptídeo-membrana. Para isto, foram preparados: meios micelares, empregando tensoativos, e vesiculares, a partir de fosfolipídeos, ambos de composições químicas variáveis para mimetizar membranas celulares.

Os tensoativos são moléculas compostas por um grupo polar (cabeça polar), ligado a uma cadeia carbônica apolar, que em solução aquosa, e acima da concentração crítica micelar, tendem a formar agregados esféricos denominados micelas (Figura 19A, p.45). A formação da micela ocorre quando essas moléculas apresentam uma seção transversal maior na porção hidrofílica, do que na porção hidrofóbica, o que impossibilita a autoassociação dessas moléculas em estruturas planares (Ollivon *et al.*, 1988). Por outro lado, os fosfolipídios são moléculas que apresentam seção transversal da porção hidrofílica semelhante à da porção

hidrofóbica. Essa característica faz com que se forme outro tipo de agregado, denominado de vesícula fosfolipídica (FIG. 19B, p. 45).

Os estudos deste trabalho buscaram uma comparação entre meios que mimetizam membranas eucariotas e membranas procariotas. As membranas eucariotas são compostas principalmente de esfingomielina, fosfatidilcolina (FIG. 42, p. 90 – ANEXO) que conferem a ela característica zwitteriônica. Também estão presentes na estrutura membranosa de eucariotos moléculas de colesterol (FIG. 42, p. 90 – ANEXO) (Warschawski *et al.*, 2011). Em contrapartida, as membranas procariotas são compostas principalmente de fosfatidilglicerol e cardiolipina (FIG. 43, p. 91 – ANEXO), e conseqüentemente, predominantemente negativas (Zorko *et al.*, 2009; Galdiero *et al.*, 2013). Nesse sentido, foram preparados meios micelares de dodecilsulfocolina (DPC) e dodecilsulfato de sódio (SDS), além de vesículas fosfolipídicas de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) e vesículas mistas de POPC e 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilglicerol (POPG) (3:1), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 19 (p. 45).

**Figura 19:** Agregados de moléculas anfifílicas utilizadas como meios biomiméticos. Estrutura representativa de micela (A), bicamada lipídica (B) e vesículas ou lipossomas (C). Fonte: Adaptado de (Verly, 2010). Estrutura representativa das moléculas de detergente DPC, SDS e dos fosfolípidos POPC e POPG.



### 5.2.1 Dicroísmo Circular (CD)

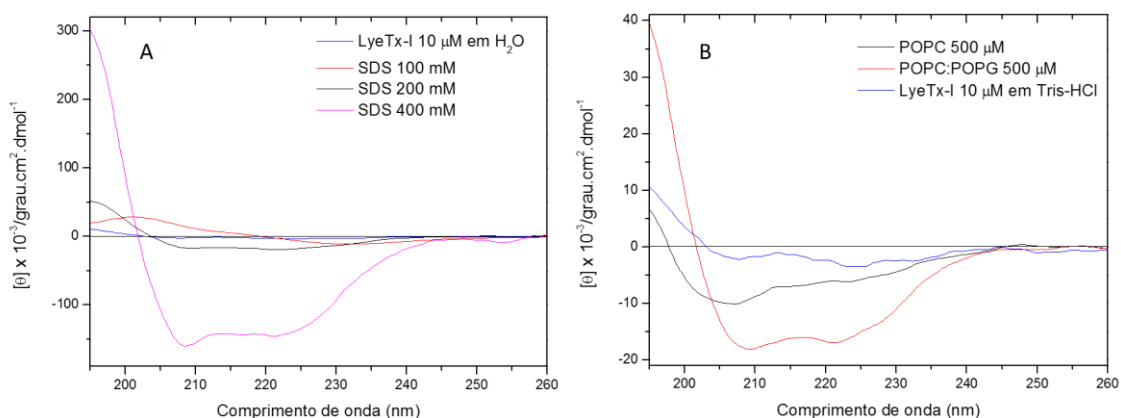
Muitos trabalhos relatam que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos inicia-se por mudanças conformacionais que propiciam melhor interação com a membrana bacteriana (Nguyen *et al.*, 2011; Voievoda *et al.*, 2015; Kosikowska e Lesner, 2016). Dessa forma, foram obtidos espectros de dicroísmo circular (CD) em diferentes meios para avaliar o comportamento conformacional do peptídeo LyeTx-I. Os meios empregados para aquisição de espectros de CD de LyeTx-I (10  $\mu\text{M}$ ) foram: soluções aquosas de micelas de SDS nas concentrações de 100, 200 e 400 mM, e soluções de 500  $\mu\text{M}$  de vesículas unilamelares (LUVs) de POPC e POPC:POPG (3:1) em tampão Tris-HCl 10 mM.

A Figura 20 (p. 47) apresenta os espectros de CD obtidos nos diferentes meios citados. Observou-se que o peptídeo não apresenta conformação preferencial em solução aquosa ou tampão Tris-HCl pH 8,5 (curvas em azul, FIG. 20, p. 47). Entretanto, mudanças significativas foram observadas no perfil dos espectros de CD de LyeTx-I na presença de micelas de SDS. O aumento da amplitude dos sinais observados nos espectros, com mínimos em  $\lambda_{\text{máx}}$  208 nm e  $\lambda_{\text{máx}}$  222 nm, e um máximo em  $\lambda_{\text{máx}}$  196 nm é um indício de conformação predominantemente helicoidal (Greenfield, 2006). Esse comportamento foi observado a partir da concentração de 200 mM de SDS, atingindo um conteúdo de hélice de 70% neste meio. O maior índice de helicidade molar ( $H$ ) de LyeTx-I foi observado em presença de 400 mM de SDS ( $H = 81\%$ ). Segundo dados publicados por Santos *et al.* (2009), em presença de micelas de DPC o conteúdo de hélice obtido para o peptídeo LyeTx-I foi menor nas duas concentrações. Em presença de 200 mM de DPC foi obtido ( $H = 32\%$ ) e em 400 mM de DPC ( $H = 55\%$ ) (Santos *et al.*, 2009) que evidenciam uma interação mais efetiva com os meios micelares aniônicos, quando comparados ao zwitteriônicos.

O comportamento conformacional do LyeTx-I na presença de LUVs de 100 nm (FIG. 20B, p. 47) mostrou-se semelhante ao observado para os sistemas micelares de SDS. Nota-se uma curva característica de conformação em  $\alpha$ -hélice em ambos os meios POPC e POPC:POPG. Em vesículas zwitteriônicas, o conteúdo máximo de hélice calculado foi próximo a 25%, enquanto que em vesículas predominantemente negativas o teor de helicidade atingiu 64%. Este resultado sugere maior interação do peptídeo com as LUVs negativas de POPC:POPG quando comparadas com LUVs de POPC (coerente com a natureza catiônica do LyeTx-I) e, conseqüentemente, maior estruturação do peptídeo nesse meio, conforme já observado para outros peptídeos catiônicos como a mangainina 2 amidada (Wieprecht *et al.*, 2000).



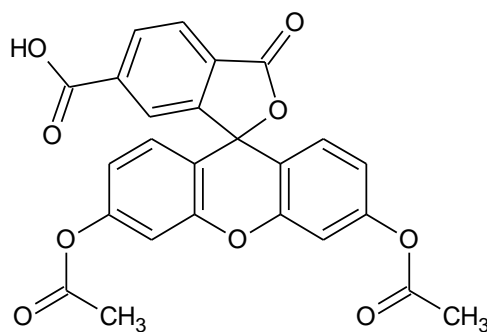
**Figura 20:** Espectros de CD obtidos para LyeTx-I (10  $\mu\text{M}$ ) em (A) soluções aquosas e na presença de micelas de SDS (100, 200 e 400 mM) e (B) na presença de LUVs de POPC e POPC:POPG (500  $\mu\text{M}$ ) em tampão Tris-HCl 10 mM.



### 5.2.2 Extravasamento de Carboxifluoresceína

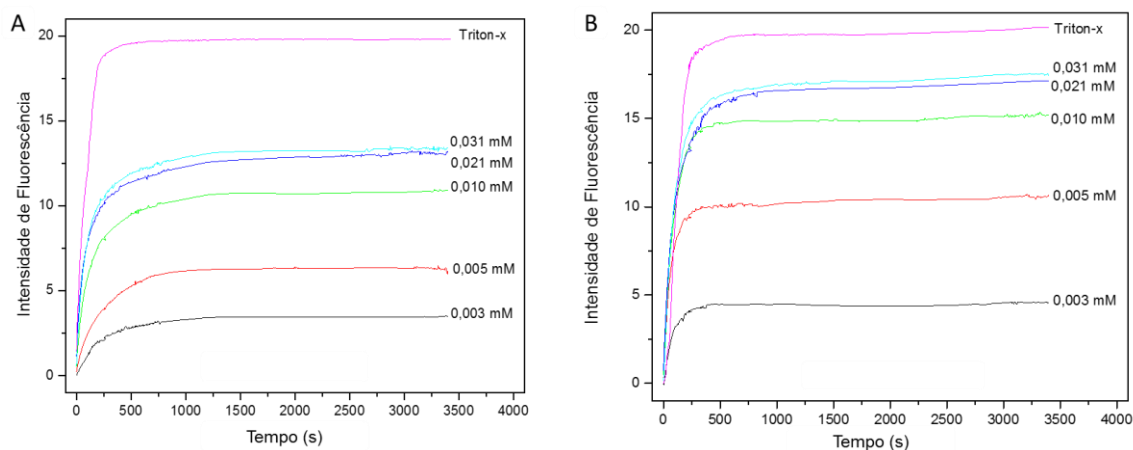
A fim de se avaliar a capacidade de formação de poros do peptídeo LyeTx-I, foram realizados experimentos de extravasamento de carboxifluoresceína (CF) em membranas fosfolipídicas. Para isso, foram preparadas dispersões de 1,0 mM de LUVs de POPC e POPC:POPG contendo CF (1,0 mM) encapsuladas. A CF é um composto altamente insaturado conjugado que possui propriedade fluorescente, a estrutura química representativa desse composto está apresentada na Figura 21.

**Figura 21:** estrutura química representativa da 5(6)-carboxifluoresceína.



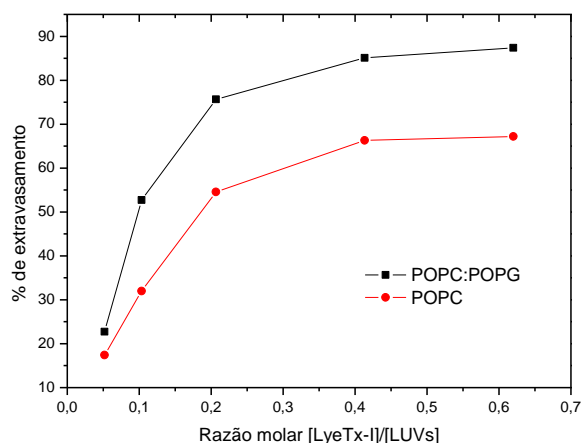
A Figura 22 mostra a variação de intensidade de fluorescência de CF em função do tempo, observada para cada experimento realizado nas diferentes concentrações de peptídeo. O detergente Triton<sup>TM</sup>-X100 foi escolhido como controle total de fluorescência devido à sua capacidade de promover elevada perturbação de membranas fosfolipídicas.

**Figura 22:** Variação da intensidade de fluorescência devido à liberação de CF das LUVs encapsuladas, provocada pela adição de LyeTx-I em concentrações variadas. Em A, estão representadas as curvas correspondentes à titulação de LyeTx-I em LUVs de POPC (1,0 mM), em B, as curvas correspondentes à titulação em LUVs de POPC:POPG (3:1) à mesma concentração. As concentrações de peptídeo estão identificadas ao lado direito de cada curva.



Observa-se, nos dois meios, que o aumento da concentração de peptídeo provoca um aumento da intensidade de fluorescência, decorrente do extravasamento de CF das LUVs, até atingir um máximo no qual não se observa mais alteração significativa. Isso ocorre devido à capacidade de perturbação na bicamada fosfolipídica de POPC e POPC:POPG (Alvarez *et al.*, 2003). Entretanto, em uma avaliação comparativa do extravasamento em LUVs de POPC e POPC:POPG nas mesmas concentrações de LyeTx-I, verifica-se maior intensidade de fluorescência no meio predominantemente aniônico de POPC:POPG, quando comparado ao meio zwitteriônico de POPC. Dessa forma, foi realizado um estudo da porcentagem de extravasamento de CF, medidas em 2500 s após a adição de LyeTx-I às LUVs, em função da razão molar peptídeo/LUVs para ambos os meios. Na Figura 23 (p. 49) observa-se que, mesmo em razão molar muito pequena (0,05), o peptídeo LyeTx-I já promove extravasamento nos dois meios vesiculares.

**Figura 23:** Gráfico de porcentagem de extravasamento de CF em função da razão molar peptídeo/LUVs.



Comparativamente, em todas as razões molares foram verificadas maiores porcentagens de extravasamento em vesículas de POPC:POPG em comparação com vesículas POPC, atingindo um valor máximo de 87% para as vesículas aniônicas e 67% para as zwitteriônicas. Nesse sentido, a maior capacidade lítica de LyeTx-I frente a vesículas negativas deve estar associada ao maior conteúdo helicoidal do peptídeo neste meio, conforme observado nos dados de CD, e conseqüentemente, à maior interação de LyeTx-I com as LUVs aniônicas (Sorochkina *et al.*, 2013).

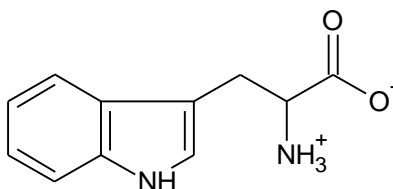
Para compreender melhor a interação do LyeTx-I com meios biomiméticos e o mecanismo de ação desse peptídeo, foram propostos estudos de fluorescência intrínseca de triptofano. Com esse experimento é possível avaliar o ambiente químico em que o resíduo de Trp, presente na região *N*-terminal do peptídeo LyeTx-I, encontra-se quando em presença de interfaces biomiméticas vesiculares de POPC e POPC:POPG, e micelares de DPC e SDS.

### 5.2.3 Fluorescência intrínseca de Trp

O resíduo de Trp (FIG. 24, p. 50) apresenta cadeia lateral pouco polar, insaturada e conjugada, características estas, importantes para a atividade de muitos PAMs. O anel indólico presente em sua estrutura, confere ao Trp a capacidade de interagir tanto na região de interface da bicamada lipídica, com também na porção hidrofóbica dessa estrutura (Chan *et al.*, 2006; Sorochkina *et al.*, 2013). Além disso, o Trp apresenta capacidade de emissão de fluorescência na faixa de aproximadamente 280 nm a 360 nm em peptídeos e proteínas (Teale

e Weber, 1957).

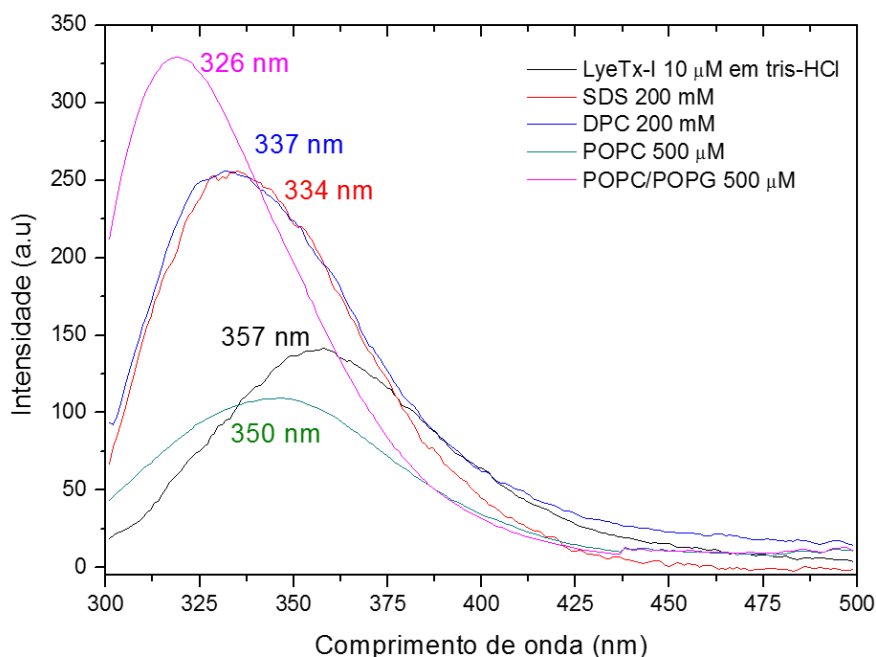
**Figura 24:** Estrutura química representativa do Triptofano (Trp).



Nos experimentos de fluorescência intrínseca de Trp, foi avaliada a fluorescência natural do resíduo de triptofano, presente na posição 2 (Trp-2) da sequência primária do peptídeo LyeTx-I, em meios biomiméticos de micelas de DPC, SDS e vesículas fosfolipídicas de POPC, POP:POPG. Inicialmente, fez-se a determinação da fluorescência emitida para o peptídeo LyeTx-I em solução aquosa e em tampão Tris-HCl. Foram definidos como brancos, os valores de fluorescência de todos os meios biomiméticos na ausência de peptídeo. A emissão máxima de fluorescência, assim como o centro de massa espectral, do peptídeo foi observada em  $\lambda_{\text{máx}}$  357 nm. Esse comportamento de emissão em comprimento de onda elevado é esperado para peptídeos nos quais o resíduo de triptofano se apresenta exposto ao ambiente polar da água (Alston *et al.*, 2008). Essa exposição ocorre devido à ausência de uma interface biomimética o que confere a estrutura peptídica uma elevada dinâmica conformacional, conforme já observado nos espectros de CD em solução aquosa.

Os experimentos seguintes foram realizados em presença de meios micelares de SDS e DPC (200 mM) e de meios vesiculares de POPC e POPC:POPG (500  $\mu$ M). A Figura 25 (p. 51) apresenta os espectros de emissão de fluorescência do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I obtidos nos diferentes meios biomiméticos. Quando o peptídeo está na presença das micelas ou das vesículas, ocorrem alterações no comprimento de onda da emissão máxima, no centro de massa espectral e na intensidade de fluorescência. Esse resultado indica mudanças no ambiente químico que o resíduo de Trp-2 experimenta e, por consequência, pode-se inferir que o peptídeo interage e permeia as interfaces biomiméticas (Choi *et al.*, 2012).

**Figura 25:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I (10  $\mu\text{M}$ ) em solução tampão Tris-HCl (10 mM), na presença de meios micelares de DPC e SDS (200 mM) e vesiculares de POPC e POPC:POPG (500  $\mu\text{M}$ ). Em destaque os comprimentos de onda máximos de emissão para cada espectro.



A Tabela 3 resume os resultados extraídos dos espectros de fluorescência, na qual é possível verificar a variação ( $\Delta$ ) em relação ao peptídeo livre do  $\lambda_{\text{máx}}$  e do centro de massa (Monera *et al.* 1993) do espectro, este último calculado segundo a equação 3 (p. 31).

**Tabela 3:** Comprimento de onda da emissão máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) de fluorescência e centro de massa (CM) dos espectros do LyeTx-I livre e em presença de meios biomiméticos

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	CM (nm)	$\Delta\text{CM}$ (nm)
<b>LyeTx-I livre</b>	357	-	362	-
<b>DPC</b>	337	20	348	14
<b>SDS</b>	334	23	347	15
<b>POPC</b>	350	7	359	3
<b>POPC:POPG</b>	326	31	344	18

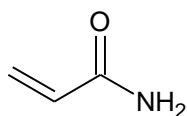
Tomando por base as medidas de CM, observa-se uma pequena variação ( $\Delta\text{CM} =$

3 nm) no comprimento de onda de emissão observado para o LyeTx-I em presença de vesículas de POPC, em relação ao espectro do peptídeo livre. Esse resultado permite inferir que, embora a cadeia peptídica de LyeTx-I possa interagir com a superfície da micela, o resíduo de Trp-2 encontra-se exposto ao ambiente polar da solução. Já em presença de vesícula de POPC:POPG, a variação observada foi mais expressiva ( $\Delta CM = 18$  nm) e o resultado sugere que o resíduo de Trp-2 encontra-se em um ambiente químico mais apolar, ou seja, mais inserido na interface da bicamada fosfolipídica de POPC:POPG. Comportamento similar pôde ser verificado para o peptídeo em presença de micelas de DPC ( $\Delta CM = 14$  nm) e SDS ( $\Delta CM = 15$  nm). Como os valores CM calculados para SDS, DPC e POPC:POPG foram muito próximos, não foi possível afirmar se há diferença na interação do resíduo de triptofano entre esses sistemas. Assim sendo, foram realizados estudos complementares utilizando a acrilamida como supressor da fluorescência intrínseca do triptofano.

