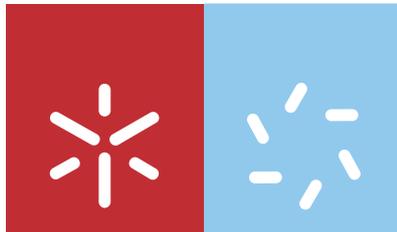


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Tarsila Gabriel Castro

**Estudo da estrutura e função de péptidos contendo novas ,  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas utilizando métodos de modelação e simulação estrutural**



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Tarsila Gabriel Castro

**Estudo da estrutura e função de péptidos  
contendo novas ,  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas  
utilizando métodos de modelação e  
simulação estrutural**

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal

Trabalho realizado sob a orientação do  
**Doutor Nuno Miguel da Silva Micaêlo**

***Autora:***

Tarsila Gabriel Castro

e-mail: [tarsilagabriel@hotmail.com](mailto:tarsilagabriel@hotmail.com)

Tese de Mestrado em Química Medicinal

***Título:*** Estudo da estrutura e função de péptidos contendo novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas utilizando métodos de modelação e simulação estrutural

***Ano da Publicação:*** 2011

***Orientador:***

Professor Doutor Nuno Miguel da Silva Micaêlo

e-mail: [micaelo@quimica.uminho.pt](mailto:micaelo@quimica.uminho.pt)

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITO DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Aos meus filhos e marido.



*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

***Galileu Galilei***



## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora de Fátima pela força e fé sempre presentes na minha vida que me incentivam a seguir em frente e perseguir os meus objetivos.

Aos meus filhos, André e Bárbara e ao meu marido, Filipe, agradeço por todo amor que me faz persistir e superar todas as dificuldades, provações, cansaço e obstáculos.

Às famílias portuguesa e brasileira, agradeço pelo apoio, compreensão, exemplos e orientação na vida. Agradecimento especial aos meus pais, Astrolábio e Graça, que sempre incentivaram minha formação e orgulharam-se de cada pequena conquista. Agradeço também à minha sogra, Alice Castro, por toda a ajuda que recebi durante o mestrado, quando da minha gravidez e, mais recentemente, ao cuidar dos meus filhos sempre que foi preciso, para que eu pudesse escrever esta dissertação.

Ao meu tio Afrânio, químico, amigo querido e conselheiro, que tantas vezes me incentivou e ajudou a discernir os caminhos a trilhar no meu futuro.

Ao Dr. Nuno Micaêlo, orientador e amigo, pelos conhecimentos transmitidos e desafios propostos que me moldaram como estudante. Agradeço também por todo apoio e compreensão em momentos decisivos e por acreditar nas minhas capacidades e crescimento pessoal e profissional.

À Escola de Ciências da Universidade do Minho pela formação concedida, aos professores do Departamento de Química da Universidade do Minho que contribuíram para este ciclo de formação, e aos colegas e amigos do Mestrado em Química Medicinal pelo companheirismo e amizade.

Aos integrantes – passageiros ou de mais longa data – do *Molecular Modelling and Simulation Lab*, pelo companheirismo, conversas e discussões que motivam cada dia de trabalho.

Aos amigos e antigos orientadores do Laboratório de Química Quântica Computacional da Universidade Federal da Paraíba, nomeadamente, Italo, Liana, Kelson, Arquimedes, Vanessa,

Isabelle, Walkiria, Regiane, Claudia, Otávio, Sidney e Mozart, por terem despertado em mim o interesse na investigação científica e me influenciado positivamente para a Química Teórica e Computacional. Agradeço ainda, pela amizade e apoio sempre presentes, sentidos mesmo aqui do outro lado do Atlântico.

Aos amigos de perto e de longe que com sua amizade também contribuíram para a concretização desse trabalho. E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão e sucesso de mais este ciclo na minha vida, meus sinceros agradecimentos.

## Resumo

### **Estudo da estrutura e função de péptidos contendo novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas utilizando métodos de modelação e simulação estrutural**

A resistência aos antibióticos está a tornar-se um dos problemas mais importantes para a saúde humana. A Alameticina e o Peptaibolin são peptaibols com atividade antibiótica cujos mecanismos de ação são mediados pela interação com a membrana celular dos organismos patogénicos. Estes peptaibols podem constituir uma alternativa aos antibióticos convencionais. A interação destes péptidos com uma membrana provoca uma alteração da sua permeabilidade que leva à morte celular devido ao choque osmótico e vazamento de material intracelular. Os peptaibols são uma família de peptídeos caracterizada por serem de cadeia curta ( $\leq 20$  resíduos), terem um grupo álcool no C-terminal e elevados níveis de aminoácidos não naturais, principalmente o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (AIB), ácido isovalérico (Iva) e o imino ácido hidroxiprolina (Hyp). O presente trabalho investigou as propriedades de estrutura/função de novos aminoácidos dissustituídos não naturais ( $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas) à semelhança do AIB, tais como: DEG ( $\alpha,\alpha$ -dietilglicina), DIB ( $\alpha,\alpha$ -diisobutilglicina) e DHG ( $\alpha,\alpha$ -dihexilglicina), entre outros. Estes aminoácidos são capazes de promover melhorias na estrutura/atividade dos peptaibols e, por isso, foram usados para modelar novos análogos da Alameticina e do Peptaibolin, através da substituição das posições ocupadas por resíduos de AIB por uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina. As novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas podem desempenhar um papel importante, uma vez que podem atuar com indutores conformacionais capazes de constranger a estrutura secundária dos péptidos para uma forma helicoidal, devido à dupla substituição no C $\alpha$  por grupos alquilos. Em resumo, as hipóteses de trabalho desenvolvidas na presente investigação são as seguintes: 1) Os novos aminoácidos são capazes de originar análogos da Alameticina e do Peptaibolin com maior helicidade e mais constrangidos que os péptidos nativos? 2) A inserção de novos aminoácidos na Alameticina em membrana é termodinamicamente favorável? 3) Qual é o aminoácido não natural que promove uma inserção mais efetiva do Peptaibolin em membranas? 4) Tendo em conta o efeito estrutural e termodinâmico de cada novo aminoácido, quais são os análogos ideais da Alameticina e do Peptaibolin com maior capacidade de inserção na membrana? As respostas a estas perguntas irão fornecer conhecimentos fundamentais sobre o uso de uma nova coleção de aminoácidos não naturais na construção de péptidos/proteínas com atividade terapêutica.