#### 5.2.4 Supressão de Fluorescência por Acrilamida

Para avaliar o grau de exposição do resíduo de Trp-2 do LyeTx-I ao ambiente polar, foram utilizadas soluções aquosas de diferentes concentrações de acrilamida. Esse composto é hidrofílico e é capaz de suprimir a fluorescência de resíduos de Trp, principalmente quando expostos ao ambiente polar, como solução aquosa (FIG. 26) (Aoki e Epan, 2012).

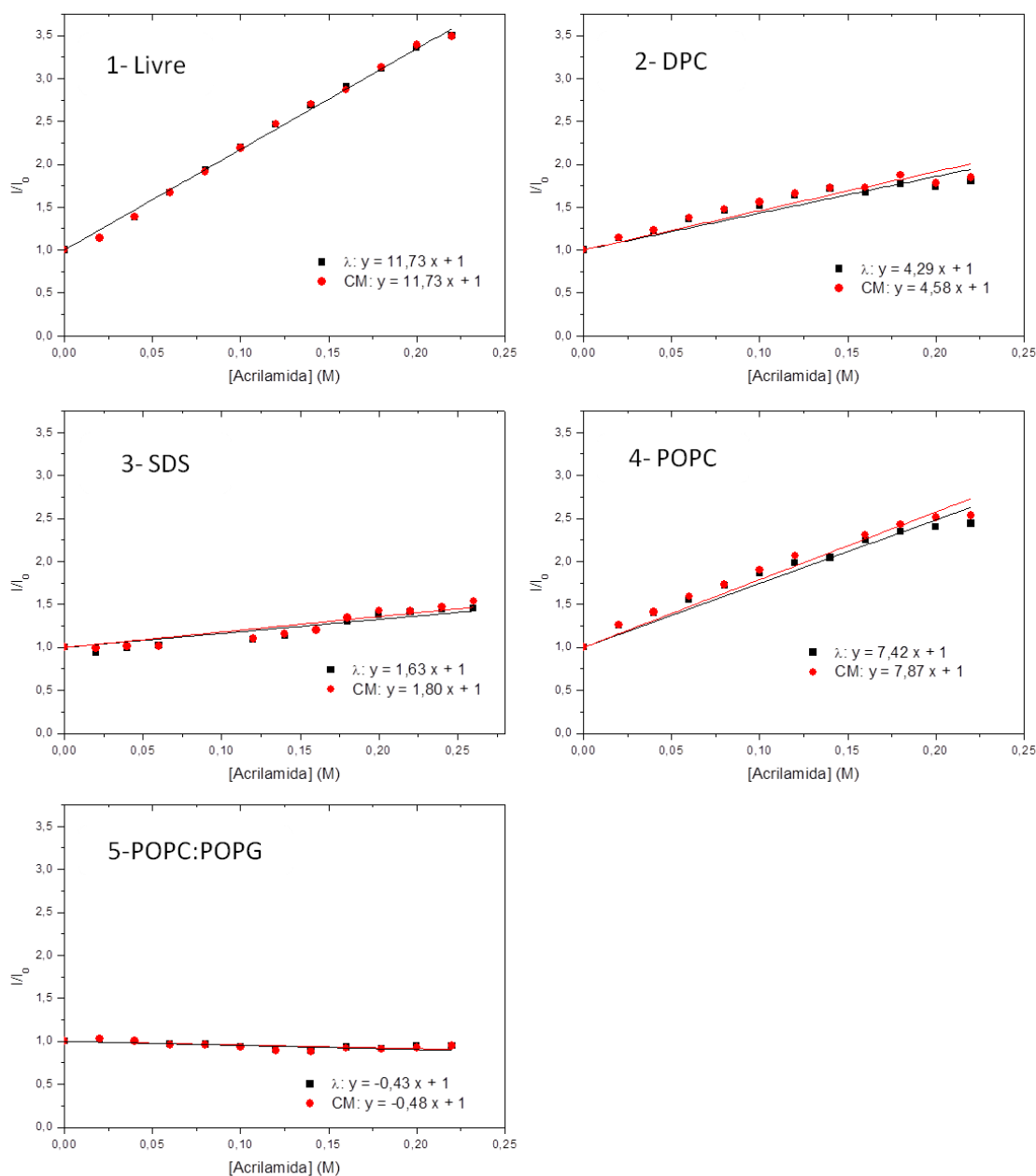
**Figura 26:** Estrutura química representativa da acrilamida.



Existe uma correlação linear entre a concentração de acrilamida e a intensidade de fluorescência de triptofano, descrita pela equação 4 (p. 32), que possibilita determinar valores da constante de Stern-Volmer ( $k_{SV}$ ) (Lakowicz, 2006). A partir dos dados de titulação, foram plotadas regressões lineares (FIG. 27, p. 53) de concentração de acrilamida em função da razão de intensidade de fluorescência ( $I/I_0$ ) – onde  $I$  corresponde à intensidade de fluorescência em um ponto qualquer e  $I_0$  é a intensidade de fluorescência na ausência de acrilamida. As inclinações das retas obtidas a partir de regressões lineares correspondem aos valores de  $k_{SV}$  determinados para cada sistema. Foram plotadas duas regressões lineares, uma a partir dos dados obtidos para variação do  $\lambda_{m\acute{a}x}$  (preto) e outra a partir dos dados de variação

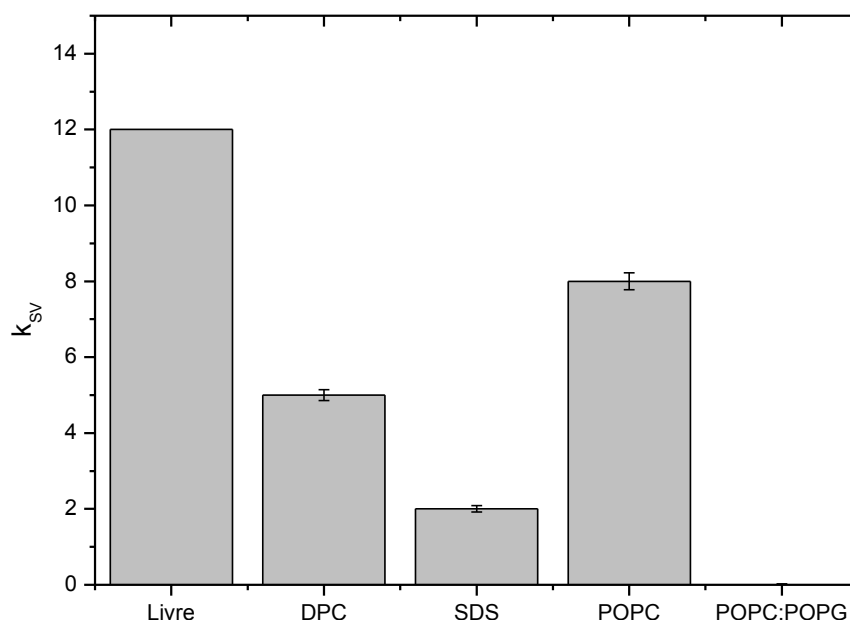
do CM (vermelho).

**Figura 27:** Gráficos da razão de intensidade de fluorescência ( $I/I_0$ ) do LyeTx-I (10  $\mu$ M) em função da concentração de acrilamida. Cada regressão linear representa a supressão de fluorescência causada pela titulação com acrilamida (4 mM) em peptídeo livre (1), peptídeo em presença de meios micelares (200 mM) de DPC (2) e de SDS (3), e em presença de meios vesiculares (500  $\mu$ M) de POPC (4) e de POPC:POPG (5). As retas construídas a partir dos dados obtidos de  $\lambda_{m\acute{a}x}$  estão representadas em preto, e as construídas com os dados de CM, estão representadas em vermelho.



As regressões lineares obtidas, tanto a partir do  $\lambda_{\text{máx}}$  quanto pelo CM, foram muito próximas na mesma condição experimental. Dessa forma, as constantes de *Stern-Volmer* calculadas não divergiram muito nessas duas análises de variação de intensidade de fluorescência. Para comparar os resultados obtidos em cada condição experimental, os valores de  $k_{SV}$  calculados foram expostos em um gráfico de barras (FIG. 28).

**Figura 28:** Constantes de *Stern-Volmer* ( $k_{SV}$ ) para o LyeTx-I em diferentes meios biomiméticos.



As constantes obtidas refletem o acesso da acrilamida ao resíduo Trp-2 do LyeTx-I, portanto permitem avaliar qualitativamente a exposição deste resíduo ao solvente polar. Na ausência de meios biomiméticos, o LyeTx-I apresenta um valor elevado de  $k_{SV} = 12$ , o que representa a supressão máxima da fluorescência por parte da acrilamida. A variação de ambiente químico experimentada por Trp-2, é mais nítida em meios micelares de DPC ( $k_{SV} = 4,5$ ) e SDS ( $k_{SV} = 1,8$ ) quando comparada ao peptídeo em solução. Ao avaliar os valores de  $k_{SV}$  obtidos para cada sistema, observa-se pouca exposição do Trp-2 à acrilamida e ao solvente polar, portanto, maior inserção em um ambiente apolar das micelas. Esse resultado confirma os dados obtidos a partir do experimento de fluorescência intrínseca, no qual observou-se uma variação significativa de CM (14 e 15 nm, respectivamente). Vale ressaltar que, apesar de as



variações do CM nos dois sistemas micelares terem sido próximas, o acesso da acrilamida ao Trp-2 do LyeTx-I é ainda menor em micelas negativas de SDS do que em micelas zwitteriônicas de DPC.

Esse comportamento é ainda mais proeminente comparando-se os meios vesiculares de POPC e POPC:POPG. Nota-se pouca variação do  $k_{SV}$  para o sistema LyeTx-I/LUVs-POPC em relação ao peptídeo livre, confirmando que há pequena inserção do resíduo de Trp-2 na bicamada fosfolipídica zwitteriônica, em acordo com o previsto pela pequena variação do CM (3 nm) neste meio. Em contrapartida, o efeito da acrilamida na fluorescência do peptídeo em presença de LUVs POPC:POPG é praticamente nulo, indicando que, nesse meio, o resíduo de Trp-2 experimenta um ambiente muito apolar. Essa informação é coerente com a elevada variação de CM (18 nm) observada e revela maior capacidade de inserção do resíduo de Trp-2 em vesículas aniônicas.

A fim de compreender melhor o modo de interação desse peptídeo, foi realizado o estudo termodinâmico da interação de LyeTx-I com as LUVs POPC e POPC:POPG empregando-se a calorimetria de titulação isotérmica.

#### 5.2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica ITC foi empregada neste trabalho para obtenção dos parâmetros termodinâmicos da interação do peptídeo LyeTx-I com vesículas de POPC e POPC:POPG. Essa técnica permite a medida direta do fluxo de calor envolvido na interação de dois sistemas, sendo uma poderosa ferramenta usada no estudo de interações intermoleculares. Considerando que a associação de peptídeos a bicamadas fosfolipídicas de membranas envolve a quebra e formação de interações intermoleculares, e que, associada a esses fenômenos existe uma variação de calor, a calorimetria torna-se uma ferramenta apropriada para avaliação da termodinâmica das interações peptídeo-membrana (Verly, 2010).

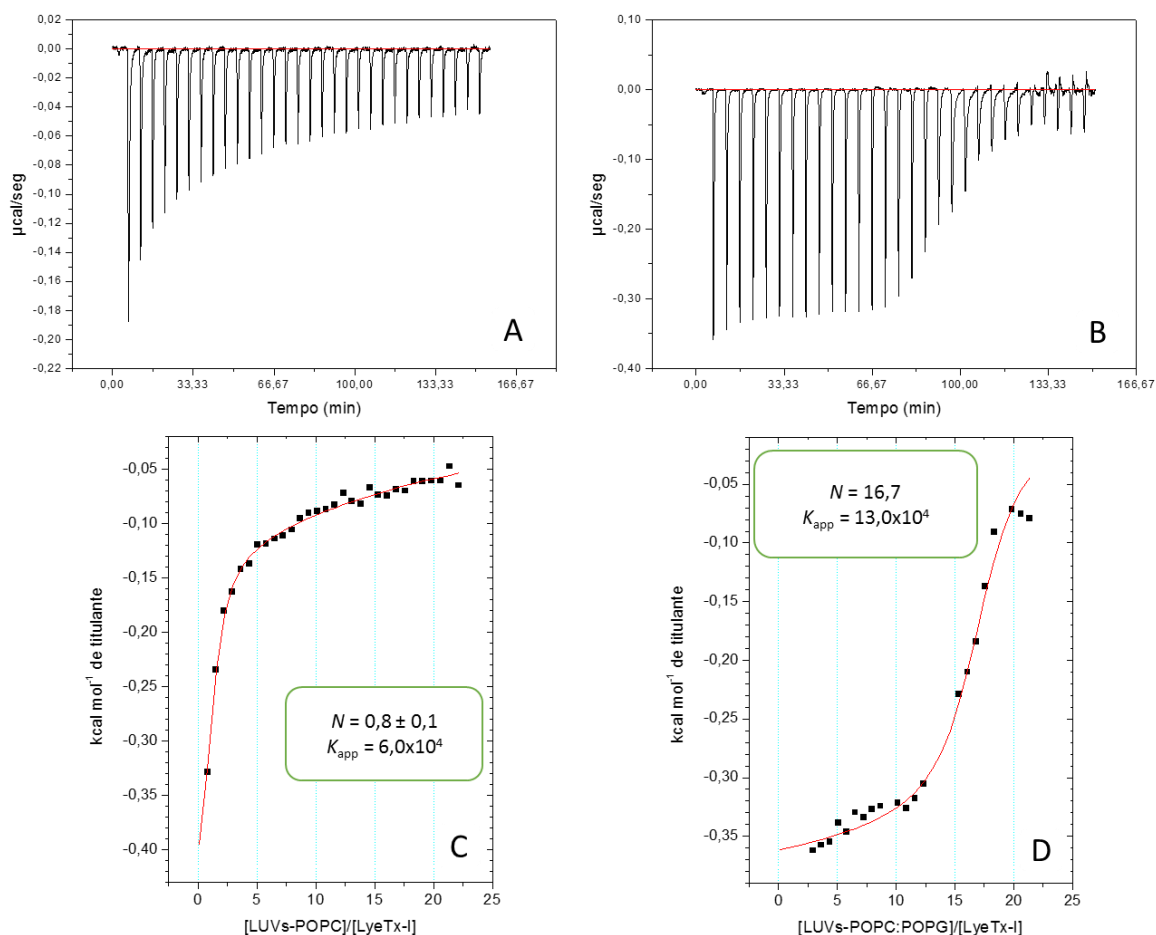
Neste trabalho, os experimentos de ITC foram realizados titulando-se soluções de LUVs de POPC (5 mM) e POPC:POPG (5 mM) em soluções de LyeTx-I (25  $\mu$ M). Optou-se pela titulação das soluções de LUVs em solução de peptídeo, a fim de evitar fenômenos de agregação de peptídeo pelo emprego de elevadas concentrações do mesmo na seringa de titulação (Seelig, 1997; Al-Kaddah *et al.*, 2010).

A Figura 29 (p. 57) apresenta os dados obtidos para cada uma das titulações calorimétricas. Cada sinal da curva calorimétrica corresponde à alteração no fluxo de calor a partir da injeção de 5  $\mu$ L de vesícula à célula de reação contendo peptídeo. O fluxo de calor

negativo observado após cada injeção de LUVs em solução de peptídeo indica predominância de interações exotérmicas. Na Figura 29A e B (p. 57) verifica-se também que o aumento da razão molar LUVs/peptídeo resulta na diminuição do fluxo de calor, até que os valores se tornem próximos ao calor de diluição das vesículas. A partir da integral da variação de calor envolvido em cada injeção e da razão molar fosfolipídio/peptídeo, foram construídas as isotermas de calor apresentadas nas Figura 29C e D (p. 57) para cada sistema. Nessas isotermas, o ponto de inflexão das curvas corresponde à razão molar estequiométrica do sistema em análise. Ao avaliar a estequiometria da interação observa-se que em meio zwitteriônico, cada molécula de peptídeo interage com apenas uma molécula de fosfolipídeo ( $n = 0,8$ ). Em contrapartida, em meio predominantemente aniônico, cada cadeia peptídica interage em média com 17 moléculas fosfolipídicas ( $n = 16,7$ ). Isso indica uma interação maior com vesículas de POPC:POPG, quando comparada às vesículas de POPC (Wieprecht *et al.*, 2000).

Para cada isoterma, foram realizados ajustes não lineares de apenas um sítio de interação e, com isso, foram obtidos os parâmetros termodinâmicos da interação peptídeo-LUVs. A Tabela 4 (p. 57) apresenta os parâmetros termodinâmicos calculados para cada curva calorimétrica.

**Figura 29:** Isotermas de titulação calorimétrica obtidas a partir da titulação de LUVs de POPC (5 mM) e POPC:POPG (3:1) (5 mM) em solução de LyeTx-I (25  $\mu$ M). Gráfico de fluxo de calor para cada injeção de LUVs-POPC (A) e LUVs-POPC:POPG (B) em função do tempo. Ajuste não linear de entalpia por razão molar de POPC/LyeTx-I (C) POPC:POPG/LyeTx-I (D) com subtração dos respectivos calores de diluição.



**Tabela 4:** Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir da titulação de LUVs de POPC (5 mM) e LUVs de POPC:POPG (5 mM) em LyeTx-I (25  $\mu$ M) a 25  $^{\circ}$ C

Parâmetros Termodinâmicos	LUVs POPC (5 mM)	LUVs POPC:POPG (5 mM)
$N$	$0,8 \pm 0,1$	$16,7 \pm 0,2$
$K_{app}$ (L.mol $^{-1}$ )	$6,0 \times 10^4 \pm 6,2 \times 10^3$	$13,0 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$
$\Delta G^{\circ}$ (cal.mol $^{-1}$ )	-6815,9	-6974,9
$\Delta H^{\circ}$ (cal.mol $^{-1}$ )	$-620,4 \pm 77,4$	$-359,0 \pm 5,6$
$-T\Delta S^{\circ}$ (cal.mol $^{-1}$ )	6195,5	6615,9

Em ambos os sistemas, verificou-se que a variação negativa da energia livre de Gibbs é acompanhada de um aumento na entropia do sistema. Isso comprova que a interação peptídeo-membrana ocorre em processo espontâneo e resulta na perturbação do sistema (Seelig, J., 2004; Veiga *et al.*, 2004).

O processo de interação peptídeo-membrana resulta na dessolvatação, tanto da superfície externa das LUVs quanto da porção hidrofílica da cadeia peptídica. Como resultado, um maior número de moléculas de água estará livre no sistema, elevando, assim, as componentes entrópicas associadas à rotação e translação das moléculas de água. Finalmente, essa desorganização contribui para o aumento da entropia do sistema como um todo (Wieprecht *et al.*, 2000). Comparativamente, observam-se maiores contribuições entrópicas da interação do peptídeo com LUVs de POPC:POPG (6615,9 cal.mol<sup>-1</sup>) do que com LUVs de POPC (6195,5 cal.mol<sup>-1</sup>), o que sugere maior dessolvatação, tanto do peptídeo quanto das vesículas, em meio predominantemente aniônico. Este resultado corrobora os dados de fluorescência, que indicaram maior mudança do ambiente químico do resíduo de Trp-2, para apolar, quando o peptídeo interage com LUVs de POPC:POPG. Neste sentido, a região N-terminal de LyeTx-I estaria mais inserida nessas vesículas, resultando também em uma maior constante de interação (13,0×10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>), enquanto que, em vesículas de POPC, este valor é aproximadamente a metade (6,0×10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>).

Apesar de o peptídeo apresentar caráter catiônico, as contribuições entálpicas para a interação de LyeTx-I, tanto com vesículas aniônicas de POPC:POPG (-359,0 cal.mol<sup>-1</sup>) quanto em vesículas de POPC (-620,4 cal.mol<sup>-1</sup>), foram relativamente pequenas. Peptídeos catiônicos como Nisina Z (Seelig, J., 2004) e Cinaminina (Seelig, J., 2004) apresentam entalpia de interação cerca de dez vezes maior em vesículas aniônicas de POPC:POPG ( $\Delta H^0 = -9100$  cal.mol<sup>-1</sup>) e POPC:POPE ( $\Delta H^0 = -8500$  cal.mol<sup>-1</sup>), respectivamente. Peptídeos catiônico contendo triptofano, como a tritripticina e análogos do mesmo apresentaram contribuições entálpicas superiores a 3000 cal.mol<sup>-1</sup> em presença de POPE:POPG (7:3).