## **Abstract**

### **Structural and functional study of new peptides containing $\alpha,\alpha$ -dialkyl glycines using structural modeling and simulation methods**

Antibiotic resistance is becoming one of the most important problems for human health. Alamethicin and Peptaibolin are peptaibols with antibiotic activity. Their mechanism of action is mediated by the interaction with the cell membrane of pathogens. These peptaibols can be an alternative to conventional antibiotics. The interaction of these peptides with a membrane causes a change in its permeability that leads to cell death due to osmotic shock and leakage of intracellular material. Peptaibols are a family of peptides characterized by short-chain ( $\leq 20$  residues), with an alcohol group at C-terminal and high levels of unnatural amino acids, especially  $\alpha$ -aminoisobutyric acid (AIB), isovaleric acid (Iva) and imino acid hydroxyproline (Hyp). This study investigated the properties of structure/function of new unnatural disubstituted amino acids ( $\alpha,\alpha$ -dialkyl glycines) like AIB, such as DEG ( $\alpha,\alpha$ -diethyl glycine), DIB ( $\alpha,\alpha$ -di-isobutyl glycine) and DHG ( $\alpha,\alpha$ -dihexyl glycine) among others. These amino acids are able to improve the structure/activity properties of peptaibols. Therefore, these unnatural amino acids were used to model new analogues of Alamethicin and Peptaibolin by replacing the AIB positions by a new  $\alpha,\alpha$ -dialkyl glycine. The new  $\alpha,\alpha$ -dialkyl glycines can play an important structural role in peptides, because they can constrain their secondary structure into a helical shape, due to the presence of the double substitution at the C $\alpha$  by alkyl groups. In short, the working hypotheses developed in this research are the following: 1) the new amino acids are able to generate analogues with higher helicity and more constrained than the native peptides Alamethicin and Peptaibolin? 2) The insertion of new amino acids into Alamethicin in the membrane is thermodynamically favorable? 3) What is the unnatural amino acid that promotes a more effective insertion of the Peptaibolin analogues into membranes? 4) Considering the structural and thermodynamic effects of each new amino acid observed so far, which are the ideal Alamethicin and Peptaibolin sequence more capable of insertion into the membrane? The answers to these questions will provide fundamental knowledge about the use of a new collection of unnatural amino acids in the construction of future peptides/proteins with therapeutic activity.



# ÍNDICE:

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 PEPTIDOMIMÉTICOS .....	2
1.2 ALFA,ALFA-DIALQUILGLICINAS .....	7
1.3 ALAMETICINA.....	9
1.3.1 Estrutura.....	9
1.3.2 Função .....	12
1.4 PEPTAIBOLIN .....	12
1.5 MODELAÇÃO E SIMULAÇÃO ESTRUTURAL.....	14
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 PARAMETRIZAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NÃO-NATURAIS .....	24
2.2 CONSTRUÇÃO DE ANÁLOGOS DA ALAMETICINA.....	24
2.3 CONSTRUÇÃO DE ANÁLOGOS DO PEPTAIBOLIN.....	25
2.4 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR .....	26
2.5 ANÁLISES .....	29
<b>3 ALAMETICINA E ANÁLOGOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 ESTRUTURA EM ÁGUA, ETANOL E POPC.....	34
3.2 PROPRIEDADES DINÂMICAS .....	50
3.3 PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS .....	52
3.4 CONCLUSÕES.....	57
<b>4 PEPTAIBOLIN E ANÁLOGOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 ESTRUTURA EM ÁGUA E ETANOL .....	60
4.2 PROPRIEDADES DINÂMICAS .....	71
4.3 INSERÇÃO EM MEMBRANA.....	73
4.4 CONCLUSÕES.....	83
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>92</b>



## Abreviaturas

AA ou aa	Aminoácido
ACE ou Ac	Grupo acetilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIB	Ácido $\alpha$ -aminoisobutírico ou $\alpha$ -metil alanina
ALA	L-alanina
Alm	Alameticina
AMPs	<i>Antimicrobial Peptides</i> (péptidos antimicrobianos)
CHG	$\alpha,\alpha$ -ciclohexilglicina
DBZ	$\alpha,\alpha$ -dibenzilglicina
DEG	$\alpha,\alpha$ -dietilglicina
DFG	$\alpha,\alpha$ -difenilglicina
DHG	$\alpha,\alpha$ -dihexilglicina
DIB	$\alpha,\alpha$ -diisobutilglicina
DM	Dinâmica molecular
DMG	$\alpha,\alpha$ -dimetanolglicina
DPG	$\alpha,\alpha$ -dipropilglicina
FF	<i>Force field</i> (Campo de forças)
Gln	L-glutamina
Glu	L-glutamato ou ácido glutâmico
Gly	L-glicina
Hyp	Imino ácido hidroxiprolina
Iva	Ácido isovalérico ou isovalina
Leu	L-leucina
nm	Nanómetros
ns	Nano segundo
PCA	<i>Principal component analysis</i> (análise de componentes principais)
Pep	Peptaibolin
PET	<i>Positron emission tomography</i> (tomografia por emissão de positrões)
PHOL	L-fenilalaninol
POPC	1-palmitoil-2oleoil-fosfatidilcolina
Pro	L-prolina

ps	Pico segundo
RMSD	<i>Root mean square deviation</i> (raiz do desvio quadrático médio)
RMSF	<i>Root mean square fluctuation</i> (raiz da flutuação quadrática média)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAS	<i>Solvent accessible surface</i> (superfície acessível ao solvente)
SD	<i>Steepest Descent</i>
SS	<i>Secondary structure</i> (estrutura secundária)
SPC	<i>Simple point charge</i> (cargas pontuais)
SPECT	<i>Single photon emission computed tomography</i> (tomografia computorizada por emissão de fóton único)
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura bidimensional do péptido hemiasterlina (A) e do peptidomimético HTI-286 (B) proposto por Yamashita e colaboradores. <sup>[9,11]</sup> .....	4
<b>Figura 2.</b> Estruturas bidimensionais dos aminoácidos não naturais, AIB (ácido $\alpha$ -amino isobutírico ou $\alpha$ -metil alanina), Iva (ácido isovalérico ou isovalina) e o Hyp (imino ácido hidroxiprolina).....	5
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do modelo <i>barrel-stave</i> de inserção de péptidos numa bicamada lipídica. O azul escuro das hélices representa a face hidrofóbica e o vermelho a hidrofílica. Este modelo propõe que as faces hidrofóbicas das hélices voltam-se para fora de forma a estarem aptas a interagir com as cadeias apolares dos fosfolípidos. (Adaptado de Brogden, 2005). <sup>[26]</sup> .....	6
<b>Figura 4.</b> Estruturas bidimensionais das $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas usadas para construir os novos análogos da Alm e do Pep. (Consulte a Figura 5 para uma versão tridimensional dessas moléculas em projeção <i>cross-eye</i> ).....	8
<b>Figura 5.</b> Estruturas tridimensionais em <i>cross eye</i> das $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo. Representação em <i>sticks</i> usando o esquema de cores: verde = carbonos, azul = nitrogénios, vermelho = oxigénios e branco = hidrogénios. Apenas os hidrogénios com carácter polar estão representados. Estas e as demais estruturas foram feitas com o programa Pymol. <sup>[33]</sup> .....	9
<b>Figura 6.</b> Sequência peptídica da Alm, com os resíduos AIB em destaque em negrito. ....	10
<b>Figura 7.</b> Estrutura experimental da Alm obtida por difração de raios-X (PDB:1AMT). A Figura mostra o empacotamento cristalino de três cadeias independentes de Alm. A estrutura secundária está ilustrada com uma fita e as ligações químicas com <i>sticks</i> . A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5. ....	10
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura secundária de um monómero de Alm, com os resíduos de AIB em destaque na cor azul-ciano. Convenção de cores definida na Figura 5.....	11
<b>Figura 9.</b> Estrutura bidimensional do Peptaibolin e respectiva sequência de resíduos. 13	
<b>Figura 10.</b> Estrutura tridimensional em <i>cross eye</i> do Peptaibolin, com os resíduos AIB em destaque na cor azul-ciano. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5. ....	13

<b>Figura 11.</b> Representação esquemática das funções de energia potencial (V) mais comuns de um campo de forças de mecânica molecular. Figura adaptada de Steinbach <sup>[58]</sup> . ....	15
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo das etapas associadas a um protocolo padrão de experiências de simulação de DM. ....	20
<b>Figura 13.</b> Exemplo ilustrativo de um gráfico gerado a partir de médias obtidas numa experiência de IT. ....	21
<b>Figura 14.</b> Esquema da modelação de análogos construídos a partir da Alm nativa. .	25
<b>Figura 15.</b> Esquema dos análogos construídos a partir do Pep nativo. ....	25
<b>Figura 16.</b> Esquemas das experiências de simulação de DM realizadas para a Alm, o Pep e seus respectivos análogos, nos diferentes meios estudados: água, etanol e POPC. ....	26
<b>Figura 17.</b> Esquema ilustrativo da (A) troca de um resíduo de AIB por uma $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina no péptido Alm inserido na membrana e (B) ciclo termodinâmico empregue para avaliar a energia livre associada ao processo de troca de um AIB por uma nova $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina.....	29
<b>Figura 18.</b> Médias dos RMSDs dos $C\alpha$ em relação a estrutura experimental da Alm em $\alpha$ -hélice, nos diferentes meios. Em (A) péptidos substituídos nas duas faces e em (B), péptidos substituídos numa só face. <i>Fitting</i> dos $C\alpha$ relativamente à estrutura inicial de raios-X. O desvio padrão das médias das várias réplicas dos péptidos em água e etanol estão indicados no gráfico. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido. ....	34
<b>Figura 19.</b> Média do número de resíduos em $\alpha$ -hélice para os péptidos A) substituídos nas duas faces e para os análogos B) substituídos em apenas uma face. Valores médios obtidos das simulações com as cinco réplicas em água e etanol, incluindo barras do desvio padrão, e para uma réplica em POPC. ....	36
<b>Figura 20.</b> Estruturas centrais em água, de uma das réplicas simuladas com o FF G54a7, da Alm e dos péptidos contendo ALA, DHG e CHG. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5. ....	37
<b>Figura 21.</b> Alm em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-ciano. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização, no entanto as linhas que definem a caixa, representam os limites da célula onde as moléculas de água estão confinadas.....	38

**Figura 22.** Alm com ALA em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização. .... 39

**Figura 23.** Alm com DEG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização. 40

**Figura 24.** Alm com DHG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização. 40

**Figura 25.** Alm com CHG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização. 41

**Figura 26.** Áreas hidrofílica e hidrofóbica expostas ao solvente, em percentual, para os péptidos substituídos nas duas faces e nos meios água e etanol, respectivamente quadrantes (A) e (C) e para os análogos substituídos em apenas uma face nos meios água e etanol, respectivamente, os quadrantes (B) e (D)..... 42

**Figura 27.** Diagrama de Ramachandran padrão, retirado do programa PROCHECK.<sup>[71,72]</sup> ..... 44

**Figura 28.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os aminoácidos AIB e ALA inseridos na Alm em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação..... 45

**Figura 29.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas na Alm em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação..... 47

**Figura 30.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para todos os aminoácidos AIB e ALA inseridos na Alm em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação..... 48

**Figura 31.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas na Alm em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação..... 49

**Figura 32.** Médias dos RMSFs dos  $C\alpha$  em relação a estrutura experimental da Alm. Valores médios para as réplicas em água, etanol e POPC e respectivos desvio padrão de cada

média. Em (A) observam-se os resultados para os péptidos substituídos nas duas faces e em (B) para os péptidos substituídos em uma face.....	50
<b>Figura 33.</b> Análise dos componentes principais, comparando a Alm com os péptidos contendo ALA, CHG e DHG, em água.....	51
<b>Figura 34.</b> Energia livre de inserção ( $\Delta\Delta G$ ) dos novos aminoácidos não naturais na Alm em membrana POPC.....	53
<b>Figura 35.</b> Médias dos RMSDs dos $C\alpha$ em relação a estrutura experimental da Alm em $\alpha$ -hélice, nos meios água e POPC. <i>Fitting</i> dos $C\alpha$ dos péptidos foi feito relativamente à estrutura inicial de raios-X. Os valores médios para as cinco réplicas dos péptidos em água estão associados a um desvio padrão. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido. ....	54
<b>Figura 36.</b> Médias e desvios padrão dos RMSFs dos $C\alpha$ em relação a estrutura experimental da Alm em $\alpha$ -hélice, nos meios água e POPC. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido.....	55
<b>Figura 37.</b> Estruturas em água, de uma das réplicas simuladas com o FF G54a7, dos análogos ideais 1 e 2. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5. ....	56
<b>Figura 38.</b> Análogos ideais 1 (A) e 2 (B) da Alm em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-ciano. As moléculas de água foram omitidas nestas imagens para melhor visualização.....	56
<b>Figura 39.</b> Médias dos RMSDs do $C\alpha$ do Pep e análogos, em água e etanol, em relação à estrutura de referência do Pep, em $\alpha$ -hélice. Valores médios da totalidade da simulação, 100ns. <i>Fitting</i> dos $C\alpha$ relativamente à estrutura inicial do Pep modelada em $\alpha$ -hélice. ....	60
<b>Figura 40.</b> Estruturas centrais do Pep e análogos simulados durante 100ns em água. ....	62
<b>Figura 41.</b> RMSDs dos $C\alpha$ dos péptidos em água, ao longo dos 100ns de simulação, comparando o Pep com um análogo sob estudo. <i>Fitting</i> dos $C\alpha$ dos péptidos em relação à estrutura de referência em $\alpha$ -hélice. Pep representado a preto e análogos a vermelho.....	63
<b>Figura 42.</b> Número de pontes de hidrogénio intramoleculares que ocorrem para o Pep e análogos durante a simulação em água. Pep representado a preto e análogos a vermelho....	65

<b>Figura 43.</b> Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros $\varphi$ e $\psi$ para os aminoácidos AIB, ALA e as novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação. ....	68
<b>Figura 44.</b> Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros $\varphi$ e $\psi$ para os aminoácidos AIB, ALA e as novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em etanol, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.....	70
<b>Figura 45.</b> RMSF do $C\alpha$ de cada resíduo do Pep e análogos simulados em água durante 100ns. A posição do AIB, da ALA e das novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas corresponde aos resíduos 3 e 5, os restantes correspondem aos resíduos de Leucina e aos terminais ACE e PHOL do Pep (veja Figura 9).....	72
<b>Figura 46.</b> RMSF do $C\alpha$ de cada resíduo do Pep e análogos simulados em etanol durante 100ns. A posição do AIB, da ALA e das novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas corresponde aos resíduos 3 e 5, os restantes correspondem aos resíduos de Leucina e aos terminais ACE e PHOL do Pep (veja Figura 9).....	73
<b>Figura 47.</b> Distância ao centro de massa da membrana que o Pep os análogos percorreram ao longo dos 150ns de simulação no sistema água + POPC.....	74
<b>Figura 48.</b> Imagens ilustrativas da inserção do Pep com DHG em membrana POPC. Esquema de cores segundo a convenção definida na Figura 5. O péptido em questão contendo o resíduo DHG está destacado com os carbonos em azul-ciano. ....	75
<b>Figura 49.</b> RMSD dos $C\alpha$ do Pep e análogos sob estudo em água + POPC. A amostragem considerou a totalidade da simulação. <i>Fitting</i> dos $C\alpha$ em relação à estrutura de partida do Pep modelada em $\alpha$ -hélice.....	77
<b>Figura 50.</b> Gráficos do número de pontes de hidrogénio que ocorrem para o Pep e análogos durante a simulação em POPC (últimos 20ns da simulação).....	79
<b>Figura 51.</b> Distribuição da densidade de probabilidade dos pares de diedros $\varphi$ e $\psi$ para os aminoácidos AIB, ALA e as novas $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando os últimos 20ns da simulação.....	81
<b>Figura 52.</b> RMSF dos $C\alpha$ do Pep e análogos modelados, em POPC, durante os últimos 20ns de simulação. ....	82