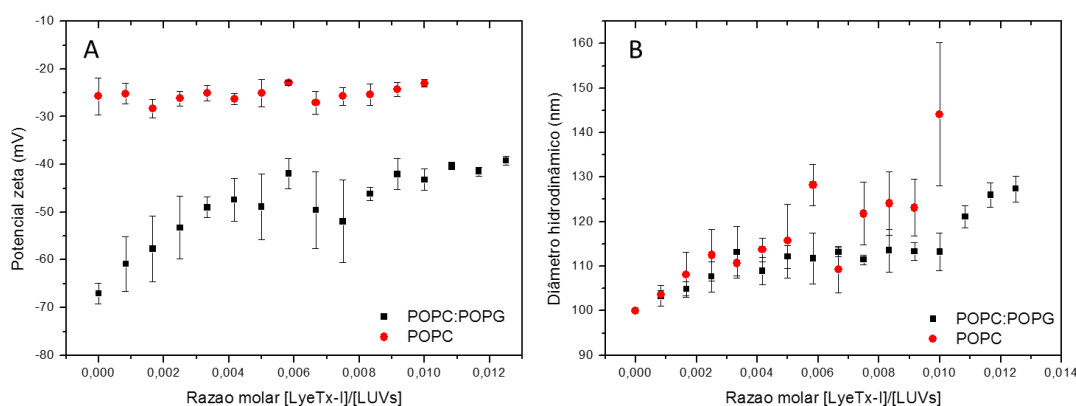
Surpreendentemente, a entalpia da interação de LyeTx-I-POPC:POPG foi menor do que LyeTx-I-POPC. Esse resultado demonstra que a interação do LyeTx-I com vesículas de POPC:POPG não é estritamente eletrostática, e que a inserção do mesmo na interface da membrana fosfolipídica de POPC:POPG ocorre de forma mais efetiva do que em membranas de POPC. Dessa forma, em presença de LUVs de POPC, o peptídeo restringe-se a uma interação superficial e eletrostática, elevando a componente entálpica (-620,4 cal.mol<sup>-1</sup>), porém com uma interação mais fraca (6,0×10<sup>4</sup> L.mol<sup>-1</sup>).

### 5.2.6 Espalhamento de Luz Dinâmico e potencial de superfície

Partindo-se do princípio que a interação do peptídeo-membrana perturba a organização da bicamada fosfolipídica e, conseqüentemente, pode alterar toda a estrutura da membrana celular (Nguyen *et al.*, 2011), foram realizados também estudos da variação da estabilidade de LUVs de POPC e POPC:POPG com a adição de LyeTx-I. Muitos estudos com peptídeos antimicrobianos têm revelado a formação de agregados supramoleculares durante o processo de interação com vesículas fosfolipídicas, resultando na variação do volume e das cargas superficiais das vesículas (Abrunhosa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). Neste sentido, com o objetivo de avaliar o efeito da interação peptídeo-membrana na carga superficial e no tamanho de LUVs de POPC e POPC:POPG (3:1), foram realizadas medidas de potencial zeta ( $\zeta$ ) e de diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) das LUVs de tamanhos definidos (100 nm) com a adição de LyeTx-I. Foram considerados válidos apenas os valores obtidos para índice de polidispersividade (PDI, do inglês *polydispersity index*) menor que 0,3 (Zetasizer, 2003).

A Figura 30 mostra a variação do potencial zeta e do  $D_h$  obtidas para cada vesícula em função da razão molar de peptídeo/fosfolípido. A titulação foi realizada com adições sucessivas de 5  $\mu$ L de LyeTx-I (50  $\mu$ M), em dispersão de vesículas de POPC (500  $\mu$ M) e POPC:POPG de mesma concentração.

**Figura 30:** Gráfico da variação do potencial zeta (A) e do diâmetro hidrodinâmico (B) de LUVs POPC (500  $\mu$ M) e POPC:POPG (500  $\mu$ M) para a titulação de 5  $\mu$ L de LyeTx-I (50  $\mu$ M).



Os valores iniciais do potencial zeta para as LUVs de POPC e POPC:POPG, na ausência de peptídeo, foram bastante distintos. As vesículas de POPC apresentaram um potencial próximo a -25 mV, enquanto que as LUVs de POPC:POPG valor próximo a -70

mV. Segundo (Lieberman *et al.*, 1998) sistemas analisados a partir do potencial zeta são considerados estáveis quando apresentam valores menores que -25 mV e maiores que 25 mV. Sendo considerados moderadamente estáveis sistemas com potenciais entre 25 e 60 mV, em módulo, e muito estáveis com potenciais entre 60 e 100, em módulo (Lieberman *et al.*, 1998). Nesses casos, as forças atrativas de London são menores que as forças repulsivas e, por isso, o sistema é considerado estável (Frange e Garcia, 2009), o que ocorre com as LUVs de POPC:POPG que apresentam carga negativa nas superfícies da bicamada fosfolipídica.

Os comportamentos das LUVs de POPC e POPC:POPG frente à adição de LyeTx-I foram consideravelmente diferentes. Com a adição de LyeTx-I, nota-se uma diminuição na carga superficial das vesículas de POPC:POPG ( $\Delta\zeta = 28$  mV), resultado da forte interação peptídeo-membrana ( $K_{app} = 13,0 \times 10^4$ ) para este sistema. Isso pode ser associado à presença de resíduos de Lys positivamente carregados na cadeia peptídica que diminuem o excesso de carga negativa dessas LUVs. Além disso, em presença de vesículas aniônicas, o LyeTx-I apresentou maior conteúdo helicoidal e maior capacidade lítica, dados que reforçam a proposta de uma interação mais efetiva do peptídeo na bicamada fosfolipídica de POPC:POPG. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas no potencial zeta das vesículas zwitteriônicas de POPC ( $\Delta\zeta = 3$  mV) devido à adição de LyeTx-I (Figura 30B). Este resultado, aliado aos dados obtidos a partir das análises de CD e extravasamento de CF (que demonstraram que o LyeTx-I estrutura menos em presença de vesículas zwitteriônicas e apresenta menor capacidade de perturbação deste tipo de sistema biomimético) denotam uma interação peptídeo-vesícula menos efetiva nesse ambiente.

Simultaneamente aos experimentos de potencial zeta ( $\zeta$ ), avaliou-se também a variação do diâmetro hidrodinâmico  $D_h$  das vesículas fosfolipídicas. Em ambos os meios, verificou-se que a interação do peptídeo LyeTx-I promove o aumento no tamanho das vesículas fosfolipídicas.

Até a razão molar peptídeo/vesícula de 0,006, observam-se comportamentos semelhantes nos dois meios. Entretanto, em razões molares superiores, a variação de  $D_h$  torna-se mais acentuada nas vesículas zwitteriônicas ( $\Delta D_h = 44$  nm) quando comparada com às vesículas aniônicas (POPC:POPG) ( $\Delta D_h = 27$  nm). Além disso, há também um aumento no desvio entre as medidas realizadas na triplicata, explicitado pela barra de erros no gráfico. Considerando a menor interação do peptídeo com as vesículas zwitteriônicas, conforme evidenciado pelo menor valor de  $K_{app}$  ( $6,0 \times 10^4$  – Tabela 4, p. 57), grau de estruturação (FIG. 20, p. 47) e menor grau de inserção de LyeTx-I nesse ambiente (Tabela 3, p. 51), as oscilações observadas para o valor de diâmetro hidrodinâmico podem ser resultados na

formação de uma estrutura semelhante às modificações de lipossomas com PEG, ocasionando assim maior espalhamento da luz (Palchetti *et al.*, 2016). Já para as vesículas aniônicas, o comportamento do diâmetro hidrodinâmico durante todo o experimento apresentou-se mais homogêneo, possivelmente devido a uma interação mais efetiva e homogênea do LyeTx-I com vesículas aniônicas. Contudo, para avaliar o modo de interação do peptídeo LyeTx-I, foram ainda realizados estudos por Ressonância Magnética Nuclear, em solução e em fase sólida, para determinação da estrutura tridimensional de LyeTx-I e sua orientação em relação à bicamada fosfolipídica.

### 5.3.7 Ressonância Magnética Nuclear em solução

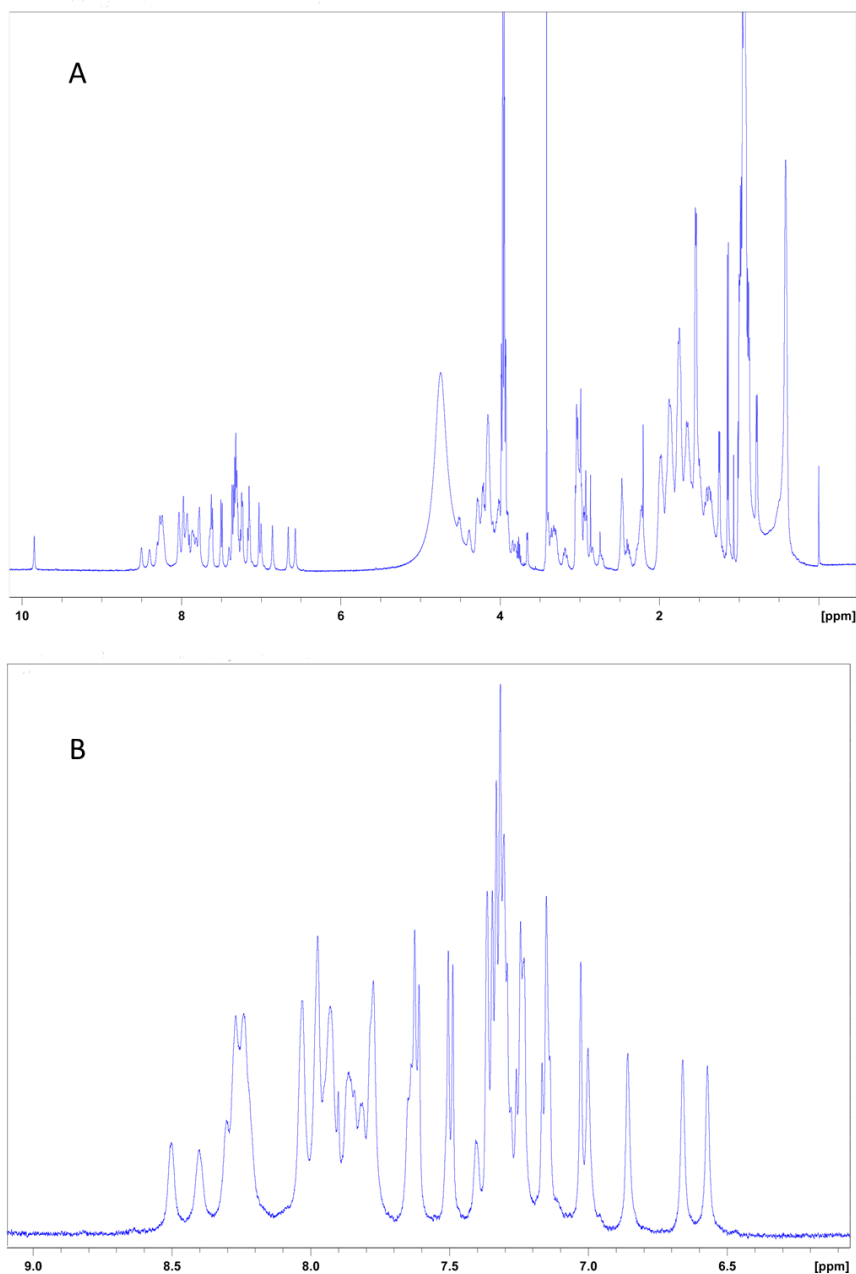
A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica comumente utilizada para análises estruturais, conformacionais e de dinâmica molecular, sendo amplamente empregada para estudos de peptídeos e proteínas biologicamente ativos. Essa técnica pode ser utilizada tanto em solução como em fase sólida, a fim de estudar conformação, orientação e topologia do peptídeo ao interagir com membranas biomiméticas (Bechinger, 1999; Berger *et al.*, 2016; Falcigno *et al.*, 2016). Nesse sentido, neste trabalho foi avaliada também a estrutura tridimensional do peptídeo LyeTx-I na presença de micelas de SDS-*d*<sub>25</sub>, empregando-se a RMN em solução, e a determinação da orientação do peptídeo em bicamada fosfolipídica de POPC, via estudos por RMN em fase sólida.

#### **RMN em solução**

A escolha do meio micelar de SDS foi baseada nos resultados obtidos por CD para o LyeTx-I (FIG. 20, p. 47), os quais mostram que nesse meio micelar o peptídeo apresentou o maior conteúdo de hélice em concentrações superiores a 100 mM. Além disso, propôs-se também um estudo comparativo com a estrutura já publicada de LyeTx-I em micelas de DPC-*d*<sub>38</sub> (Santos, 2010). Assim sendo, foi preparada uma solução 2 mM de LyeTx-I em presença de 200 mM de micelas de SDS-*d*<sub>25</sub> para realização de estudos estruturais e conformacionais por RMN em solução.

A Figura 31 (p. 62) apresenta o espectro unidimensional (1D) obtido para o peptídeo em meio micelar aniônico a 25 °C. A ampliação da região de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios amídicos ( $H_N$ ) (FIG. 31B) mostra uma boa dispersão dos sinais, o que indica uma conformação relativamente definida (Tinoco *et al.*, 2002).

**Figura 31:** Espectro de RMN unidimensional (1D) obtido para o peptídeo LyeTx-I (2 mM) em presença de SDS-d<sub>25</sub> (200 mM) (A). Ampliação da região característica de deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H<sub>N</sub> do espectro 1D (B). Experimento realizado em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE III 500, operando a 500,13 MHz para núcleos de <sup>1</sup>H.

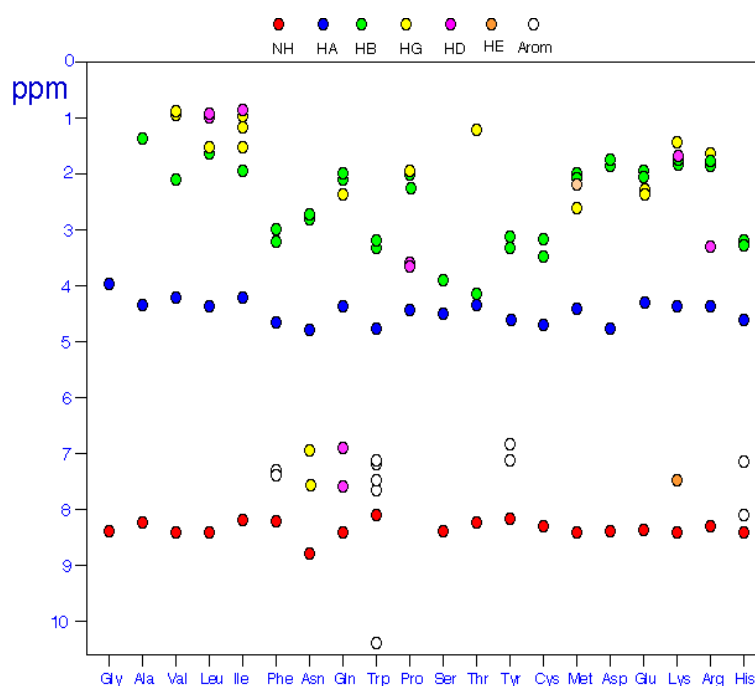


A identificação dos sistemas de *spin* dos aminoácidos que compõe a sequência primária do LyeTx-I foi realizada empregando-se técnicas bidimensionais (2D) homonucleares (TOCSY e NOESY) e heteronucleares (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC e <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-HSQC) de RMN.



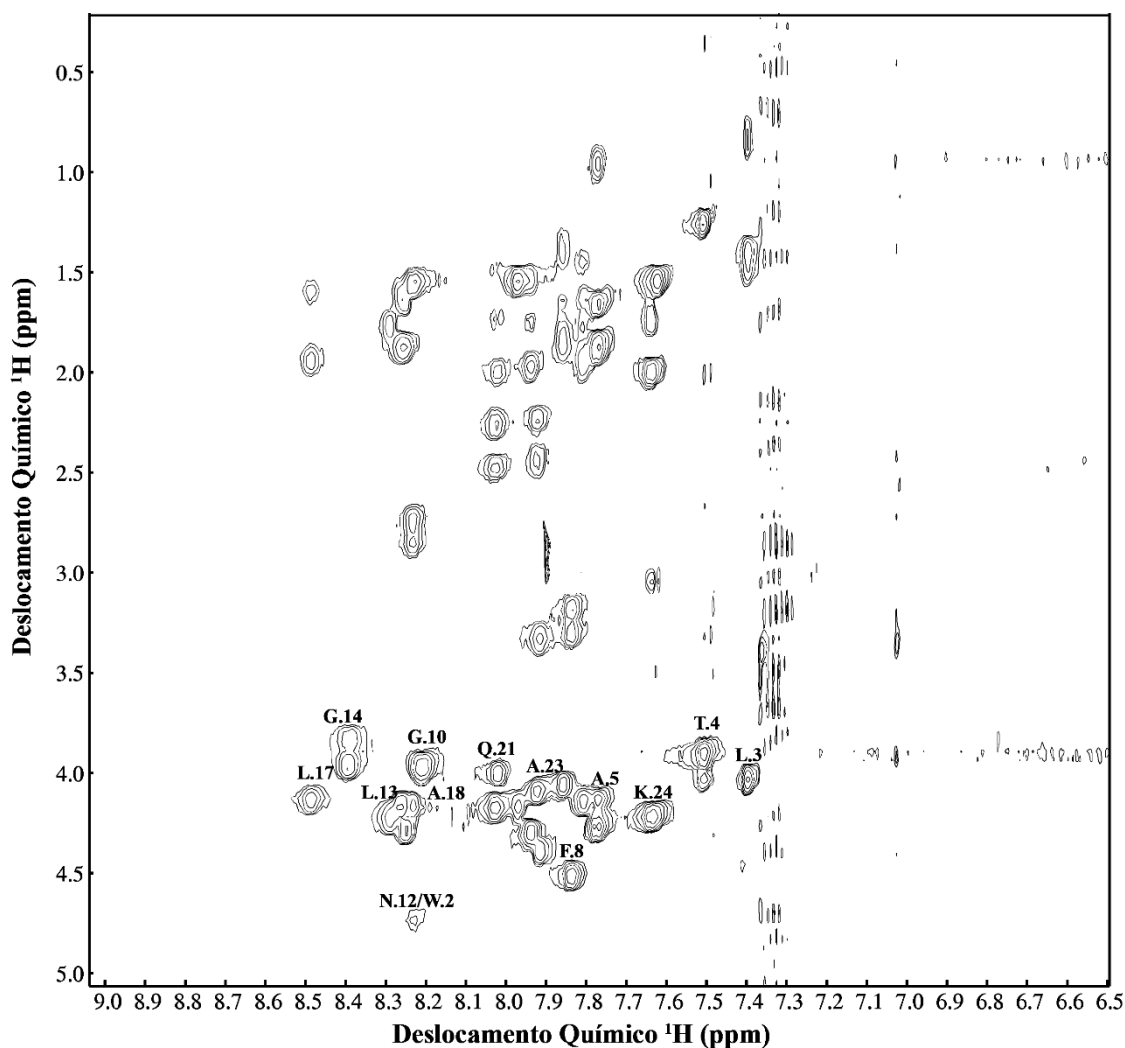
Inicialmente, a análise do mapa de contornos homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY, no qual são observadas apenas as correlações intrarresiduais, possibilitou identificar os diferentes sistemas de *spin* característicos de cada tipo de resíduo de aminoácido (Wüthrich, 1986). A Figura 32 apresenta um esquema representativo do padrão dos sistemas de *spin*, com os deslocamentos químicos médios de cada hidrogênio dos diferentes tipos de resíduos de aminoácidos. Resíduos de alanina (Ala) e glicina (Gly), por exemplo, apresentam sistemas de *spin* bastante simples, devido a suas cadeias laterais pequenas. O sistema de *spin* do resíduo de glicina apresenta apenas uma única correlação devido ao acoplamento escalar entre hidrogênio amídico ( $\text{H}_\text{N}$ ) e o hidrogênio  $\alpha$  ( $\text{H}_\alpha$ ). A alanina, por sua vez, apresenta três possíveis correlações devido aos acoplamentos escalares entre os resíduos de  $\text{H}_\text{N}$ ,  $\text{H}_\alpha$  e hidrogênios  $\beta$  ( $\text{H}_\beta$ ). Entretanto, o deslocamento químico médio do  $\text{H}_\beta$  da alanina ( $\delta_{\text{médio}} = 1,35$ ) é muito inferior ao deslocamento químico médio de  $\text{H}_\alpha$  da glicina ( $\delta_{\text{médio}} = 3,96 - 3,89$ ), proporcionando a distinção inequívoca entre os mesmos. A tabela de deslocamentos químicos do *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (disponível em: [http://www.bmrb.wisc.edu/ref\\_info/statsel.htm](http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm). Acesso em abril de 2016) foi utilizada como referência para identificação dos sistemas de *spin* da sequência primária de LyeTx-I.

**Figura 32:** Esquema representativo dos sistemas de *spin* com os respectivos deslocamentos químicos característicos para os diferentes resíduos de aminoácido. Disponível em: <http://triton.iqfr.csic.es/guide/eNMR/proteins/chempro5.html>. Acesso em abril 2016.



Dessa forma, a análise do peptídeo LyeTx-I foi iniciada pela identificação, no mapa de contornos  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY, dos sistemas de *spin* dos dois resíduos de glicina (Gly-10 e Gly-14) e dos três resíduos de alanina (Ala-5, Ala-18 e Ala-23) presentes na sua sequência primária. Além desses resíduos, foi possível identificar também quase todos os demais sistemas de *spin*, exceto os dos aminoácidos da extremidade *N*-terminal, Ile-1 e Trp-2. A Figura 33 apresenta uma ampliação da região do mapa de contornos  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY, em que se encontram sinais característicos de correlações entre  $\text{H}_\text{N}$ ,  $\text{H}_\alpha$  e hidrogênios de cadeias laterais.

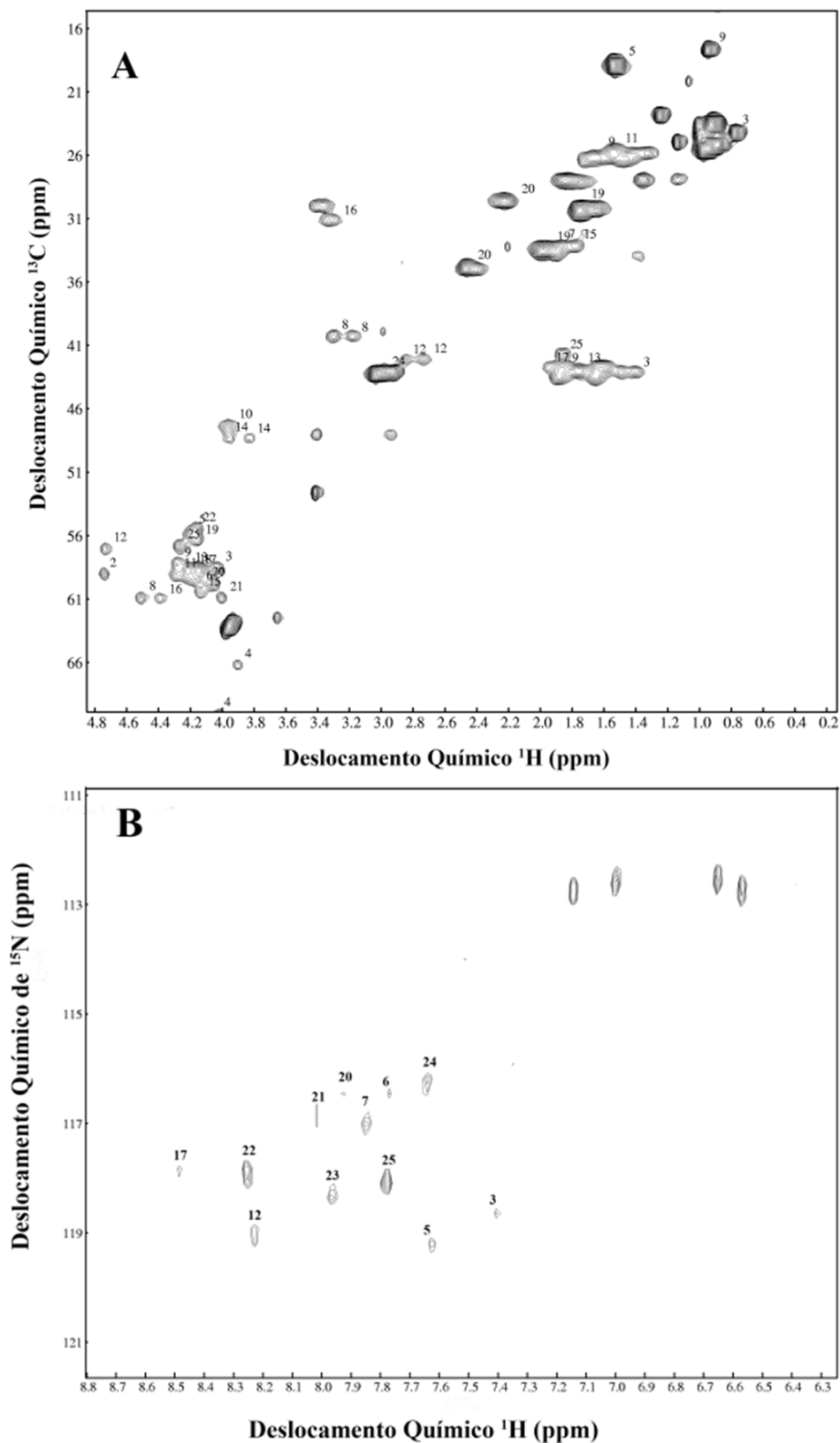
**Figura 33:** Mapa de contornos  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -TOCSY, obtido em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE III 500, operando a 500,13 MHz para núcleos de  $^1\text{H}$ , com 2 mM de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS-*d*<sub>25</sub>. Região características de correlações entre  $\text{H}_\text{N}$  com  $\text{H}_\alpha$  e  $^1\text{H}$  de cadeias laterais.



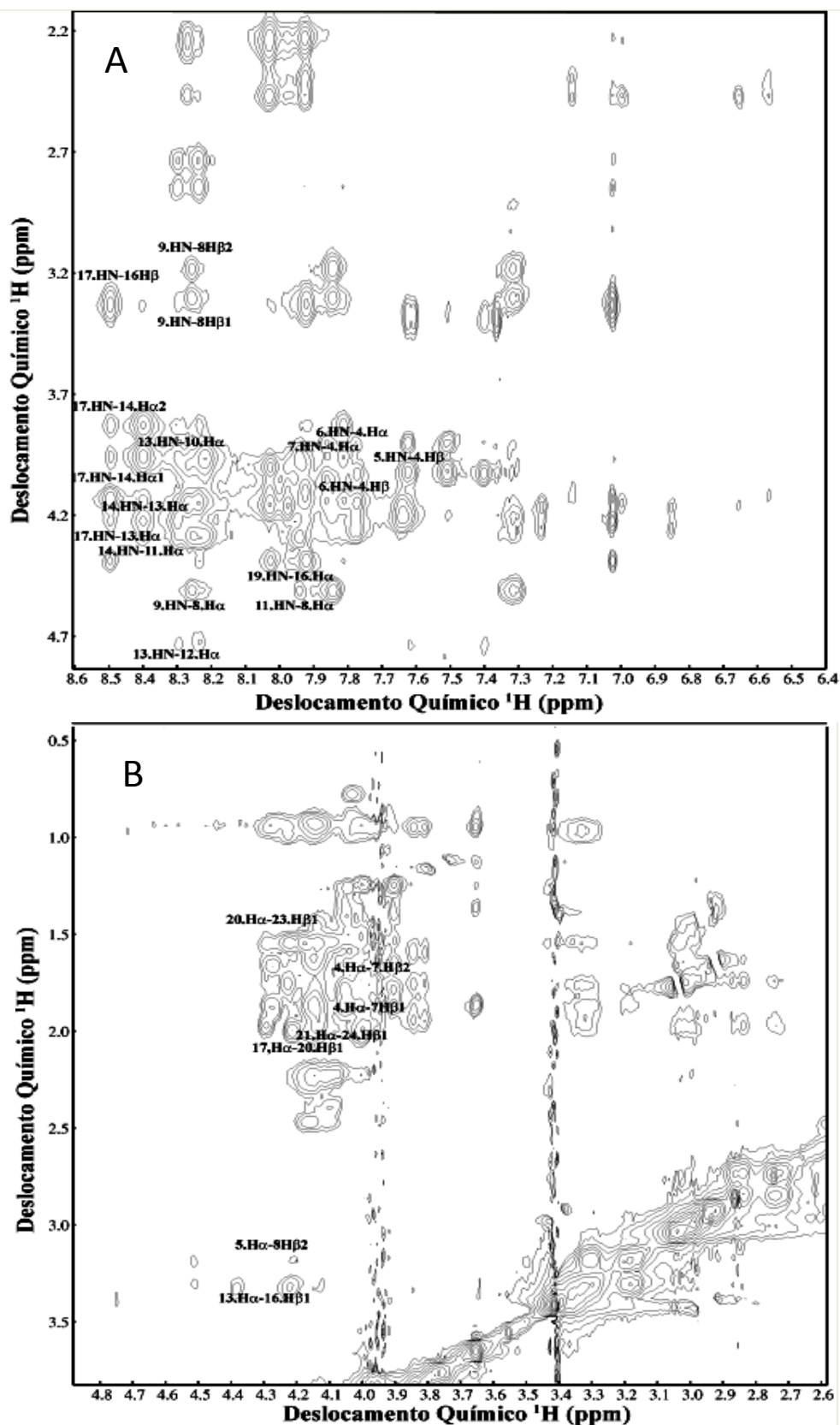
Os espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC (FIG. 34, p. 66) foram utilizados para resolver atribuições de sinais sobrepostos, através da análise de correlações  $^1J$  de ligações C-H e  $^1J$  de ligações N-H. Foram observadas sobreposições dos sinais relativos a  $\text{H}_\alpha$  dos resíduos Trp-2 e Asp-12 conforme evidenciado na Figura 34 (p. 66). Os resíduos de Gly-10 e Gly-14 foram prontamente confirmados devido ao baixo deslocamento químico de  $\text{C}_\alpha$ , próximo a 49 ppm. O resíduo de treonina (Thr-4) também foi imediatamente identificado devido ao elevado deslocamento químico de  $\text{C}_\alpha$  e  $\text{C}_\beta$  próximos à 66 e 69 ppm respectivamente.

A distinção dos resíduos de aminoácidos recorrentes na sequência peptídica de LyeTx-I, foi alcançada com a análise conjunta dos mapas de contornos homonucleares  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY e  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY (Wüthrich, 1986). A partir da identificação de acoplamentos espaciais entre resíduos de aminoácidos (correlações interresiduais), que são observados apenas no mapa de contornos de NOESY, foi possível identificar as vizinhanças de cada resíduo e, conseqüentemente, as suas posições relativas na sequência peptídica de LyeTx-I (Wüthrich, 1986). Na Figura 35 (p. 67) estão apresentadas regiões do mapa de contorno  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -NOESY onde são possíveis observar correlações de média distância do tipo  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+n, n=2,3,4)$  (FIG. 35A) e  $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$  (FIG. 35B, p. 68), características de conformação  $\alpha$ -hélice. Foram encontradas diversas correlações interresiduais, a maioria devido a NOEs característicos de conformação  $\alpha$ -hélice:  $d_{\alpha\text{N}}(i, i+k; 1 \leq k \leq 4)$ ,  $d_{\text{NN}}(i, i+k; 1 \leq k \leq 2)$ ,  $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ . Essas correlações estão resumidamente apresentadas no diagrama de conectividades de NOEs (FIG. 36, p. 68).

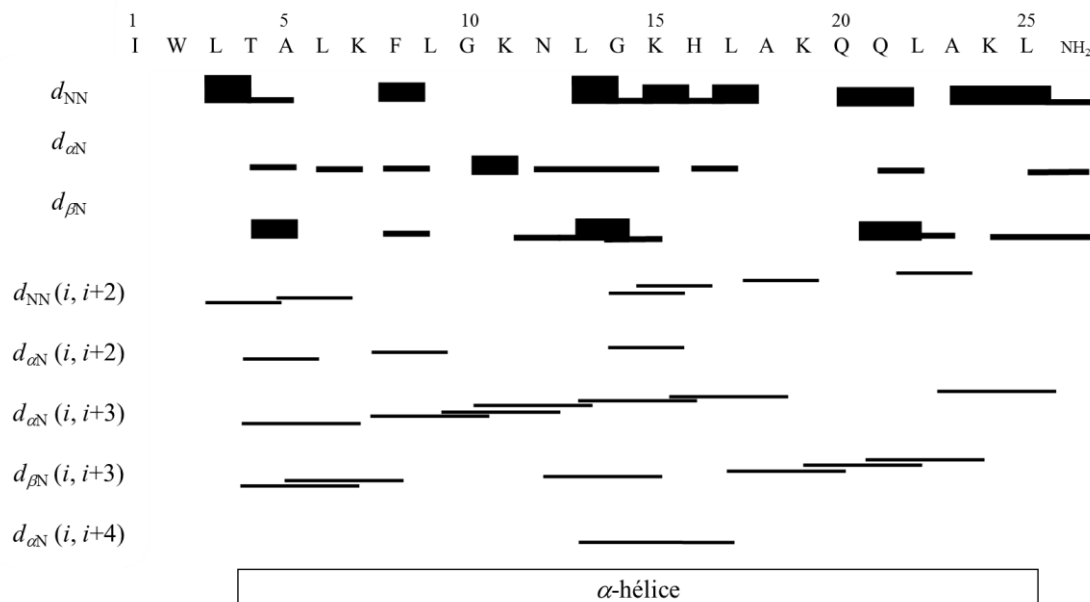
**Figura 34:** Mapas de contornos  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC obtidos em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE III 500, operando a 500,13 MHz para núcleos de  $^1\text{H}$ , 125,03 MHz para núcleos de  $^{13}\text{C}$  e 50,70 MHz para núcleos de  $^{15}\text{N}$ , para 2 mM de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS- $d_{25}$  (A) e 1 mM de LyeTx-I e 200 mM de SDS- $d_{25}$  (B).



**Figura 35:** Ampliação das regiões características de correlações  $d_{\alpha N}(i, i+n)$  (A) e  $d_{\alpha\beta}(i, i+n)$  (B) do NOESY, obtido em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE III 500, operando a 500,13 MHz para núcleos de  $^1\text{H}$  para 2 mM de LyeTx-I em solução micelar de 200 mM de SDS- $d_{25}$ .



**Figura 36:** Diagrama de conectividade de NOEs: sequenciais  $\text{NH}_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ ,  $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ ,  $\text{H}\beta_{(i)}\text{-NH}_{(i+1)}$ , e de média distância  $\text{NH}_{(i)}\text{-NH}_{(i+2)}$ ,  $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+2)}$ ,  $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+3)}$ ,  $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-H}\beta_{(i+3)}$ ,  $\text{H}\alpha_{(i)}\text{-NH}_{(i+4)}$ .

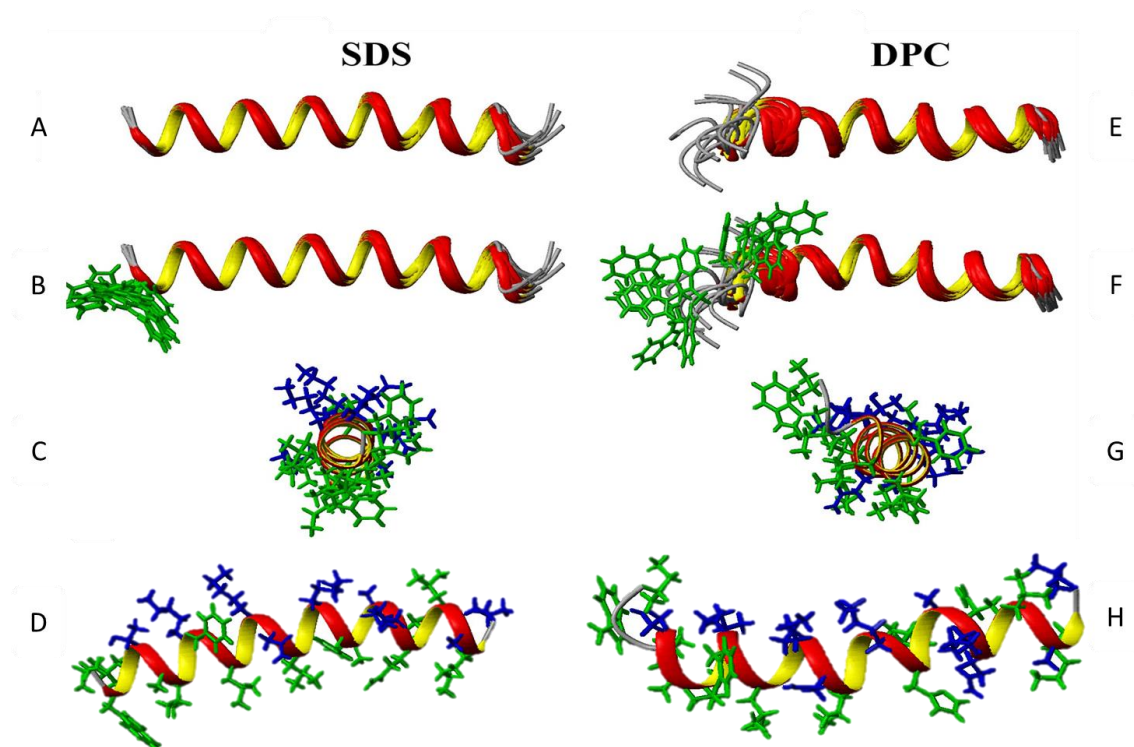


A análise da Figura 36 revela a presença de muitos NOEs referentes a correlações tipo  $d_{\alpha N}(i, i+3)$  e  $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$  envolvendo resíduos de praticamente toda extensão da cadeia peptídica. Essas correlações espaciais são características de conformação  $\alpha$ -hélice, sugerindo um elevado teor de helicidade para o peptídeo, em acordo com os dados obtidos nos experimentos de CD em meio micelar de SDS. Foi observado também um maior número de correlações interresiduais na região *C*-terminal amidada do que na região *N*-terminal, o que evidencia uma maior estabilização da hélice proporcionada pela presença do grupo amida (Verly, 2010). Outros peptídeos antimicrobianos, como a dermadistinctina k (DD *k*) (Verly *et al.*, 2009), a homotarsinina (HTM) (Verly *et al.*, 2017) e o próprio LyeTx-I em meio de DPC (Santos *et al.*, 2009), também apresentaram maior conteúdo helicoidal na região *C*-terminal, provavelmente resultante da estabilização do dipolo da hélice com a presença do grupo amida nessa região. Alguns estudos apontam para uma relação entre a maior estabilidade conformacional e o potencial bioativo desses peptídeos, uma vez que foi observada maior atividade em peptídeos amidados quando comparados aos seus análogos não amidados (Ali *et al.*, 2001; Katayama *et al.*, 2002).

Após a atribuição completa dos sinais de RMN, os valores de intensidade de todos os NOEs (intrarresiduais e interresiduais), identificadas no mapa de contornos NOESY, foram convertidos em restrições de distância de acordo com as intensidades dos sinais observados,

conforme descrito na página 34. Foram também determinadas restrições de ângulos diedros, estas obtidas a partir dos deslocamentos químicos de  $C_{\alpha}$ ,  $C_{\beta}$ ,  $H_{\alpha}$ ,  $H_{\beta}$  e nitrogênios amídicos. A lista de restrições de distância e de ângulos diedros, apresentada em Anexo (Tabela 9, p. 98 e Tabela 10, p. 99) foi empregada para realização dos cálculos de dinâmica molecular e obtenção da estrutura tridimensional do LyeTx-I em meio de SDS- $d_{25}$ . As estruturas tridimensionais estão apresentadas na Figura 37, juntamente com as estruturas de LyeTx-I em micelas DPC- $d_{38}$ , obtidas por (Santos *et al.*, 2009) por motivos de comparação.

**Figura 37:** Comparação das estruturas obtidas por RMN para o LyeTx-I na presença de micelas de SDS- $d_{25}$  e DPC- $d_{38}$ . Inicialmente a sobreposição da cadeia principal das 10 estruturas de menor energia (A e E), seguida da sobreposição com destaque para o resíduo de Trp-2, na porção *N*-terminal (B e F). Visão frontal das duas estruturas e proposta de orientação da interação com bicamadas fosfolipídicas (C e G). Por fim a visão lateral das duas estruturas de menor energia, evidenciando todas as cadeias laterais dos derivados de amino ácidos presentes na sequência (D e H). Coloridos em verde, estão representados os resíduos apolares e em azul os resíduos polares.