# **1 Introdução**

## 1.1 Peptidomiméticos

Uma vasta gama de funções biológicas são conhecidamente controladas por péptidos ou pequenas proteínas. Os péptidos participam numa grande variedade de processos bioquímicos, podendo atuar como enzima, hormona, antibiótico, receptor, entre outras funções.<sup>[1]</sup> É possível classificar os péptidos com base na função que exercem, no entanto, salienta-se que alguns péptidos podem apresentar características que os enquadram em diferentes grupos.<sup>[2]</sup> Alguns desses grupos são:

- Hormonas: estão envolvidas na transmissão de sinal entre as células. Exemplos clássicos são: gastrina e angiotensina II.
- Neuropeptidos: encontrados em tecidos neurais, estão envolvidos em processos de regulação e sinalização. Como exemplos, cita-se as endorfinas e a vasopressina.
- Antibióticos: inibem o crescimento de microorganismos como bactérias e fungos. Exemplos relevantes: gramicidina, valinomicina, gomesina e peptaibols.
- Toxinas: alto potencial venenoso. Exemplos: palutoxina e curtatoxina.

Em princípio, seria possível sintetizar péptidos terapêuticos utilizando exclusivamente aminoácidos naturais, no entanto, este tipo de péptido não é ideal para ser utilizado como agente terapêutico pois apresentaria desvantagens, como por exemplo: baixa biodisponibilidade<sup>†</sup>, baixa absorção, perfil farmacocinético<sup>‡</sup> pobre e baixa estabilidade<sup>§</sup>.<sup>[3,4]</sup> Além disso, estes péptidos são um alvo fácil para as peptidases, que são enzimas que provocam a hidrólise das ligações peptídicas e por consequência anulam a ação do péptido. Assim sendo, é essencial desenvolver novas moléculas semelhantes aos péptidos que minimizem as desvantagens associadas ao uso

---

<sup>†</sup> Biodisponibilidade – propriedade relacionada com a absorção do fármaco. Refere-se a quão rápido uma determinada droga atinge a corrente sanguínea e em que quantidade, tendo em conta o metabolismo de primeira passagem, problemas de absorção e distribuição. É dependente do tipo de administração utilizada.

<sup>‡</sup> Perfil farmacocinético – propriedade relacionada com os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção sofridos pelo fármaco.

<sup>§</sup> Estabilidade do fármaco – capacidade de manter-se dentro das especificações estabelecidas, resistindo à decomposições físicas, químicas ou biológicas e mantendo a potência e ação.

Patrick G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Fourth Edition, Oxford.

de aminoácidos naturais e, se possível, otimizem a função de novos péptidos terapêuticos. Estas moléculas parecidas com os péptidos são conhecidas como peptidomiméticos.<sup>[5]</sup>

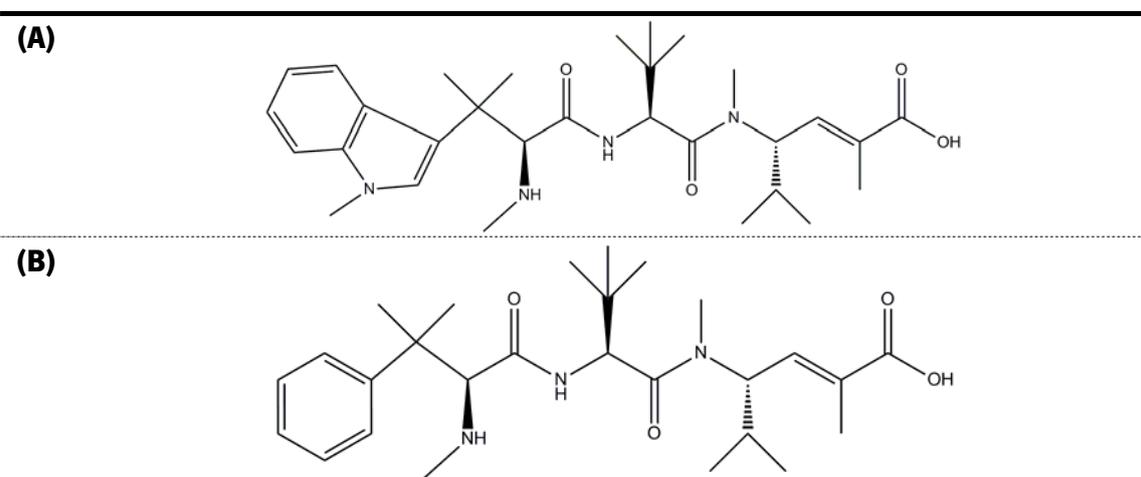
Um peptidomimético é uma molécula desenhada de forma a mimetizar as propriedades funcionais de um outro péptido (geralmente, exclusivamente constituído por aminoácidos naturais), ou seja, deve interagir com o mesmo alvo biológico e produzir o mesmo efeito, mas apresentar diferenças estruturais capazes de contornar os problemas enumerados anteriormente.

O grande interesse da comunidade científica nos peptidomiméticos está relacionado com o fato destes compostos poderem efetivamente apresentar atividade biológica significativa, representando fortes modelos para o desenho de agentes terapêuticos.<sup>[5,6,7,8]</sup> É comum os peptidomiméticos serem constituídos por aminoácidos não naturais ou outras moléculas funcionais que são responsáveis por impor uma conformação mais restrita, comportamento metabólico mais estável e eventualmente, uma melhoria na sua atividade biológica.

Nos últimos anos, os peptidomiméticos têm sido alvo de intensa investigação e isto proporcionou o desenvolvimento de péptidos com propriedades anticancerígenas, antibióticas, hormonais, biotecnológicas, entre outras.<sup>[9]</sup> Exemplos relevantes de peptidomiméticos são os análogos de insulina.<sup>[10]</sup> A insulina é uma hormona produzida no pâncreas que tem por função regular o metabolismo dos carboidratos, triglicerídeos e de algumas proteínas e, é usado medicinalmente para o tratamento de alguns tipos de diabetes. A sua estrutura consiste num polipéptido formado por duas cadeias que estão ligas por uma ponte dissulfídica. Uma das cadeias contém 21 resíduos aminoácidos e a outra 30. A necessidade terapêutica de melhorar o seu perfil farmacocinético e estabilidade levaram ao desenho de peptidomiméticos que são análogos à insulina.<sup>[9,10]</sup>

Outro exemplo é o tripéptido hemiasterlina (Figura 1A). Trata-se de um péptido isolado de algumas espécies de esponjas marinhas (*Auletta sp.*, *Cymbastela sp.*, *Hemiasterella minor*, e *Siphonochalina sp.*) que tem mostrado ter atividade citotóxica contra uma variedade de células cancerígenas. Esta molécula é um bom exemplo de um péptido que ocorre naturalmente e que aceita modificações estruturais para otimizar sua estabilidade e biodisponibilidade. A sua estrutura simples torna-a ideal para o desenho de peptidomiméticos.<sup>[11]</sup> A Figura 1 apresenta as estruturas da hemiasterlina (A) e de um análogo (B) proposto por Yamashita e colaboradores.<sup>[11]</sup> A principal diferença entre as duas estruturas está no terminal-N, onde o benzopirrol presente na

hemiasterlina é substituído por um grupo fenil, que mantém a atividade biológica do péptido e a interação com o alvo.