A sobreposição das 10 estruturas de menor energia obtidas para LyeTx-I em presença de micelas de SDS- $d_{25}$  (FIG. 37A) mostrou uma conformação helicoidal em toda

extensão da cadeia peptídica. A boa sobreposição da cadeia principal é um indício de uma conformação bastante estável. Observou-se, nos modelos calculados melhor sobreposição das cadeias laterais dos resíduos de Trp-2 quando o peptídeo se encontra em presença de micelas aniônicas (FIG. 37B). Esse resultado confirma os dados obtidos por fluorescência intrínseca de Trp e supressão de fluorescência com acrilamida, que mostraram maior mudança de ambiente químico para o Trp-2 em presença de meios biomiméticos aniônicos e também menor acessibilidade à acrilamida, indícios de uma interação mais efetiva da cadeia lateral desse resíduo com a porção hidrofóbica do meio biomimético. Além disso, na visão frontal da estrutura obtida em presença de SDS- $d_{25}$  (FIG. 37C) nota-se um caráter parcialmente anfipático na distribuição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos hidrofílicos (azul) e hidrofóbicos (verde). Essa anfipaticidade é melhor observada na perspectiva lateral da estrutura (FIG. 37D), com a qual verifica-se boa separação dos entre resíduos Ile-1 e Leu-17, o que pode favorecer interações com as micelas aniônicas de SDS e a inserção parcial da face hidrofóbica na interface das micelas (Strömstedt *et al.*, 2010).

A Figura 37E (p. 69) apresenta a sobreposição das cadeias principais das 10 estruturas menos energéticas do LyeTx-I. Observa-se uma sobreposição menos efetiva da porção *N*-terminal dessas estruturas, em especial das cadeias laterais dos resíduos de Trp-2 (FIG. 37F). A ausência de uniformidade na orientação relativa dessa região sugere que, em meio de DPC, a cadeia lateral de Trp-2 não interage da mesma forma que com o meio micelar aniônico. A visão frontal da hélice (FIG. 37G) com a presença de todas as cadeias laterais dos derivados de aminoácidos mostra que, em meio micelar zwitteriônico, o peptídeo possui menor caráter anfipático, uma vez que os resíduos hidrofílicos (azul) não se encontram efetivamente distribuídos em faces opostas aos resíduos hidrofóbicos (verde) na hélice. A conformação de menor energia obtida para o LyeTx-I em presença de micelas de DPC (FIG. 37H) possui uma pequena região desenovelada na porção *N*-terminal (entre Ile-1 e Leu-6) seguida de uma  $\alpha$ -hélice do resíduo de Leu-7 a Leu-24, diferentemente do observado para as estruturas em SDS, nas quais a conformação helicoidal se estende do resíduo Leu-3 ao resíduo Leu-25.

Os dados de fluorescência mostraram que o resíduo Trp-2 encontra-se mais exposto ao solvente polar em meios zwitteriônicos quando comparados aos meios aniônicos. Dessa forma, a ausência de uma conformação definida na região *N*-terminal pode ser associada a uma interação menos efetiva do LyeTx-I com as micelas de DPC. Levando em consideração que peptídeos antimicrobianos tendem a se estruturar quando interagem com membranas biomiméticas e/ou bacterianas, podendo, assim, favorecer a interação peptídeo-



membrana, a estrutura obtida para o peptídeo em presença de DPC permite inferir que a não estruturação na porção *N*-terminal está diretamente relacionada a essa interação menos efetiva e a uma maior variabilidade conformacional do peptídeo (Nguyen *et al.*, 2011; Voievoda *et al.*, 2015; Kosikowska e Lesner, 2016). Além disso, comparando-se as visões frontais da  $\alpha$ -hélice de LyeTx-I em ambos os meios, nota-se ainda maior anfipaticidade do peptídeo em micelas aniônicas do que em zwitteriônicas. Assim sendo, a estrutura mais estendida de LyeTx-I e a maior anfipaticidade em SDS sugerem que o peptídeo estabelece uma orientação paralela com a superfície das micelas, interagindo a face hidrofílica da hélice, carregada positivamente devido à presença de resíduos de Lys, com os grupos sulfatos do detergente e, assim, proporcionando maior inserção da face hidrofóbica da hélice nas interfaces das micelas.

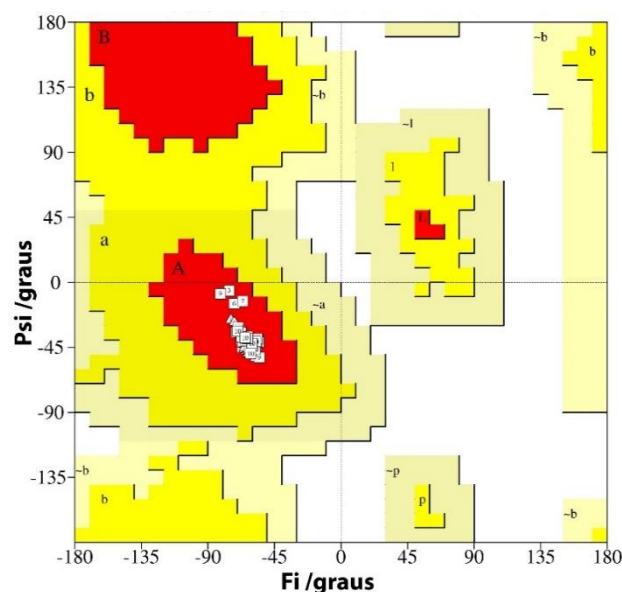
A qualidade das estruturas calculadas foi avaliada considerando 195 restrições intrarresiduais (IR), 52 restrições de média distância (MD) e 63 restrições sequenciais (SQ). Foi tomado como referência da qualidade da estrutura tridimensional o valor de RMSD e a distribuição dos ângulos diedros da cadeia principal de cada modelo no diagrama de Ramachandran (FIG. 38, p. 72). Após devidamente sobrepostas, calculou-se o RMSD das dez estruturas de menor energia obtidas para o LyeTx-I em micelas de SDS- $d_{25}$ , considerando-se todos os resíduos de aminoácidos. O valor obtido (1,17 Å) sugere certa flexibilidade conformacional da estrutura. Entretanto, quando considerado apenas o segmento helicoidal (Leu-3 a Leu-25), o RMSD diminui consideravelmente (0,65 Å). A Comparação da qualidade de estrutura obtida em SDS- $d_{25}$  e DPC- $d_{38}$  publicada por Santos e colaboradores em 2009, está apresentada na Tabela 5 (p. 72) (Santos *et al.*, 2009). Os valores de RMSD obtidos considerando todos os resíduos e somente o segmento helicoidal foram maiores para a estrutura obtida em presença de micelas de DPC. Esses resultados, portanto, sugerem maior flexibilidade conformacional para o peptídeo em presença de micelas zwitteriônicas. A análise do diagrama de Ramachandran mostraram que, para as 10 estruturas de menor energia obtidas para o LyeTx-I em presença de SDS- $d_{25}$ , foi alcançada uma boa qualidade estrutural, uma vez que 100 % dos resíduos de aminoácidos encontraram-se nas regiões favorecidas. Já para a estrutura obtida em presença de DPC- $d_{38}$ , 74,8 % dos resíduos encontram-se em região favorecida, mas foram encontrados também resíduos em regiões menos favorecidas.

**Tabela 5:** Dados de cálculos estruturais do LyeTx-I em presença de micelas de SDS- $d_{25}$ .

Meio		SDS	DPC <sup>c</sup>
<b>Restrições geométricas</b>	Totais	310	415
	Intra residuais (IR)	195	218
	Sequenciais (SQ)	63	91
	Média distância (MD)	52	76
	Ângulo diedro	25	30
<b>RMSD – Todos os resíduos<sup>a</sup></b>	Cadeia principal	1,17 Å	1,55
<b>RMSD – Seguimento helicoidal<sup>a, b</sup></b>	Cadeia principal	0,65 Å	0,69
<b>Análise gráfica por Ramachandran</b>	Resíduos em região favorecidas	100 %	74,8 %
	Resíduos em regiões permitidas	0 %	22,8 %
	Resíduos em regiões menos permitidas	0 %	2,4 %
	Resíduos em regiões não permitidas	0 %	0 %

a – Dados do programa MOLMOL; b – dados de L-3 até L-25; c – dados obtidos de Santos et al, 2010.

No diagrama de Ramachandran (FIG. 38), observou-se que todos os resíduos se encontram em regiões favorecidas ou permitidas, o que indica uma boa qualidade das estruturas calculadas.

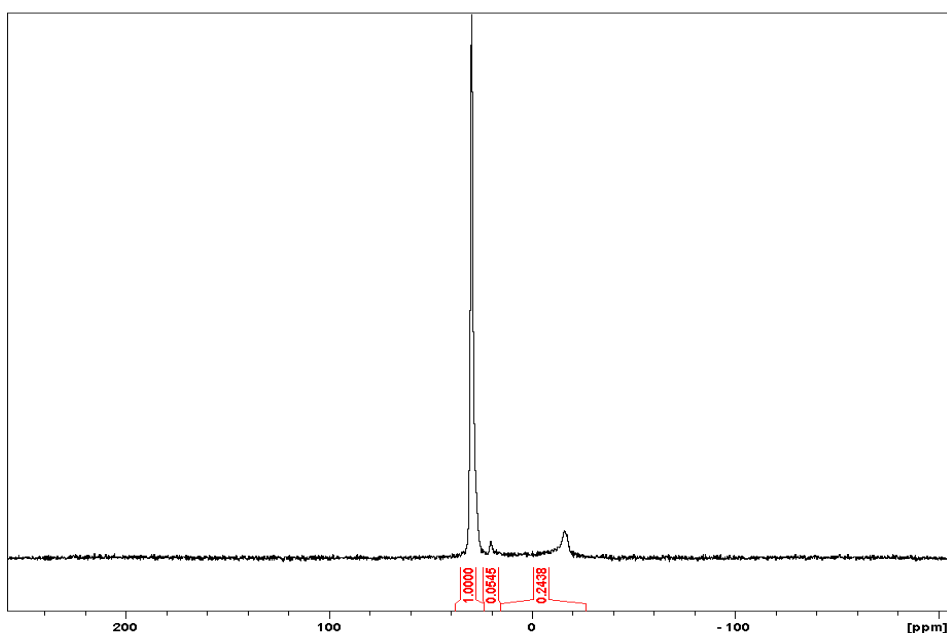
**Figura 38:** Diagrama de Ramachandran para as 10 estruturas de menor energia de LyeTx-I (2 mM) em SDS- $d_{25}$  (200 mM).

A fim de avaliar a orientação do peptídeo ao interagir com a bicamada fosfolipídica, foram realizados experimentos em presença de POPC empregando-se RMN em fase sólida.

### 5.2.8 Ressonância Magnética Nuclear em fase sólida

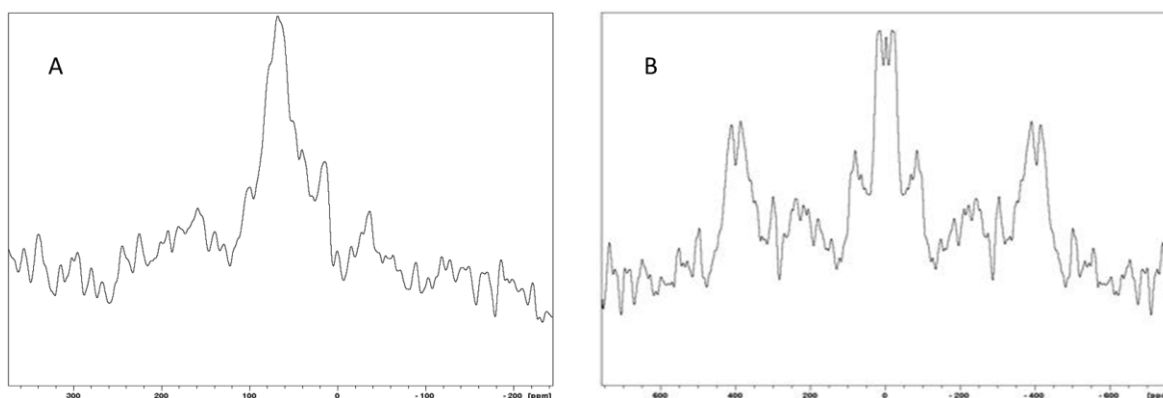
Para os estudos de RMN em fase sólida, foi utilizada amostra com o peptídeo LyeTx-I marcado isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  e  $^2\text{H}$  nas posições Leu-13 e Ala-18, respectivamente. Na amostra preparada, tem-se o peptídeo incorporado em bicamada fosfolipídica uniaxialmente orientada, sendo, dessa forma, possível determinar os ângulos que descrevem a orientação da hélice, nomeadamente os ângulos de inclinação e polar de rotação interna do peptídeo helicoidal orientado em presença de bicamada fosfolipídica (Bechinger e Sizun, 2003). Inicialmente, foi verificada a orientação da bicamada lipídica a partir de experimentos de  $^{31}\text{P}$ . O espectro obtido, representado na Figura 39, mostra um sinal intenso em deslocamento químico de 31,5 ppm, indicando uma boa orientação da bicamada lipídica.

**Figura 39:** Espectro unidimensional de  $^{31}\text{P}$  desacoplado de  $^1\text{H}$ , obtido para a amostra de bicamadas mecanicamente orientadas de POPC a 93% de umidade relativa, contendo o peptídeo LyeTx-I. Espectro obtido em equipamento *Bruker*<sup>®</sup> AMX400 *wide-bore* operando a 162,0 MHz para  $^{31}\text{P}$ .



O espectro obtido para a análise de  $^{15}\text{N}$  desacoplado de  $^1\text{H}$  está representado na Figura 40A. Peptídeos estruturados em  $\alpha$ -hélice apresentam deslocamentos químicos de  $^{15}\text{N}$  característicos de orientações particulares do tensor de deslocamento químico em relação à normal da bicamada fosfolipídica (que coincide em direção e sentido com o vetor do campo magnético  $B_0$  do aparelho). Dessa maneira, peptídeos que interagem paralelamente à superfície da membrana exibem deslocamentos químicos de  $^{15}\text{N}$  abaixo de 100 ppm. Entretanto, se orientados perpendicularmente à membrana o sinal de  $^{15}\text{N}$  aparece em deslocamentos químicos maiores que 200 ppm (Aisenbrey e Bechinger, 2004). O espectro obtido para o peptídeo  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I em presença de POPC apresentou um sinal alargado, com intensidade máxima em 69 ppm. O deslocamento químico indica uma orientação paralela desse peptídeo em relação à bicamada lipídica. Entretanto, o alargamento do sinal bem como a presença de sinais de menor intensidade indica uma heterogeneidade na distribuição dos peptídeos em relação à bicamada orientada, o que pode indicar parcial inserção do peptídeo.

**Figura 40:** Em (A), espectro de  $^{15}\text{N}$  desacoplado de  $^1\text{H}$ , obtido em espectrômetro *Bruker*<sup>®</sup> AMX400 operando a 40 MHz para  $^{15}\text{N}$ . Em (B), espectro de  $^2\text{H}$ , obtido em espectrômetro *Bruker*<sup>®</sup> AVANCE 300 *wide-bore*, operando a 46,07 MHz para  $^2\text{H}$ . Ambos espectros foram adquiridos para a amostras de peptídeos incorporados em bicamadas mecanicamente orientadas de POPC a 93% de umidade relativa, contendo o peptídeo LyeTx-I.



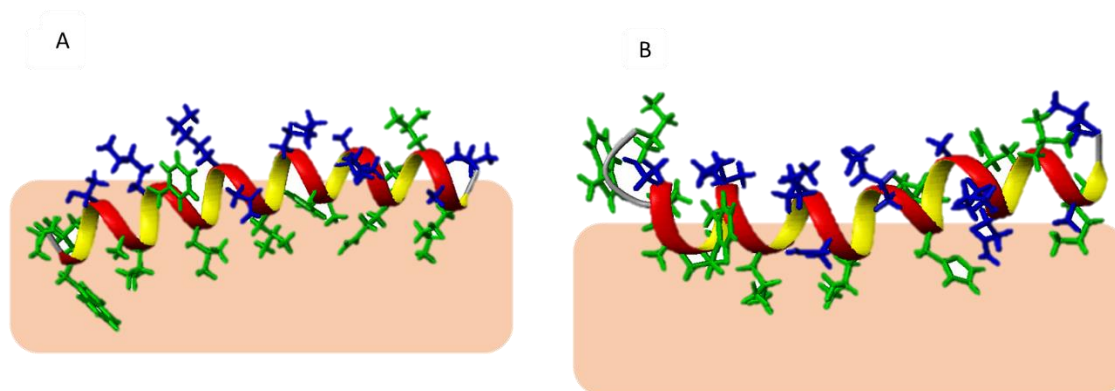
No espectro de  $^2\text{H}$  de  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I (FIG. 40B) foram observados diversos sinais e um desdobramento quadrupolar de  $^2\text{H}$  de aproximadamente 35 kHz, referentes à distância entre sinais mais externos do espectro, o que pode ser associado, mais uma vez, ao baixo alinhamento do peptídeo em relação a bicamada orientada. Esse resultado impossibilita a realização de experimentos simulando as orientações mais favoráveis, uma vez que o LyeTx-I não se encontra alinhado em apenas uma orientação, o que aumenta muito o erro associado ao experimento. Contudo, levando-se em conta os dados biofísicos e estruturais por RMN em

solução, é possível estabelecer modos de interação distintos de LyeTx-I com membrana aniônica e zwitteriônica.

Conforme descrito anteriormente com base no conjunto de dados biofísicos, em meios zwitteriônicos o peptídeo apresenta menor interação e, conseqüentemente, espera-se menor coeficiente de partição nesse meio. Isso reflete em um menor grau de helicidade e maior exposição do resíduo de Trp-2 ao ambiente aquoso. Como resultado, há uma menor capacidade de inserção da região *N*-terminal na interface apolar da bicamada fosfolipídica zwitteriônica. Partindo-se desse pressuposto, propõe-se um modo de interação similar ao apresentado na Figura 41. Esse mecanismo contribui também para justificar a maior raio hidrodinâmico das LUVs de POPC na presença de LyeTx-I, uma vez que em presença de meio biomimético zwitteriônico, propõe-se uma interação menos efetiva, e talvez até intermitente. Além disso, nesse meio, predomina uma interação paralela e eletrostática, como indicado pelo maior valor de  $\Delta H^0$  em POPC quando comparado ao meio aniônico. Contudo, devido ao baixo coeficiente de partição, conforme esperado a partir dos dados de ITC (menor contribuição entrópica e  $K_{app}$ ), há menor perturbação da estrutura da bicamada fosfolipídica. Isso resulta na menor capacidade de perturbação da membrana para LyeTx-I em ambientes zwitteriônicos, observada pelos dados de extravasamento de CF.

Em contrapartida, os dados biofísicos obtidos para a interação do LyeTx-I com meios biomiméticos aniônicos, convergem para uma interação peptídeo-membrana mais eficiente. A estrutura obtida para o LyeTx-I em presença de SDS, apresentou maiores anfipaticidade e extensão de hélice, além de uma conformação menos flexível. Essas características estruturais são fundamentais para a melhor interação do peptídeo com a superfície da membrana. Conseqüentemente, o peptídeo liga-se mais fortemente a membrana e amplia sua capacidade de inserção na bicamada fosfolipídica, iniciando este processo pela região *N*-terminal. A inserção da porção *N*-terminal foi confirmada pelos dados de fluorescência de Trp-2. Dessa forma, peptídeo encontra-se parcialmente paralelo e sutilmente inclinado, permitindo a inserção de toda a face hidrofóbica, que compreende os resíduos de cadeias laterais apolares entre Leu-2 e Leu-17, na região hidrofóbica da bicamada fosfolipídica Figura 41 (p. 76). Por este modo de ação, a interação torna-se maior, bem como a perturbação da estrutura lipídica. Como resultado, observa-se maior capacidade do peptídeo de permear bicamadas lipídicas predominantemente aniônicas, conforme revelado pelos dados de extravasamento de CF.

**Figura 41:** Proposta de mecanismo de interação do peptídeo LyeTx-I com bicamadas lipídicas (representadas em rosa claro, sendo A aniônica e B zwitteriônica).



## 6. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo estudar, sob a perspectiva de diferentes técnicas, a interação do peptídeo antimicrobiano LyeTx-I com diferentes meios biomiméticos. Para isso, fez-se uso de estudos cinéticos, termodinâmicos e estruturais de interação peptídeo-membrana.

Os estudos com o peptídeo LyeTx-I apresentaram coerência de informação das diferentes técnicas aplicadas, tanto para meios biomiméticos zwitteriônicos como aniônicos. Os dados obtidos por dicroísmo circular, juntamente com a RMN em solução, mostram que o peptídeo adota conformação preferencialmente desenovelada quando em solução aquosa, e que, na presença de meios micelares ou fosfolipídicos, adquire elevado conteúdo helicoidal. Contudo, o conteúdo helicoidal é maior quando o peptídeo está em presença de meios biomiméticos aniônicos, o que foi atribuído a sua maior interação nesses ambientes.

Somado a isso, os dados de extravasamento de CF mostraram a maior capacidade de perturbação de membranas em meios aniônicos, enquanto que os dados de fluorescência intrínseca de Trp demonstraram a maior inserção da região *N*-terminal na porção hidrofóbicas dessas membranas.

Por sua vez, o estudo termodinâmico por ITC mostrou aspectos importantes da interação peptídeo-membrana. Em ambos os meios, a interação do peptídeo é termodinamicamente favorecida ( $\Delta G^0 < 0$ ) com constantes de interação relativamente elevadas; porém, novamente, maior para o sistema aniônico. O processo de interação mostrou-se dirigido principalmente pela entropia, sendo ela maior no ambiente aniônico, o que novamente indica maior perturbação da membrana também neste meio, bem como a dessolvatação tanto da membrana quanto do peptídeo. Em contrapartida, embora LyeTx-I apresente uma carga líquida positiva, a componente entálpica, proveniente em grande parte das interações eletrostáticas, apresentou pequena contribuição para as constantes de interação em ambos os meios. Como a ITC mede o calor global envolvido na interação, conclui-se que, embora a interação eletrostática seja fundamental para a interação inicial de LyeTx-I com a membrana, há uma contribuição significativa de interações hidrofóbicas para o baixo valor da entalpia de interação do peptídeo com as membranas fosfolipídicas. Neste sentido, o peptídeo não interage exclusivamente de forma paralela à bicamada. Como observado nos resultados de RMN em fase sólida, não há uma orientação unicamente paralela, o peptídeo apresenta elevada dinâmica molecular, mesmo interagindo com a membrana. Tal constatação corrobora

um desenho de interação no qual a cadeia peptídica consegue alterar sua orientação em relação a bicamada e insere-se, inicialmente pela região *N*-terminal, alterando a organização das cadeias fosfolipídicas na membrana.

Essa proposta é confirmada a partir da estrutura tridimensional obtida por RMN para a conformação mais enovelada que o peptídeo adota em presença de micelas de SDS. Observa-se que a  $\alpha$ -hélice se estende por toda a cadeia peptídica, não obstante possua caráter parcialmente anfipático. Apesar de o caráter catiônico favorecer uma interação mais efetiva e eletrostática com o meio aniônico, a cadeia peptídica pode adotar uma conformação que favorece a inserção da região *N*-terminal, propiciando interações intermoleculares hidrofóbicas com a parte interna da membrana fosfolipídica. Tal característica estrutural se torna parte importante do processo de interação, em que o peptídeo promove a lise da membrana celular. Assim sendo, com o conjunto de análises proposto neste trabalho, foi possível identificar o modo de interação para o mecanismo de ação do LyeTx-I. A proposta do mecanismo, mostra que a ação do LyeTx-I é favorecida e, possivelmente seletiva, para as membranas que apresentam carga superficial negativa, comum para membranas bacterianas.



## 7. Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, T. et al. Isothermal titration calorimetry studies of the binding of the antimicrobial peptide gramicidin S to phospholipid bilayer membranes. **Biochemistry**, v. 44, n. 33, p. 11279-11285, 2005. ISSN 0006-2960.
- ABRUNHOSA, F. et al. Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition. **Journal of Physical Chemistry B-Condensed Phase**, v. 109, n. 36, p. 17311-17319, 2005.
- AISENBREY, C.; BECHINGER, B. Tilt and rotational pitch angle of membrane-inserted polypeptides from combined 15N and 2H solid-state NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 43, n. 32, p. 10502-10512, 2004. ISSN 0006-2960.
- AISENBREY, C.; BERTANI, P.; BECHINGER, B. Solid-state NMR investigations of membrane-associated antimicrobial peptides. **Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols**, p. 209-233, 2010. ISSN 1607615932.
- AL-KADDAH, S. et al. Analysis of membrane interactions of antibiotic peptides using ITC and biosensor measurements. **Biophysical chemistry**, v. 152, n. 1, p. 145-152, 2010. ISSN 0301-4622.
- ALI, M. F. et al. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 81-89, 2001.
- ALSTON, R. W. et al. Peptide sequence and conformation strongly influence tryptophan fluorescence. **Biophysical journal**, v. 94, n. 6, p. 2280-2287, 2008. ISSN 0006-3495.
- ALVAREZ, C. et al. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces—Modulation of conformation and activity, and lipid–protein interaction. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 122, n. 1-2, p. 97-105, 2003.
- AOKI, S.; EPAND, R. M. Caveolin-1 hydrophobic segment peptides insertion into membrane mimetic systems: role of proline residue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1818, n. 1, p. 12-18, 2012. ISSN 0005-2736.
- ARSENIEV, A. S. et al. NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I5A. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 165, n. 1, p. 57-62, 1984.
- ASMELASH, F. Techniques and applications of proteomics in plant ecophysiology. **Biochemistry and biotechnology research**, v. 4, 2016.
- BACHERE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149-168, 2004.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.

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

\_\_\_\_\_. Structure and function of membrane-lytic peptides. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 271-292, 2004.

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

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, 2006. ISSN 0005-2736.

BECHINGER, B.; SEELIG, J. Conformational changes of the phosphatidylcholine headgroup due to membrane dehydration. A 2H-NMR study. **Chemistry and physics of lipids**, v. 58, n. 1-2, p. 1-5, 1991. ISSN 0009-3084.

BECHINGER, B.; SIZUN, C. Alignment and structural analysis of membrane polypeptides by 15N and 31P solid-state NMR spectroscopy. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 18, n. 2, p. 130-145, 2003. ISSN 1552-5023.

BERGER, N. et al. Solution and solid state conformational preferences of a family of cyclic disulphide bridged tetrapeptides. **Biopolymers**, 2016. ISSN 1097-0282.

BHUNIA, A.; DOMADIA, P. N.; BHATTACHARJYA, S. Structural and thermodynamic analyses of the interaction between melittin and lipopolysaccharide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 12, p. 3282-3291, 2007. ISSN 0005-2736.

BRAND, G. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial. 2012.

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

BUDNIK, B. et al. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Journal of mass spectrometry**, v. 39, n. 2, p. 193-201, 2004. ISSN 1096-9888.

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

CARPINO, L. A. et al. Rapid, continuous solution-phase peptide synthesis: application to peptides of pharmaceutical interest. **Organic process research & development**, v. 7, n. 1, p. 28-37, 2003. ISSN 1083-6160.

CAVANAGH, J. **Protein NMR spectroscopy: principles and practice**. Oxford: Elsevier Academic Press, 2006.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. J. Tryptophan-and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1184-1202, 2006. ISSN 0005-2736.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc solid phase peptide synthesis**. New York: Oxford University Press, 2000.

CHEN, C.-C. et al. A mild removal of Fmoc group using sodium azide. **Amino acids**, v. 46, n. 2, p. 367-374, 2014. ISSN 0939-4451.

CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1564-1569, Aug 2009. ISSN 0005-2736. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267772200005>.

CHOI, K.-Y.; CHOW, L. N.; MOOKHERJEE, N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 4, p. 361-370, 2012. ISSN 1662-8128.

CLAPÉS, P.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Enzymatic peptide synthesis in organic media: a comparative study of water-miscible and water-immiscible solvent systems. **Journal of biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 323-338, 1990. ISSN 0168-1656.

COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nature protocols**, v. 2, n. 12, p. 3247-3256, 2007. ISSN 1754-2189.

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.

CROSS, T. [31] Solid-state nuclear magnetic resonance characterization of gramicidin channel structure. **Methods in enzymology**, v. 289, p. 672-IN4, 1997. ISSN 0076-6879.

CROSS, T.; OPELLA, S. Solid-state NMR structural studies of peptides and proteins in membranes. **Current opinion in structural biology**, v. 4, n. 4, p. 574-581, 1994. ISSN 0959-440X.

DELAGLIO, F. et al. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 6, n. 3, p. 277-293, 1995.

DELAGLIO, F.; WU, Z.; BAX, A. Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 149, n. 2, p. 276-281, 2001.

DUBOS, R. J. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 70, n. 1, p. 1, 1939a.

\_\_\_\_\_. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental Pneumococcus infections in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 70, n. 1, p. 11, 1939b.

FALCIGNO, L. et al. NMR and computational data of two novel antimicrobial peptides. **Data in Brief**, v. 8, p. 562-569, 2016. ISSN 2352-3409.

FRANGE, R.; GARCIA, M. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Rev. ciênc. farm. básica apl**, 2009.

FUSCALDI, L. L. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of two peptide LyeTx I derivatives modified with the chelating agent HYNIC for radiolabeling with technetium-99m. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 16, 2016. ISSN 1678-9199.

GALDIERO, S. et al. Peptide-lipid interactions: experiments and applications. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 18758-18789, 2013.

GASPAR, D.; VEIGA, A. S.; CASTANHO, M. A. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. 2013.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006. ISSN 1754-2189.

GRZESIEK, S.; BAX, A. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-enriched proteins. **Journal of biomolecular NMR**, v. 3, n. 2, p. 185-204, 1993. ISSN 0925-2738.

GUZMÁN, F.; BARBERIS, S.; ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 279-314, 2007. ISSN 0717-3458.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, Dec 2006. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242795800033 >.

HENRIKSEN, J. R.; ANDRESEN, T. L. Thermodynamic profiling of peptide membrane interactions by isothermal titration calorimetry: a search for pores and micelles. **Biophysical journal**, v. 101, n. 1, p. 100-109, 2011. ISSN 0006-3495.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. New York: CRC Press, 1997.

IZADPANA, A.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006. ISSN 0893-8512.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical**

**microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

JIANG, Z.; HODGES, R. S.; GERA, L. **Dermaseptin-type and piscidin-type antimicrobial peptides**: Google Patents 2015.

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

JULIANO, L. Química de Peptídeos: Uma Breve Revisão dos Processos de Síntese. **Química Nova**, v. 13, p. 3, 1990.

KATAYAMA, H. et al. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. **Peptides**, v. 23, n. 9, p. 1537-1547, 2002.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Nature Biotechnology**, v. 2, n. 11, p. 979-984, 1984.

KLINE, A. D.; BRAUN, W.; WÜTHRICH, K. Studies by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the [alpha]-amylase inhibitor Tendamistat. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 2, p. 377-382, 1986.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 51-55, 1996.

KOSIKOWSKA, P.; LESNER, A. Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 26, n. 6, p. 689-702, 2016. ISSN 1354-3776.

LEE, N. R.; BOWERMAN, C. J.; NILSSON, B. L. Sequence length determinants for self-assembly of amphipathic  $\beta$ -sheet peptides. **Peptide Science**, v. 100, n. 6, p. 738-750, 2013. ISSN 1097-0282.

LEE, T.-H.; N HALL, K.; AGUILAR, M.-I. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 25-39, 2016. ISSN 1568-0266.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012. ISSN 0196-9781.

LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms--Disperse Systems**. M. Dekker, 1998. ISBN 0824797132.

LIU, Z. et al. Biochemical and pharmacological study of venom of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 79-92, 2009. ISSN 1678-9199.

LOHNER, K.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction

studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 141-156, 1999.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, p. 59, 2016.

MARKLEY, J. L. et al. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids—IUPAC-IUBMB-IUPAB Inter-Union Task Group on the standardization of data bases of protein and nucleic acid structures determined by NMR spectroscopy. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 12, n. 1, p. 1-23, 1998.

MONERA, O. et al. Comparison of antiparallel and parallel two-stranded alpha-helical coiled-coils. Design, synthesis, and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19218-19227, 1993. ISSN 0021-9258.

MUNHOZ, V. H. D. O. **Análise estrutural e topológica de peptídeos bioativos em meios biomiméticos de membranas**. 2012. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MÜNSTER, C. et al. Magainin 2 in phospholipid bilayers: peptide orientation and lipid chain ordering studied by x-ray diffraction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1562, n. 1, p. 37-44, 2002. ISSN 0005-2736.

NABUURS, S. B. et al. Concepts and tools for NMR restraint analysis and validation. **Concepts in Magnetic Resonance**, v. 22, n. 2, p. 90-105, 2004.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011. ISSN 0167-7799.

OLLIVON, M. et al. Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1695-1703, 1988. ISSN 0006-2960.

ONG, Z. Y.; WIRADHARMA, N.; YANG, Y. Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. **Advanced drug delivery reviews**, v. 78, p. 28-45, 2014. ISSN 0169-409X.

OPELLA, S. J.; MARASSI, F. M. Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. **Chemical reviews**, v. 104, n. 8, p. 3587, 2004.

PALCHETTI, S. et al. The protein corona of circulating PEGylated liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 2, p. 189-196, 2016. ISSN 0005-2736.

PEREZ ESPITIA, P. J. et al. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 187-204, 2012. ISSN 1541-4337.

PFLUGRATH, J. W. et al. Crystal structure determination, refinement and the molecular

model of the [alpha]-amylase inhibitor Hoe-467A. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 2, p. 383-386, 1986.

POWERS, J.-P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003. ISSN 0196-9781.

PRATES, M. V. et al. The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13018-13026, 2004. ISSN 0021-9258.

RANCE, M.; BYRD, R. A. Obtaining high-fidelity spin-12 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 52, n. 2, p. 221-240, 1983. ISSN 0022-2364.

RESENDE, J. M. **Estudos estruturais e das interações com membranas de peptídeos antimicrobianos por RMN em solução e em fase sólida. Análise conformacional e cálculos ab-initio de tensores de blindagem.** 2008. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

RIBEIRO, D. E. P. G. C. et al. **Broad spectrum antibiotic peptides of the phylloseptin family:** Google Patents 2007.

RICE, L. M.; BRÜNGER, A. T. Torsion angle dynamics: reduced variable conformational sampling enhances crystallographic structure refinement. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 277-290, 1994. ISSN 1097-0134.

RIENSTRA, C. M. et al. De novo determination of peptide structure with solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 16, p. 10260-10265, 2002. ISSN 0027-8424.

RITCHIE, T. et al. Chapter eleven-reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. **Methods in enzymology**, v. 464, p. 211-231, 2009. ISSN 0076-6879.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomed. Mass Spec**, v. 11, p. 60, 1984.

RUSSELL, A. L. et al. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. **Chemistry and physics of lipids**, v. 163, n. 6, p. 488-497, 2010. ISSN 0009-3084.

SANDERSON, J. M. Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 201-212, 2005.

SANGER, F. The free amino groups of insulin. **Biochemical Journal**, v. 39, n. 5, p. 507, 1945.

SANTOS, D. M. et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. **Amino Acids**, p. 1-10, 2009.

SCHANDA, P.; KUPČE, Ě.; BRUTSCHER, B. SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds. **Journal of biomolecular NMR**, v. 33, n. 4, p. 199-211, 2005. ISSN 0925-2738.

SCHIBLI, D. J.; HWANG, P. M.; VOGEL, H. J. Structure of the Antimicrobial Peptide Tritrpticin Bound to Micelles: A Distinct Membrane-Bound Peptide Fold†. **Biochemistry**, v. 38, n. 51, p. 16749-16755, 1999. ISSN 0006-2960.

SCHOTE, U.; SEELIG, J. Interaction of the neuronal marker dye FM1-43 with lipid membranes: Thermodynamics and lipid ordering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1415, n. 1, p. 135-146, 1998. ISSN 0005-2736.

SCHWIETERS, C. D.; KUSZEWSKI, J. J.; MARIUS CLORE, G. Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 48, n. 1, p. 47-62, 2006.

SCHWIETERS, C. D. et al. The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 160, n. 1, p. 65-73, 2003.

SEELIG, J. Titration calorimetry of lipid-peptide interactions. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1331, n. 1, p. 103-116, 1997. ISSN 0304-4157.

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

SEELIG, J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1666, n. 1, p. 40-50, 2004. ISSN 0005-2736.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

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

SIKORSKA, E. et al. Thermodynamics, size, and dynamics of zwitterionic dodecylphosphocholine and anionic sodium dodecyl sulfate mixed micelles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 1, p. 511-523, 2016. ISSN 1388-6150.

SILVA, L. P. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, n. 3, p. 329-335, 2008.

SITARAM, N.; SUBBALAKSHMI, C.; NAGARAJ, R. Indolicidin, a 13-residue basic antimicrobial peptide rich in tryptophan and proline, interacts with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 4, p. 879-884, 2003. ISSN 0006-291X.



SOKOLOV, Y. et al. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1420, n. 1, p. 23-29, 1999. ISSN 0005-2736.

SORENSEN, A. L. et al. Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. **Glycobiology**, v. 16, n. 2, p. 96, 2006. ISSN 0959-6658.

SOROCHKINA, A. I. et al. Peptide-induced membrane leakage by lysine derivatives of gramicidin A in liposomes, planar bilayers, and erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2428-2435, 2013. ISSN 0005-2736.

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. 252-260, 2000.

\_\_\_\_\_. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 13, n. 1, p. 100-112, 2004.

STAWIKOWSKI, M.; FIELDS, G. B. Introduction to peptide synthesis. **Current protocols in protein science**, p. 18.1. 1-18.1. 13, 2012. ISSN 0471140864.

STEINER, H. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, n. 5820, p. 246-248, 1981.

STELTEN, J.; LEIBFRITZ, D. Clean HX and H2X Proton Selection Using Gradients: gs HnX-HYSEL. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 34, n. 11, p. 951-954, 1996. ISSN 1097-458X.

STEWART, J. C. M. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 1, p. 10-14, 1980.

STRANDBERG, E. et al. Solid-state NMR analysis of the PGLa peptide orientation in DMPC bilayers: structural fidelity of 2 H-labels versus high sensitivity of 19 F-NMR. **Biophysical journal**, v. 90, n. 5, p. 1676-1686, 2006. ISSN 0006-3495.

STRÖMSTEDT, A. A. et al. Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 6, p. 467-478, 2010. ISSN 1359-0294.

TEALE, F.; WEBER, G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. **Biochemical Journal**, v. 65, n. 3, p. 476, 1957.

TIAN, X. et al. Role of peptide self-assembly in antimicrobial peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 7, p. 530-539, 2015. ISSN 1099-1387.

TINOCO, L. W. et al. NMR Structure of PW2 Bound to SDS Micelles A TRYPTOPHAN-RICH ANTICOCCIDIAL PEPTIDE SELECTED FROM PHAGE DISPLAY LIBRARIES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 36351-36356, 2002. ISSN 0021-9258.

TROLL, W.; CANNAN, R. K. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of

amino and imino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 200, n. 2, p. 803-811, 1953.

TSUDA, Y.; OKADA, Y. Solution-Phase Peptide Synthesis. **Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry, Volume 3**, p. 201-251, 2012. ISSN 3527631801.

TURNBULL, W. B.; DARANAS, A. H. On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003.

UEKI, M.; AMEMIYA, M. Removal of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group with tetrabutylammonium fluoride. **Tetrahedron letters**, v. 28, n. 52, p. 6617-6620, 1987. ISSN 0040-4039.

VEIGA, A. S. et al. HIV fusion inhibitor peptide T-1249 is able to insert or adsorb to lipidic bilayers. Putative correlation with improved efficiency. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 45, p. 14758-14763, 2004. ISSN 0002-7863.

VENUGOPAL, D. et al. Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 14, p. 5137-5147, 2010. ISSN 0968-0896.

VERLY, R. M. Peptídeos antimicrobianos: síntese, ensaios biológicos, estudos termodinâmicos e análise estrutural por RMN em meios biomiméticos. 2010.

VERLY, R. M. et al. Structure and Membrane Interactions of the Antibiotic Peptide Dermadistinctin K by Multidimensional Solution and Oriented <sup>15</sup>N and <sup>31</sup>P Solid-State NMR Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 6, p. 2194-2203, 2009.

VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

VERLY, R. M. et al. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 15-24, 2007.

VOIEVODA, N. et al. Thermodynamic and Biophysical Analysis of the Membrane-Association of a Histidine-Rich Peptide with Efficient Antimicrobial and Transfection Activities. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 30, p. 9678-9687, 2015. ISSN 1520-6106.