**Figura 1.** Estrutura bidimensional do péptido hemiasterlina (A) e do peptidomimético HTI-286 (B) proposto por Yamashita e colaboradores.<sup>[9,11]</sup>

Os peptidomiméticos têm outras aplicações nas mais diversas áreas, como por exemplo, péptidos marcados com radionuclídeos para serem usados em técnicas de PET (*positron emission tomography*) ou SPECT (*single photo emission computed tomography*) e nanotubos baseado em péptidos. Já há conhecimento de algumas aplicações em biotecnologia e biomedicina, das quais cita-se o desenvolvimento de materiais bio compatíveis de alta sensibilidade (dispositivos e sensores compatíveis com os tecidos humanos).<sup>[9]</sup>

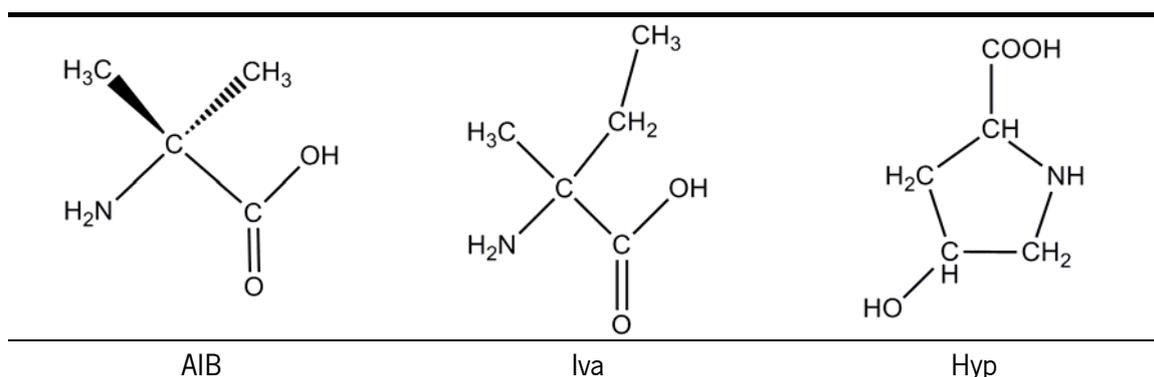
Uma das áreas de maior relevância para o desenvolvimento de peptidomiméticos está relacionada com os péptidos antimicrobianos (*AMPs*, do inglês, *Antimicrobial Peptides*). Os AMPs são normalmente desenvolvidos de forma inata e adaptativa pelo sistema imunitário de alguns invertebrados e vertebrados, devido a necessidade que estes seres vivos têm de se defender de infecções microbianas.<sup>[12,13]</sup> Os AMPs podem apresentar um largo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. Tendo em conta o aumento da resistência das bactérias aos antibióticos clássicos, os AMPs de atividade antibiótica têm sido amplamente investigados como alternativa às terapias convencionais usando antibióticos.” Os AMPs apresentam atividade

---

\*\* A bactéria multirresistente, *Escherichia coli* enterohemorrágica (*EHEC*), causou vítimas mortais na Alemanha, entre Maio e Julho de 2011. Peritos afirmaram em Junho de 2011 que rebentos vegetais foram os vetores de contaminação desta bactéria. Houve grande dificuldade em travar o avanço da infecção através da utilização de antibióticos correntes, principalmente nos doentes infectados com a estirpe mais perigosa. Diário de Notícias, visitado em 05/07/2011: [http://www.dn.pt/inicio/globo/interior.aspx?content\\_id=1897053&seccao=Europa](http://www.dn.pt/inicio/globo/interior.aspx?content_id=1897053&seccao=Europa).

bactericida devido à sua capacidade de interagir com a membrana celular desses organismos, perturbando sua permeabilidade e levando à morte celular.<sup>[14,15,16]</sup> Em alternativa, alguns tipos de AMPs podem ligar-se a receptores de membranas, levando a uma perda específica de função ou podem atuar intracelularmente, comprometendo a síntese de metabólitos importantes para o microorganismo. A resistência bacteriana a esses compostos é muito menos provável, pois as enzimas catalíticas não deverão reconhecer os aminoácidos não naturais, e é por isso que os AMPs estão sendo considerados compostos líderes no desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos.<sup>[17]</sup>

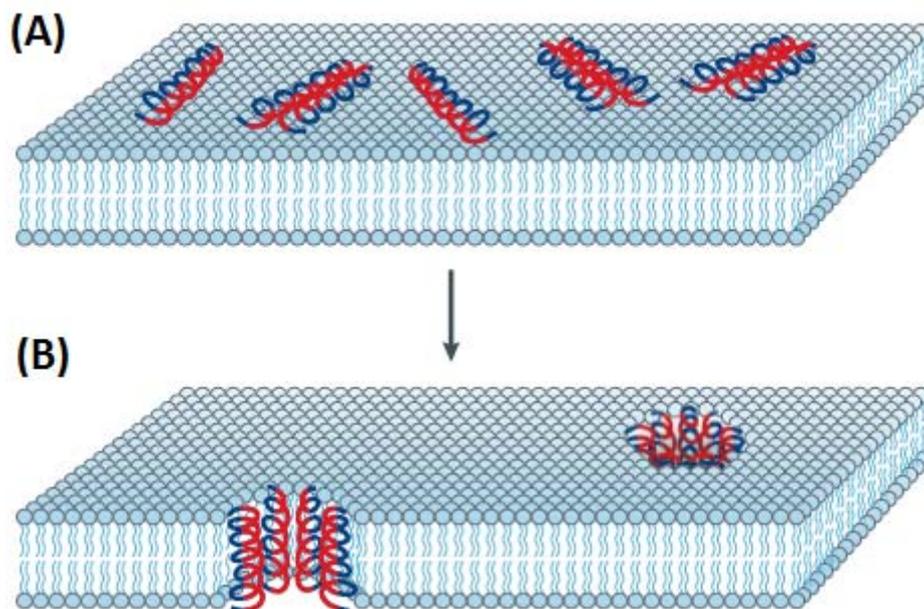
A família dos AMPs possui, ainda, um grupo importante de péptidos classificado como peptaibols. Esta categoria de péptidos é assim denominada por apresentar na sua composição o aminoácido não natural AIB (ácido  $\alpha$ -amino isobutírico ou  $\alpha$ -metil alanina) e um resíduo álcool no terminal C. Os péptidos pertencentes a este grupo apresentam uma cadeia curta, até 20 resíduos e podem ser ricamente constituídos por aminoácidos não naturais como o AIB, o Iva (ácido isovalérico ou isovalina) e o Hyp (imino ácido hidroxiprolina) (Figura 2).<sup>[18,19]</sup>



**Figura 2.** Estruturas bidimensionais dos aminoácidos não naturais, AIB (ácido  $\alpha$ -amino isobutírico ou  $\alpha$ -metil alanina), Iva (ácido isovalérico ou isovalina) e o Hyp (imino ácido hidroxiprolina).