WANG, Y. et al. Design of novel analogues of short antimicrobial peptide anoplín with improved antimicrobial activity. **Journal of Peptide Science**, v. 20, n. 12, p. 945-951, 2014. ISSN 1099-1387.

WARSCHAWSKI, D. E. et al. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 8, p. 1957-1974, 2011. ISSN 0005-2736.

WIEPRECHT, T.; APOSTOLOV, O.; SEELIG, J. Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. **Biophysical chemistry**, v. 85, n. 2,

p. 187-198, 2000. ISSN 0301-4622.

WILLIAMSON, M. P. Peptide structure determination by NMR. **Spectroscopic Methods and Analyses: NMR, Mass Spectrometry, and Metalloprotein Techniques**, p. 69-85, 1993. ISSN 0896032159.

WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 131-137, 1989.

WISHART, D. S.; SYKES, B. D. [12] Chemical shifts as a tool for structure determination. **Methods in enzymology**, v. 239, p. 363-392, 1994. ISSN 0076-6879.

WU, J. et al. Solution-phase-peptide synthesis via the group-assisted purification (GAP) chemistry without using chromatography and recrystallization. **Chemical Communications**, v. 50, n. 10, p. 1259-1261, 2014. ISSN 1364-548X.

WÜTHRICH, K. **NMR of proteins and nucleic acids**. New York: Wiley, 1986.

YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998.

YANG, D.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 5, p. 691-697, 2001. ISSN 0741-5400.

YAU, W. M. et al. The preference of tryptophan for membrane interfaces. **Biochemistry**, v. 37, n. 42, p. 14713-14718, 1998.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

YONGHUA, X. K. J.; XIANMING, Q. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ANTIBACTERIAL PEPTIDE FROM VENOM OF LYCOSA SINGORIENSIS. **Acta Zoologica Sinica**, v. 3, p. 012, 1989.

YUMOTO, F. et al. Spectroscopic and ITC study of the conformational change upon Ca<sup>2+</sup>-binding in TnC C-lobe and TnI peptide complex from Akazara scallop striated muscle. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, n. 1, p. 109-114, 2008. ISSN 0006-291X.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5449, 1987.

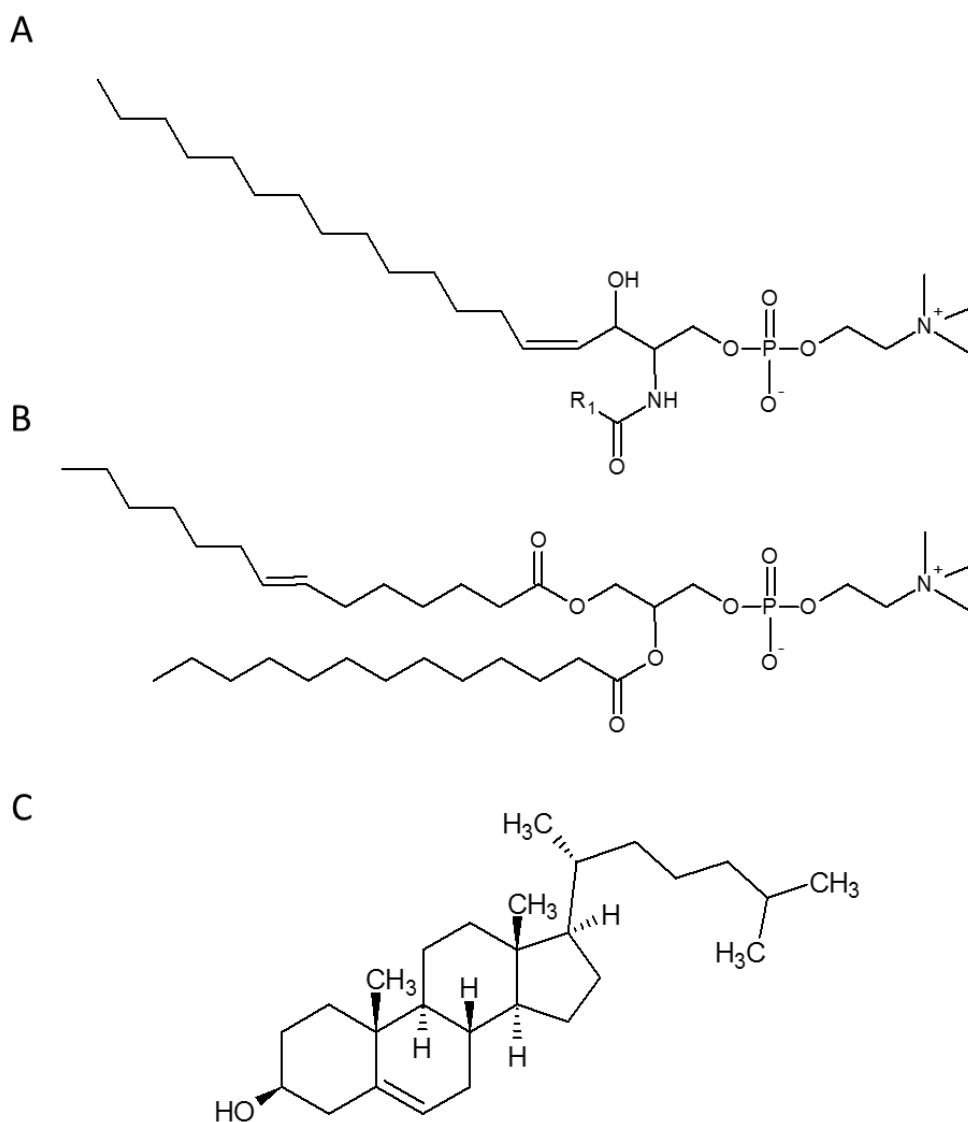
ZETASIZER, N. S. **Zetasizer nano series user manual**. England: Malvern Instruments Ltd 2003.

ZORKO, M. et al. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 2, p. 314-323, 2009. ISSN 0005-2736.

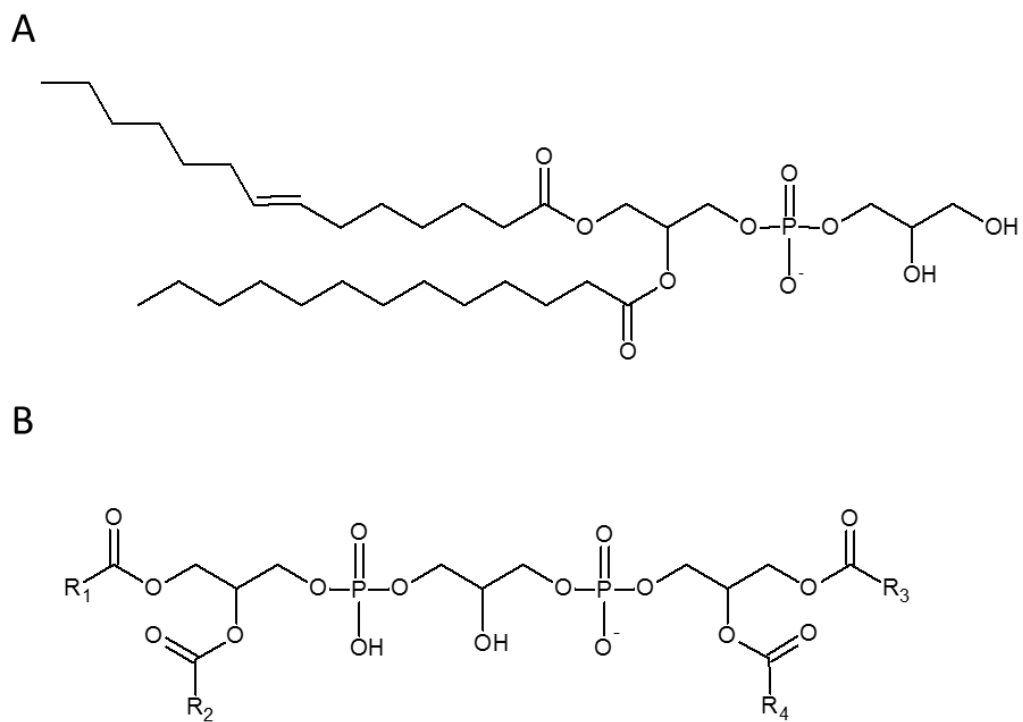
## 8. Anexo

### 8.1 Figuras e tabelas

**Figura 42:** Estrutura química dos componentes principais das membranas eucariotas: esfingomielina (A), fosfatidilcolina (B) e colesterol (C).



**Figura 43:** Estrutura química dos principais componentes das membranas procariotas: fosfatidilglicerol (A) e cardiopina (B).



**Tabela 6:** Condições e acompanhamento da síntese do peptídeo LyeTx-I

Ordem de acoplamento	Derivado de Aminoácido	Excesso	Tempo de Reação (h)	Resultado do Teste de <i>Kaiser</i>	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Leu-OH	4	3	-	+
2°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
3°	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
4°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
5°	Fmoc-Gln(trt)-OH	3	2	-	+
6°	Fmoc-Gln(trt)-OH	3	2	-	+
7°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
8°	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
10°	Fmoc-His(trt)-OH	3	2	-	+
11°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
12°	Fmoc-Gly-OH	3	2	-	+
13°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
14°	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	-	+
15°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
16°	Fmoc-Gly-OH	3	2	-	+
17°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
18°	Fmoc-Phe-OH	3	2	-	+
19°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
20°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
21°	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+

Ordem de acoplamento	Derivado de Aminoácido	Excesso	Tempo de Reação (h)	Resultado do Teste de <i>Kaiser</i>	
				Acoplamento	Desproteção
22°	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3	2	-	+
23°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
24°	Fmoc-Trp(Boc)-OH	3	2	-	+
25°	Fmoc-Ile-OH	3	2	-	+

(+) Resultado positivo, indica da presença de grupo amino livre; (-) Resultado negativo, indica a ausência de grupo amino livre.

**Tabela 7:** Condições e acompanhamento da síntese do peptídeo  $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -LyeTx-I

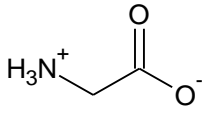
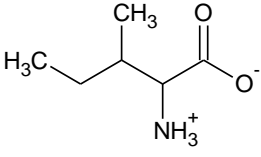
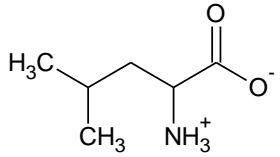
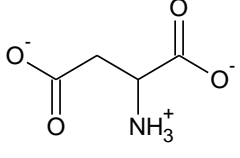
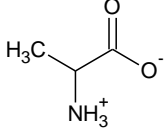
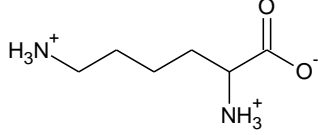
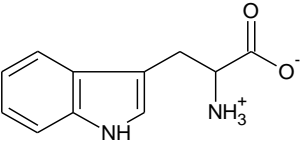
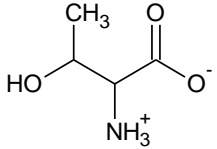
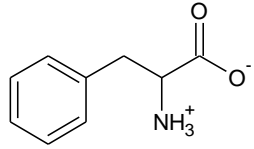
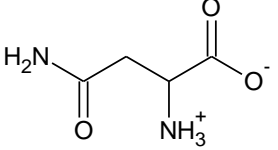
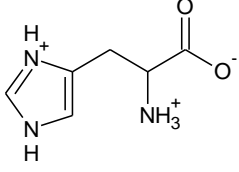
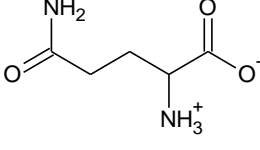
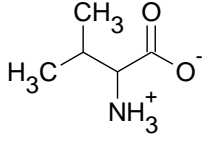
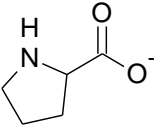
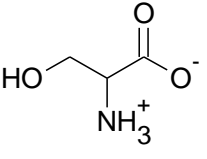
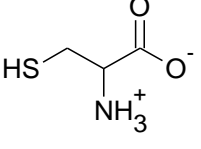
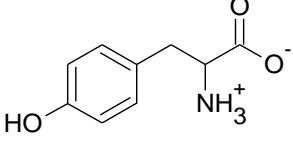
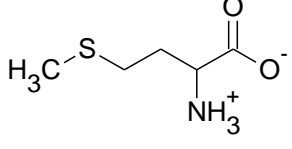
Ordem de acoplamento	Derivado de Aminoácido	Excesso	Tempo de Reação (h)	Resultado do Teste de <i>Kaiser</i>	
				Acoplamento	Desproteção
1°	Fmoc-Leu-OH	4	3	-	+
2°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
3°	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
4°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
5°	Fmoc-Gln(trt)-OH	3	2	-	+
6°	Fmoc-Gln(trt)-OH	3	2	-	+
7°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
8°	Fmoc-(3,3,3-D <sub>3</sub> )Ala-OH	3	2	-	+
8° R	Fmoc-(3,3,3-D <sub>3</sub> )Ala-OH	3	2	-	+
9°	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
10°	Fmoc-His(trt)-OH	3	2	-	+
11°	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
12°	Fmoc-Gly-OH	3	2	-	+
13°	Fmoc-( <sup>15</sup> N)Leu-OH	3	2	-	+

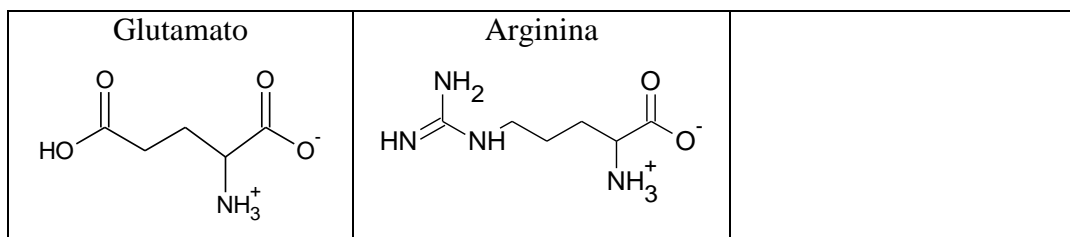
Ordem de acoplamento	Derivado de Aminoácido	Excesso	Tempo de Reação (h)	Resultado do Teste de <i>Kaiser</i>	
				Acoplamento	Desproteção
<b>13° R</b>	Fmoc-( <sup>15</sup> N)Leu-OH				
<b>14°</b>	Fmoc-Asn(trt)-OH	3	2	-	+
<b>15°</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
<b>16°</b>	Fmoc-Gly-OH	3	2	-	+
<b>17°</b>	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
<b>18°</b>	Fmoc-Phe-OH	3	2	-	+
<b>19°</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	3	2	-	+
<b>20°</b>	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
<b>21°</b>	Fmoc-Ala-OH	3	2	-	+
<b>22°</b>	Fmoc-Thr(tBu)-OH	3	2	-	+
<b>23°</b>	Fmoc-Leu-OH	3	2	-	+
<b>24°</b>	Fmoc-Trp(Boc)-OH	3	2	-	+
<b>25°</b>	Fmoc-Ile-OH	3	2	-	+

(+) Resultado positivo, indica da presença de grupo amino livre; (-) Resultado negativo, indica a ausência de grupo amino livre; (R) Repetição da etapa de acoplamento para garantir a obtenção do peptídeo de interesse.



**Figura 44:** Estrutura química dos resíduos de aminoácidos utilizado para a síntese dos peptídeos.

<p>Glicina (G)</p> 	<p>Isoleucina (I)</p> 	<p>Leucina (L)</p> 
<p>Aspartato (D)</p> 	<p>Alanina (A)</p> 	<p>Lisina (K)</p> 
<p>Triptofano (W)</p> 	<p>Treonina (T)</p> 	<p>Fenilalanina (F)</p> 
<p>Asparagina (N)</p> 	<p>Histidina (H)</p> 	<p>Glutamina (Q)</p> 
<p>Valina</p> 	<p>Prolina</p> 	<p>Serina</p> 
<p>Cisteína</p> 	<p>Tirosina</p> 	<p>Metionina</p> 



**Tabela 8:** Tabela de deslocamentos químicos dos resíduos de aminoácidos do LyeTx-I em SDS (200 mM)

Resíduo	Átomo	Deslocamento químico (ppm)
<b>Trp-2</b>	C	59,03
	H <sub>α</sub>	4,743
	N	118,649
<b>Leu-3</b>	C <sub>α</sub>	58,65
	H <sub>α</sub>	4,027
	C <sub>β</sub>	43,202
	N	114,027
<b>Thr-4</b>	C <sub>α</sub>	66,208
	H <sub>α</sub>	3,914
	C <sub>β</sub>	69,876
	N	119,224
<b>Ala-5</b>	C <sub>α</sub>	55,874
	H <sub>α</sub>	4,205
	C <sub>β</sub>	18,976
	N	116,448
<b>Leu-6</b>	C <sub>α</sub>	59,798
	H <sub>α</sub>	4,752
	N	117,029
	C <sub>α</sub>	59,758
<b>Lis-7</b>	H <sub>α</sub>	4,052
	C <sub>β</sub>	33,406
	C <sub>v</sub>	60,856
	C <sub>α</sub>	58,271
<b>Phe-8</b>	H <sub>α</sub>	4,513
	C <sub>β</sub>	40,322
	C <sub>α</sub>	58,271
<b>Leu-9</b>	H <sub>α</sub>	4,289
	C <sub>β</sub>	42,899

<b>Resíduo</b>	<b>Átomo</b>	<b>Deslocamento químico (ppm)</b>
<b>Gly-10</b>	$C_{\alpha}$	47,497
	$H_{\alpha 2}$	3,969
	$H_{\alpha 3}$	3,969
<b>Lis-11</b>	$C_{\alpha}$	59,057
	$H_{\alpha}$	4,293
	$C_{\alpha}$	56,991
<b>Asn-12</b>	$H_{\alpha}$	4,538
	$C_{\beta}$	42,153
<b>Leu-13</b>	$C_{\alpha}$	58,841
	$H_{\alpha}$	4,223
	$C_{\beta}$	43,105
<b>Gly-14</b>	$C_{\alpha}$	48,382
	$H_{\alpha 2}$	3,826
	$H_{\alpha 3}$	3,961
<b>Lis-15</b>	$C_{\alpha}$	60,45
	$H_{\alpha}$	4,14
	$C_{\beta}$	33,137
<b>His-16</b>	$C_{\alpha}$	60,994
	$H_{\alpha}$	4,389
	$C_{\beta}$	31,197
<b>Leu-17</b>	N	117,899
	$C_{\alpha}$	58,701
	$H_{\alpha}$	4,171
<b>Ala-18</b>	$C_{\beta}$	42,806
	$C_{\alpha}$	58,709
	$H_{\alpha}$	4,147
<b>Lis-19</b>	$C_{\beta}$	18,976
	$C_{\alpha}$	56,36
	$H_{\alpha}$	4,161
<b>Gln-20</b>	$C_{\beta}$	31,912
	N	116,49
	$C_{\alpha}$	59,708
	$H_{\alpha}$	4,106
	$C_{\beta}$	29,662

<b>Resíduo</b>	<b>Átomo</b>	<b>Deslocamento químico (ppm)</b>
<b>Gln-21</b>	N	116,836
	C <sub>α</sub>	60,876
	H <sub>α</sub>	4
	C <sub>β</sub>	29,662
<b>Leu-22</b>	N	117,915
	C <sub>α</sub>	55,525
	H <sub>α</sub>	4,157
<b>Ala-23</b>	N	118,327
	H <sub>α</sub>	4,166
<b>Lis-24</b>	N	116,263
	H <sub>α</sub>	4,213
<b>Leu-25</b>	N	118,075
	C <sub>α</sub>	56,887
	H <sub>α</sub>	4,265
	C <sub>β</sub>	41,76

**Tabela 9:** Tabela de restrições de ângulos diedros do LyeTx-I em presença de SDS (200mM)

<b>Correlação</b>	<b>Phi</b>	<b>Psi</b>
<b>Trp-2/Leu-3</b>	-63,14	-42,14
<b>Leu-3/Thr-4</b>	-66,56	-39,88
<b>Thr-4/Ala-5</b>	-62,53	-43,7
<b>Ala-5/Leu-6</b>	-63,22	-39,34
<b>Leu-6/Lis-7</b>	-63,38	-41,8
<b>Lis-7/Phe-8</b>	-59,16	-44,49
<b>Phe-8/Leu-9</b>	-63,14	-41,59
<b>Leu-9/Gly-10</b>	-64,13	-42,86
<b>Gly-10/Lis-11</b>	-63,21	-41,28
<b>Lis-11/Ans-12</b>	-61,7	-42,89
<b>Ans-12/Leu-13</b>	-66,21	-43,72
<b>Leu-13/Gly-14</b>	-64,92	-42,85
<b>Gly-14/Lis-15</b>	-63,49	-40,62
<b>Lis-15/His-16</b>	-64,32	-39,49
<b>His-16/Leu-17</b>	-62,27	-42,08
<b>Leu-17/Ala-18</b>	-61,34	-41,66
<b>Ala-18/Lis-19</b>	-66,41	-30,99
<b>Lis-19/Gln-20</b>	-73,46	-15,12
<b>Gln-20/Gln-21</b>	-62,08	-43,29