Whitmore e Wallace criaram uma base de dados de peptaibols de forma a catalogar todas as informações conhecidas sobre as sequências e estruturas dos Peptaibols.<sup>[20]</sup> Exemplos representativos de peptaibols são a vancomicina, antiemoebina, zervamicina e a alameticina (Alm). Estes péptidos são isolados de algumas culturas de fungos, possuem estrutura anfipática e, assim como todos os peptaibols catalogados até hoje, tem estrutura helicoidal determinada por difração de raios-X.<sup>[19]</sup> Os resíduos de AIB tendem a promover a formação de hélices, pois o segundo grupo metilo ligado ao carbono alfa impõe um constrangimento da cadeia peptídica para este tipo de estrutura secundária.

O modelo de ação proposto para a entrada dos peptídeos em membranas é o modelo *Barrel-Stave* (Figura 3). Neste modelo, o péptido anfipático está na forma helicoidal e posiciona-se paralelamente à superfície da membrana, depois, penetra na bicamada lipídica para induzir a formação de poros que são orientados perpendicularmente ao plano da bicamada.<sup>[21,22]</sup> Este modelo foi proposto pela primeira vez por Baumann e Muller<sup>[23]</sup> e experiências realizadas com o péptido antibiótico Alm providenciaram uma confirmação experimental deste modelo.<sup>[24]</sup> Uma quantidade pequena de péptidos pode ser suficiente para a formação de poros, pois estes podem organizar-se entre si na membrana e formar um poro capaz de iniciar a disrupção das funções celulares. No entanto, Hancock e Chapple reforçam que não é energeticamente favorável a inserção de um único péptido anfipático em uma membrana, o recrutamento de vários monómeros é essencial para a formação de um canal transmembranar estável energeticamente.<sup>[25]</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática do modelo *barrel-stave* de inserção de péptidos numa bicamada lipídica. O azul escuro das hélices representa a face hidrofóbica e o vermelho a hidrofílica. Este modelo propõe que as faces hidrofóbicas das hélices voltam-se para fora de forma a estarem aptas a interagir com as cadeias apolares dos fosfolípidos. (Adaptado de Brogden, 2005).<sup>[26]</sup>

## 1.2 alfa,alfa-dialquilglicinas

As glicinas  $\alpha,\alpha$ -dissubstituídas ou  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas são aminoácidos estereoquimicamente constringidos que apesar de poderem ocorrer naturalmente em alguns péptidos, não são codificados por ADN.

Estes compostos apresentam na sua estrutura um carbono em posição alfa no qual estão ligados, um grupo amina, um grupo ácido, e duas cadeias laterais que podem ser simétricas ou não (Figura 4). É proposto que esta dissubstituição faça com que os diedros típicos ( $\varphi$  e  $\psi$ ), em torno do  $C\alpha$  destes aminoácidos, sejam mais constringidos relativamente aos observados para os aminoácidos naturais codificados por ADN.<sup>[27]</sup> Este tipo de arranjo estrutural, aliado ao impedimento estérico causado pela presença do segundo grupo alquilo ligado ao  $C\alpha$ , leva à formação de péptidos constringidos e de estrutura secundária estável.

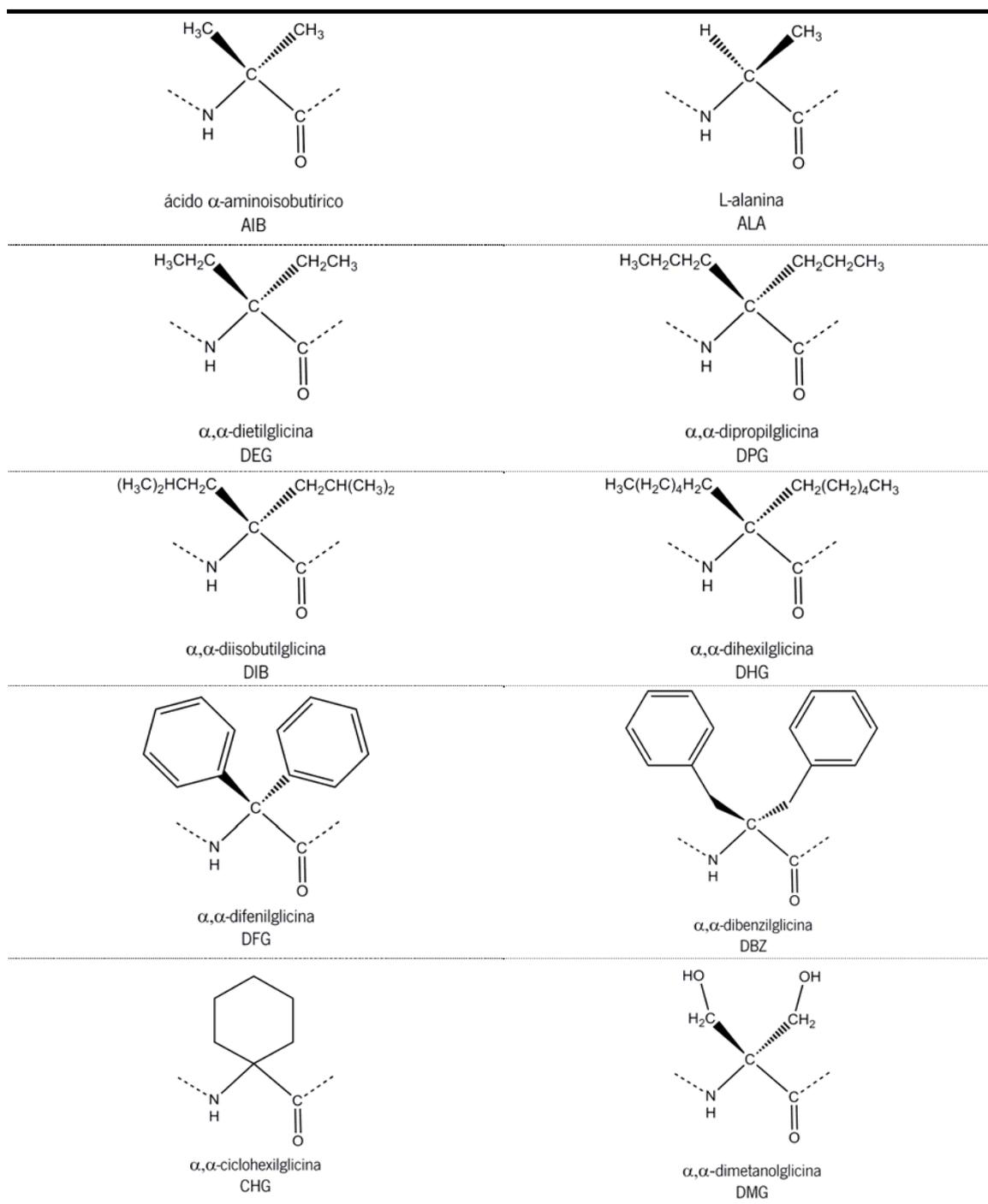
O AIB é o exemplo mais simples desta classe de compostos e está presente nos péptidos com atividade antibiótica mais relevantes, como a Alm.<sup>[28]</sup> A presença do grupo metilo adicional no  $C\alpha$  restringe o espaço conformacional na vizinhança deste aminoácido e força a cadeia do péptido a assumir uma conformação helicoidal.

Exemplos na literatura indicam que o AIB provoca fortes restrições na liberdade conformacional dos péptidos e, por isso, as estruturas mais estáveis observadas são em hélices  $3_{10}$  e em hélices- $\alpha$ .<sup>[29, 30, 31]</sup> Outros estudos revelam que as  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas com cadeias laterais maiores estabilizam-se em diedros com valores  $\varphi = 180^\circ$  e  $\psi = 180^\circ$ , resultando num arranjo estrutural do tipo  $C_s$ , ou seja, conformação estendida.<sup>[32]</sup>

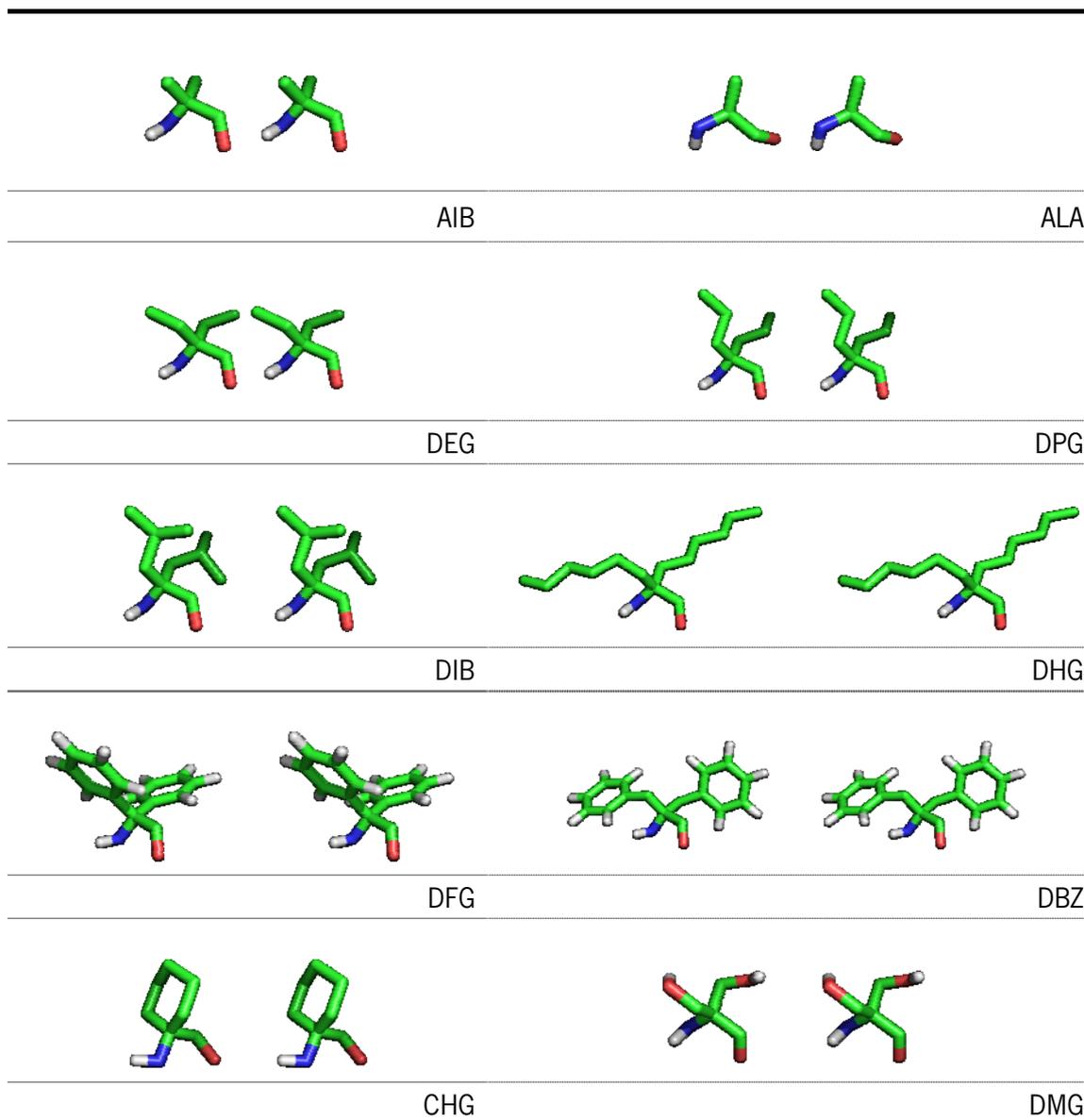
As glicinas  $\alpha,\alpha$ -dissubstituídas são uma excelente opção para o desenho de peptidomiméticos de conformação helicoidal e estrutura secundária bem definida.

As Figuras 4 e 5 apresentam as estruturas 2D e 3D do AIB e das  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob investigação neste trabalho. O aminoácido natural L-alanina (ALA) também foi utilizado na construção dos peptidomiméticos e juntamente com AIB são os nossos aminoácidos de referência nas experiências efetuadas ao longo deste trabalho. As  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas parametrizadas neste estudo são (Figuras 4 e 5): ácido  $\alpha$ -amino isobutírico ou  $\alpha$ -metil alanina (AIB),  $\alpha,\alpha$ -dietilglicina (DEG),  $\alpha,\alpha$ -dipropilglicina (DPG),  $\alpha,\alpha$ -diisobutilglicina (DIB),  $\alpha,\alpha$ -dihexilglicina (DHG),  $\alpha,\alpha$ -difenilglicina (DFG),  $\alpha,\alpha$ -dibenzilglicina (DBZ),  $\alpha,\alpha$ -ciclohexilglicina (CHG) e  $\alpha,\alpha$ -dimetanolglicina (DMG). Pretendeu-se criar um grupo heterogéneo de aminoácidos para possibilitar o desenho de peptidomiméticos com diferentes graus de anfipaticidade e comportamento. Assim, o nosso catálogo de glicinas  $\alpha,\alpha$ -dissubstituídas compreende 5

aminoácidos apolares e lineares que variam de tamanho e volume (AIB, DEG, DPG, DIB, DHG), 3 aminoácidos cíclicos, sendo que em um deles o C $\alpha$  faz parte do ciclo (DFG, DBZ e CHG), 1 aminoácido polar (DMG) e 1 aminoácido natural (ALA).



**Figura 4.** Estruturas bidimensionais das  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicinas usadas para construir os novos análogos da Alm e do Pep. (Consulte a Figura 5 para uma versão tridimensional dessas moléculas em projeção *cross-eye*).



**Figura 5.** Estruturas tridimensionais em *cross eye* das  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo. Representação em *sticks* usando o esquema de cores: verde = carbonos, azul = nitrogénios, vermelho = oxigénios e branco = hidrogénios. Apenas os hidrogénios com caráter polar estão representados. Estas e as demais estruturas foram feitas com o programa Pymol.<sup>[33]</sup>