Correlação	Phi	Psi
Gln-21/Leu-22	-66,57	-41,12
Leu-22/Ala23	-71,21	-24,14
Ala-23/Lis-24	-76,97	-25,46
Lis-24/Leu-25	-72,92	-31,87

**Tabela 10:** Tabela de restrições de distância obtidas para o LyeTx-I em presença de micelas de SDS (200mM)

Correlações intra residuais				
Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
2	H <sub>ε1</sub>	2	H <sub>δ1</sub>	2,800
2	H <sub>δ1</sub>	2	H <sub>ε1</sub>	3,400
3	H <sub>α</sub>	3	H <sub>β1</sub>	2,800
3	H <sub>β1</sub>	3	H <sub>α</sub>	3,400
3	H <sub>α</sub>	3	H <sub>δ1</sub>	5,000
3	H <sub>β1</sub>	3	H <sub>δ1</sub>	2,800
3	H <sub>N</sub>	3	H <sub>α</sub>	2,800
3	H <sub>α</sub>	3	H <sub>N</sub>	2,800
3	H <sub>N</sub>	3	H <sub>β1</sub>	3,400
3	H <sub>β1</sub>	3	H <sub>N</sub>	5,000
3	H <sub>N</sub>	3	H <sub>δ1</sub>	5,000
3	H <sub>δ1</sub>	3	H <sub>N</sub>	5,000
3	H <sub>N</sub>	3	H <sub>γ</sub>	3,400
3	H <sub>γ</sub>	3	H <sub>N</sub>	5,000
4	H <sub>α</sub>	4	H <sub>β</sub>	2,800
4	H <sub>β</sub>	4	H <sub>γ2</sub>	2,800
4	H <sub>β</sub>	4	H <sub>γ2</sub>	2,800
4	H <sub>N</sub>	4	H <sub>α</sub>	2,800
4	H <sub>α</sub>	4	H <sub>N</sub>	3,400
4	H <sub>N</sub>	4	H <sub>β</sub>	3,400
4	H <sub>β</sub>	4	H <sub>N</sub>	2,800
4	H <sub>N</sub>	4	H <sub>γ2</sub>	3,400
5	H <sub>N</sub>	5	H <sub>α</sub>	5,000
5	H <sub>α</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
5	H <sub>N</sub>	5	H <sub>β</sub>	5,000
5	H <sub>β</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
6	H <sub>β1</sub>	6	H <sub>α</sub>	2,800
6	H <sub>α</sub>	6	H <sub>β1</sub>	2,800
6	H <sub>α</sub>	6	H <sub>δ1</sub>	3,400
6	H <sub>β1</sub>	6	H <sub>δ1</sub>	2,800
6	H <sub>β1</sub>	6	H <sub>γ</sub>	2,800
6	H <sub>γ</sub>	6	H <sub>δ1</sub>	2,800

Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
6	H <sub>N</sub>	6	H <sub>α</sub>	3,400
6	H <sub>N</sub>	6	H <sub>β1</sub>	5,000
7	H <sub>α</sub>	7	H <sub>β1</sub>	3,400
7	H <sub>α</sub>	7	H <sub>β2</sub>	3,400
7	H <sub>γ1</sub>	7	H <sub>β1</sub>	2,800
7	H <sub>β2</sub>	7	H <sub>γ1</sub>	3,400
7	H <sub>N</sub>	7	H <sub>α</sub>	3,400
7	H <sub>α</sub>	7	H <sub>N</sub>	2,800
7	H <sub>N</sub>	7	H <sub>β1</sub>	5,000
7	H <sub>N</sub>	7	H <sub>β2</sub>	5,000
7	H <sub>N</sub>	7	H <sub>γ1</sub>	5,000
8	H <sub>β1</sub>	8	H <sub>α</sub>	3,400
8	H <sub>α</sub>	8	H <sub>β1</sub>	5,000
8	H <sub>β2</sub>	8	H <sub>α</sub>	3,400
8	H <sub>α</sub>	8	H <sub>β2</sub>	5,000
8	H <sub>N</sub>	8	H <sub>α</sub>	2,800
8	H <sub>α</sub>	8	H <sub>N</sub>	5,000
8	H <sub>N</sub>	8	H <sub>β1</sub>	5,000
8	H <sub>β1</sub>	8	H <sub>N</sub>	5,000
8	H <sub>N</sub>	8	H <sub>β2</sub>	3,400
8	H <sub>β2</sub>	8	H <sub>N</sub>	5,000
9	H <sub>N</sub>	9	H <sub>α</sub>	3,400
9	H <sub>α</sub>	9	H <sub>N</sub>	3,400
9	H <sub>N</sub>	9	H <sub>β1</sub>	3,400
9	H <sub>β1</sub>	9	H <sub>N</sub>	2,800
9	H <sub>N</sub>	9	H <sub>β2</sub>	5,000
9	H <sub>N</sub>	9	H <sub>δ1</sub>	5,000
9	H <sub>γ</sub>	9	H <sub>N</sub>	5,000
10	H <sub>N</sub>	10	H <sub>α1</sub>	2,800
10	H <sub>α2</sub>	10	H <sub>N</sub>	5,000
11	H <sub>α</sub>	11	H <sub>β1</sub>	5,000
11	H <sub>β1</sub>	11	H <sub>α</sub>	3,400
11	H <sub>β1</sub>	11	H <sub>γ1</sub>	3,400
11	H <sub>N</sub>	11	H <sub>α</sub>	3,400
11	H <sub>α</sub>	11	H <sub>N</sub>	5,000
11	H <sub>N</sub>	11	H <sub>β1</sub>	2,800
11	H <sub>β1</sub>	11	H <sub>N</sub>	3,400
11	H <sub>N</sub>	11	H <sub>β2</sub>	5,000
11	H <sub>β2</sub>	11	H <sub>N</sub>	5,000
11	H <sub>N</sub>	11	H <sub>γ1</sub>	5,000
11	H <sub>γ1</sub>	11	H <sub>N</sub>	3,400
12	H <sub>N</sub>	12	H <sub>α</sub>	3,400
12	H <sub>α</sub>	12	H <sub>N</sub>	3,400
12	H <sub>N</sub>	12	H <sub>β1</sub>	5,000

Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
12	H <sub>β1</sub>	12	H <sub>N</sub>	2,800
12	H <sub>N</sub>	12	H <sub>β2</sub>	5,000
12	H <sub>β2</sub>	12	H <sub>N</sub>	5,000
13	H <sub>β1</sub>	13	H <sub>α</sub>	2,800
13	H <sub>α</sub>	13	H <sub>β1</sub>	2,800
13	H <sub>N</sub>	13	H <sub>α</sub>	3,400
13	H <sub>α</sub>	13	H <sub>N</sub>	3,400
13	H <sub>N</sub>	13	H <sub>β1</sub>	5,000
13	H <sub>β1</sub>	13	H <sub>N</sub>	3,400
13	H <sub>N</sub>	13	H <sub>δ1</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α1</sub>	5,000
14	H <sub>α1</sub>	14	H <sub>N</sub>	2,800
14	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α2</sub>	5,000
14	H <sub>α2</sub>	14	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>δ1</sub>	15	H <sub>α</sub>	3,400
15	H <sub>N</sub>	15	H <sub>α</sub>	3,400
15	H <sub>α</sub>	15	H <sub>N</sub>	2,800
15	H <sub>N</sub>	15	H <sub>β1</sub>	5,000
15	H <sub>β1</sub>	15	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	15	H <sub>δ1</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	15	H <sub>γ1</sub>	5,000
16	H <sub>β1</sub>	16	H <sub>α</sub>	3,400
16	H <sub>α</sub>	16	H <sub>β1</sub>	5,000
16	H <sub>δ1</sub>	16	H <sub>α</sub>	3,400
16	H <sub>N</sub>	16	H <sub>α</sub>	3,400
16	H <sub>α</sub>	16	H <sub>N</sub>	2,800
16	H <sub>N</sub>	16	H <sub>β1</sub>	3,400
16	H <sub>β1</sub>	16	H <sub>N</sub>	3,400
16	H <sub>ε1</sub>	16	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>β1</sub>	17	H <sub>α</sub>	3,400
17	H <sub>N</sub>	17	H <sub>α</sub>	3,400
17	H <sub>α</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	17	H <sub>β1</sub>	5,000
17	H <sub>β1</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	17	H <sub>δ1</sub>	5,000
17	H <sub>δ1</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	17	H <sub>γ</sub>	5,000
17	H <sub>γ</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
18	H <sub>N</sub>	18	H <sub>α</sub>	2,800
18	H <sub>N</sub>	18	H <sub>β</sub>	3,400
19	H <sub>N</sub>	19	H <sub>α</sub>	2,800
19	H <sub>N</sub>	19	H <sub>β1</sub>	2,800
19	H <sub>N</sub>	19	H <sub>β2</sub>	5,000
20	H <sub>α</sub>	20	H <sub>β1</sub>	2,800

Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
20	H <sub>ε21</sub>	20	H <sub>β1</sub>	5,000
20	H <sub>ε22</sub>	20	H <sub>β1</sub>	5,000
20	H <sub>α</sub>	20	H <sub>γ1</sub>	3,400
20	H <sub>γ1</sub>	20	H <sub>α</sub>	5,000
20	H <sub>γ1</sub>	20	H <sub>β1</sub>	2,800
20	H <sub>ε21</sub>	20	H <sub>γ1</sub>	5,000
20	H <sub>ε22</sub>	20	H <sub>γ1</sub>	5,000
20	H <sub>N</sub>	20	H <sub>α</sub>	3,400
20	H <sub>α</sub>	20	H <sub>N</sub>	2,800
20	H <sub>N</sub>	20	H <sub>β1</sub>	5,000
20	H <sub>β1</sub>	20	H <sub>N</sub>	5,000
20	H <sub>N</sub>	20	H <sub>β2</sub>	2,800
20	H <sub>β2</sub>	20	H <sub>N</sub>	3,400
20	H <sub>N</sub>	20	H <sub>γ1</sub>	5,000
20	H <sub>γ1</sub>	20	H <sub>N</sub>	5,000
21	H <sub>β1</sub>	21	H <sub>α</sub>	2,800
21	H <sub>α</sub>	21	H <sub>β1</sub>	3,400
21	H <sub>β1</sub>	21	H <sub>γ1</sub>	2,800
21	H <sub>N</sub>	21	H <sub>α</sub>	2,800
21	H <sub>α</sub>	21	H <sub>N</sub>	2,800
21	H <sub>β1</sub>	21	H <sub>N</sub>	5,000
21	H <sub>N</sub>	21	H <sub>β2</sub>	5,000
21	H <sub>β2</sub>	21	H <sub>N</sub>	5,000
21	H <sub>N</sub>	21	H <sub>γ1</sub>	3,400
21	H <sub>γ1</sub>	21	H <sub>N</sub>	3,400
22	H <sub>N</sub>	22	H <sub>α</sub>	2,800
23	H <sub>α</sub>	23	H <sub>β</sub>	2,800
23	H <sub>β</sub>	23	H <sub>α</sub>	2,800
23	H <sub>N</sub>	23	H <sub>α</sub>	3,400
23	H <sub>N</sub>	23	H <sub>β</sub>	3,400
24	H <sub>α</sub>	24	H <sub>β1</sub>	3,400
24	H <sub>α</sub>	24	H <sub>β2</sub>	2,800
24	H <sub>α</sub>	24	H <sub>ε1</sub>	3,400
24	H <sub>ε1</sub>	24	H <sub>α</sub>	5,000
24	H <sub>β2</sub>	24	H <sub>ε1</sub>	2,800
24	H <sub>ε1</sub>	24	H <sub>β2</sub>	2,800
24	H <sub>α</sub>	24	H <sub>γ1</sub>	3,400
24	H <sub>β2</sub>	24	H <sub>γ1</sub>	2,800
24	H <sub>γ1</sub>	24	H <sub>β2</sub>	2,800
24	H <sub>ε1</sub>	24	H <sub>γ1</sub>	2,800
24	H <sub>N</sub>	24	H <sub>α</sub>	2,800
24	H <sub>α</sub>	24	H <sub>N</sub>	2,800
24	H <sub>N</sub>	24	H <sub>β1</sub>	2,800
24	H <sub>β1</sub>	24	H <sub>N</sub>	3,400



Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
24	H <sub>N</sub>	24	H <sub>β2</sub>	5,000
24	H <sub>β2</sub>	24	H <sub>N</sub>	5,000
24	H <sub>N</sub>	24	H <sub>ε1</sub>	5,000
24	H <sub>ε1</sub>	24	H <sub>N</sub>	5,000
24	H <sub>N</sub>	24	H <sub>γ1</sub>	2,800
24	H <sub>γ1</sub>	24	H <sub>N</sub>	2,800
25	H <sub>α</sub>	25	H <sub>β1</sub>	5,000
25	H <sub>α</sub>	25	H <sub>δ1</sub>	5,000
25	H <sub>δ1</sub>	25	H <sub>β1</sub>	2,800
25	H <sub>α</sub>	25	H <sub>γ</sub>	3,400
25	H <sub>δ1</sub>	25	H <sub>γ</sub>	3,400
25	H <sub>N</sub>	25	H <sub>α</sub>	2,800
25	H <sub>α</sub>	25	H <sub>N</sub>	2,800
25	H <sub>N</sub>	25	H <sub>β1</sub>	2,800
25	H <sub>β1</sub>	25	H <sub>N</sub>	3,400
25	H <sub>N</sub>	25	H <sub>δ1</sub>	5,000
25	H <sub>N</sub>	25	H <sub>γ</sub>	3,400
25	H <sub>γ</sub>	25	H <sub>N</sub>	5,000
<b>Correlações de media distância</b>				
5	H <sub>N</sub>	3	H <sub>N</sub>	5,000
3	H <sub>N</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
6	H <sub>N</sub>	4	H <sub>α</sub>	5,000
4	H <sub>α</sub>	6	H <sub>N</sub>	5,000
4	H <sub>α</sub>	7	H <sub>β1</sub>	5,000
7	H <sub>N</sub>	4	H <sub>α</sub>	5,000
4	H <sub>α</sub>	7	H <sub>N</sub>	5,000
5	H <sub>N</sub>	7	H <sub>N</sub>	5,000
7	H <sub>N</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
5	H <sub>α</sub>	8	H <sub>β1</sub>	5,000
8	H <sub>β1</sub>	5	H <sub>α</sub>	5,000
10	H <sub>N</sub>	8	H <sub>α</sub>	5,000
11	H <sub>N</sub>	8	H <sub>α</sub>	5,000
13	H <sub>N</sub>	10	H <sub>α1</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	11	H <sub>α</sub>	5,000
13	H <sub>α</sub>	16	H <sub>β1</sub>	5,000
16	H <sub>β1</sub>	13	H <sub>α</sub>	3,400
14	H <sub>N</sub>	16	H <sub>β1</sub>	5,00
16	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α2</sub>	5,000
16	H <sub>N</sub>	14	H <sub>N</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	16	H <sub>N</sub>	5,000
13	H <sub>α</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	13	H <sub>α</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α1</sub>	3,400
14	H <sub>α1</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000

Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
17	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α2</sub>	5,000
14	H <sub>α2</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
19	H <sub>N</sub>	16	H <sub>α</sub>	5,000
19	H <sub>N</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	19	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>α</sub>	20	H <sub>β1</sub>	5,000
18	H <sub>N</sub>	20	H <sub>β2</sub>	5,000
20	H <sub>α</sub>	23	H <sub>β</sub>	5,000
23	H <sub>N</sub>	20	H <sub>β2</sub>	5,000
21	H <sub>N</sub>	23	H <sub>β</sub>	5,000
21	H <sub>α</sub>	24	H <sub>β1</sub>	5,000
24	H <sub>β1</sub>	22	H <sub>N</sub>	5,000
22	H <sub>N</sub>	24	H <sub>N</sub>	5,000
24	H <sub>N</sub>	22	H <sub>N</sub>	5,000
25	H <sub>N</sub>	23	H <sub>β</sub>	5,000
<b>Correlações sequenciais</b>				
4	H <sub>N</sub>	3	H <sub>β1</sub>	5,000
4	H <sub>N</sub>	3	H <sub>N</sub>	2,800
3	H <sub>N</sub>	4	H <sub>N</sub>	2,800
4	H <sub>N</sub>	5	H <sub>β</sub>	5,000
5	H <sub>N</sub>	4	H <sub>α</sub>	5,000
4	H <sub>α</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
5	H <sub>N</sub>	4	H <sub>β</sub>	3,400
4	H <sub>β</sub>	5	H <sub>N</sub>	5,000
5	H <sub>N</sub>	4	H <sub>N</sub>	5,000
4	H <sub>N</sub>	5	H <sub>N</sub>	3,400
7	H <sub>N</sub>	6	H <sub>α</sub>	5,000
9	H <sub>N</sub>	8	H <sub>α</sub>	5,000
9	H <sub>N</sub>	8	H <sub>β1</sub>	5,000
8	H <sub>β1</sub>	9	H <sub>N</sub>	5,000
9	H <sub>N</sub>	8	H <sub>β2</sub>	5,000
8	H <sub>β2</sub>	9	H <sub>N</sub>	5,000
8	H <sub>N</sub>	9	H <sub>N</sub>	3,400
9	H <sub>N</sub>	8	H <sub>N</sub>	3,400
11	H <sub>N</sub>	10	H <sub>α1</sub>	3,400
11	H <sub>β1</sub>	12	H <sub>N</sub>	5,000
12	H <sub>N</sub>	11	H <sub>β2</sub>	5,000
13	H <sub>N</sub>	12	H <sub>α</sub>	5,000
13	H <sub>N</sub>	12	H <sub>β1</sub>	5,000
12	H <sub>β1</sub>	13	H <sub>N</sub>	5,000
13	H <sub>N</sub>	12	H <sub>β2</sub>	5,000
12	H <sub>β2</sub>	13	H <sub>N</sub>	5,000

Resíduo	Átomo	Resíduo	Átomo	Distância (Å)
13	H <sub>α</sub>	14	H <sub>N</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	13	H <sub>α</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	13	H <sub>β1</sub>	3,400
13	H <sub>N</sub>	14	H <sub>N</sub>	2,800
14	H <sub>N</sub>	13	H <sub>N</sub>	2,800
15	H <sub>β1</sub>	14	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α1</sub>	5,000
14	H <sub>α1</sub>	15	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	14	H <sub>α2</sub>	5,000
14	H <sub>α2</sub>	15	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	14	H <sub>N</sub>	5,000
14	H <sub>N</sub>	15	H <sub>N</sub>	5,000
15	H <sub>N</sub>	16	H <sub>N</sub>	3,400
16	H <sub>N</sub>	14	H <sub>N</sub>	3,400
17	H <sub>N</sub>	16	H <sub>β1</sub>	5,000
16	H <sub>β1</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	16	H <sub>N</sub>	5,000
16	H <sub>N</sub>	17	H <sub>N</sub>	5,000
17	H <sub>N</sub>	18	H <sub>N</sub>	3,400
18	H <sub>N</sub>	17	H <sub>N</sub>	3,400
21	H <sub>N</sub>	20	H <sub>N</sub>	3,400
20	H <sub>N</sub>	21	H <sub>N</sub>	3,400
22	H <sub>N</sub>	21	H <sub>α</sub>	5,000
22	H <sub>N</sub>	21	H <sub>β2</sub>	3,400
22	H <sub>N</sub>	21	H <sub>N</sub>	3,400
21	H <sub>N</sub>	22	H <sub>N</sub>	3,400
23	H <sub>β</sub>	22	H <sub>N</sub>	5,000
23	H <sub>N</sub>	24	H <sub>N</sub>	3,400
24	H <sub>N</sub>	23	H <sub>N</sub>	3,400
25	H <sub>N</sub>	24	H <sub>β1</sub>	5,000
25	H <sub>N</sub>	24	H <sub>N</sub>	3,400
24	H <sub>N</sub>	25	H <sub>N</sub>	3,400