### 1.3 Alameticina

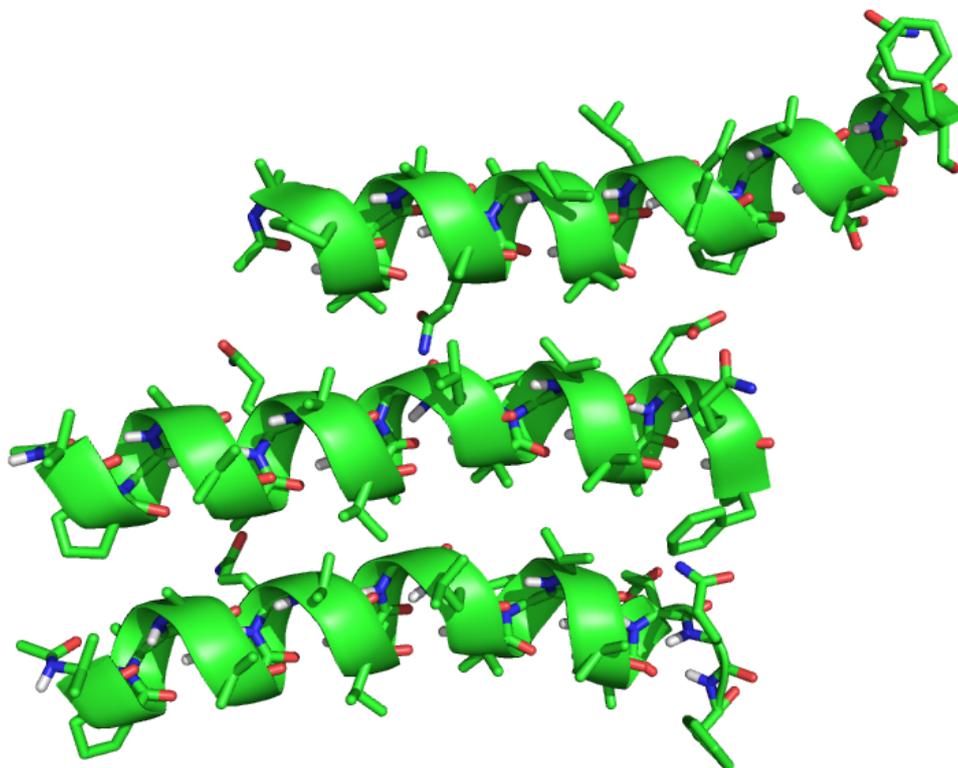
#### 1.3.1 Estrutura

A Alm é um péptido com atividade antibiótica isolado a partir do fungo *Trichoderma viride*. A estrutura da Alm foi estudada por difração de raios-X por Fox and Richards no princípio dos anos 80.<sup>[34]</sup> A forma mais comum de Alm apresenta a sequência peptídica, com 21 resíduos, representada na Figura 6, onde o terminal-N possui um resíduo acetilado e o terminal-C, um resíduo de L-fenilalaninol.<sup>[35]</sup>

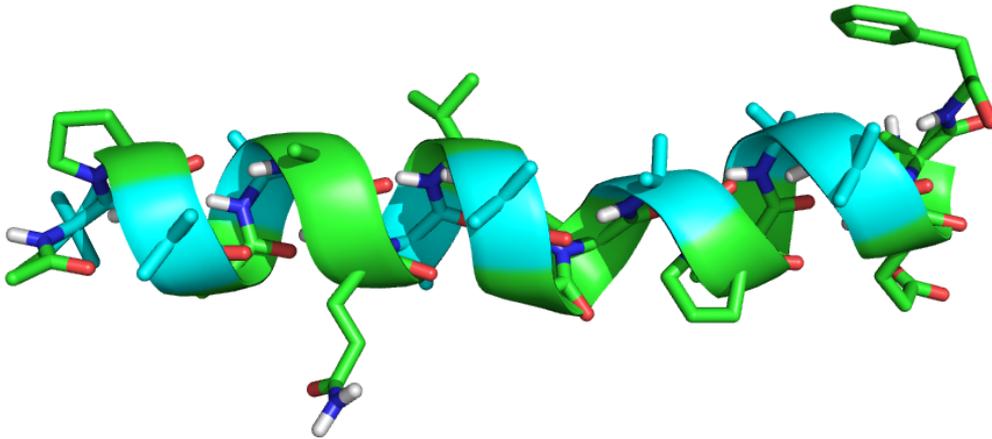
1 **2** 3 **4** 5 **6** 7 8 **9** 10 **11** 12 13 **14** 15 16 **17 18** 19 20 21  
Ac-**Aib**-Pro-**Aib**-Ala-**Aib**-Ala-Gln-**Aib**-Val-**Aib**-Gly-Leu-**Aib**-Pro-Val-**Aib**-**Aib**-Glu-Gln-Phol

**Figura 6.** Sequência peptídica da Alm, com os resíduos AIB em destaque em negrito.

A estrutura de raios-X da Alm está disponível no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), com o código 1AMT.<sup>[34]</sup> No cristal, a Alm apresenta-se empacotada na forma de três monómeros paralelos uns aos outros (Figura 7). Aparentemente, este empacotamento não tem significado fisiológico, bem como o número de monómeros e a estrutura em  $\alpha$ -hélice podem ser um artefacto do empacotamento no cristal, obtido em solvente não-aquoso, contendo metanol e acetonitrilo.<sup>[34]</sup> Existem algumas evidências de que em meio aquoso a Alm não se encontra preferencialmente em  $\alpha$ -hélice.<sup>[36]</sup> Na Figura 8, está representada a estrutura de um péptido da Alm que foi a estrutura usada nos estudos de modelação molecular deste trabalho. Os resíduos de AIB estão em destaque na cor azul-ciano na estrutura do monómero.



**Figura 7.** Estrutura experimental da Alm obtida por difração de raios-X (PDB:1AMT). A Figura mostra o empacotamento cristalino de três cadeias independentes de Alm. A estrutura secundária está ilustrada com uma fita e as ligações químicas com *sticks*. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5.



**Figura 8.** Representação da estrutura secundária de um monômero de Alm, com os resíduos de AIB em destaque na cor azul-ciano. Convenção de cores definida na Figura 5.

Nos últimos anos, estudos experimentais e computacionais têm sido feitos para detalhar a relação entre a estrutura e função deste péptido. Dempsey e Hancock<sup>[37]</sup> demonstraram experimentalmente, através de técnicas *Amide-resolved hydrogen-deuterium exchange* combinadas com RMN de alta resolução, que a Alm está apta a interagir com a superfície de uma bicamada lipídica. North et. al.<sup>[38]</sup> sintetizaram a Alm e incorporaram um <sup>15</sup>N no resíduo de ALA da posição 6, na sequência peptídica e, através de técnicas de RMN, demonstraram que este péptido é capaz de se inserir numa bicamada com uma orientação transmembranar. A orientação preferida do péptido na membrana depende de vários fatores, tais como: grau de hidratação da bicamada, temperatura, natureza dos lípidos, entre outros.<sup>[39,40,41]</sup> Acredita-se que a interação com a superfície membranar seja o primeiro passo na formação de canais, pois a Alm demonstra ser instável na presença de água, mas ocorre estabilização das hélices quando estas estão próximas de bicamadas lipídicas. Isto foi observado por Tieleman, para a Alm em contato com membranas POPC (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina).<sup>[36]</sup> A consequente inserção das hélices é conseguida por aplicação de uma diferença de voltagem através da membrana.<sup>[36]</sup> A formação de canais (poros) na membrana permite que água e iões entrem livremente para o interior das células, alterando os gradientes iónicos e o potencial elétrico membranar.

Tieleman et. al.<sup>[36]</sup> observaram em simulações de dinâmica molecular (DM) que a Alm perde a sua estrutura em  $\alpha$ -hélice em meio aquoso, mas que estabiliza-se quando na superfície de uma bicamada lipídica. Estudos experimentais corroboram estas observações, pois indicam que este péptido arranja-se preferencialmente em  $\alpha$ -hélices quando em contato com etanol num meio com micelas de dodecilsulfato de sódio. Estes fatos convergem para a constatação de que

o arranjo helicoidal seja o mais provável para a formação dos poros que atravessam a bicamada lipídica.<sup>[34,42]</sup>

Okazaki e colaboradores sintetizaram um dímero da Alm, onde os terminais-N de dois monómeros da Alm estão ligados por uma ligação dissulfeto, para demonstrar que a Alm se insere na membrana através do terminal-N e atravessa quase que completamente a bicamada lipídica.<sup>[43]</sup> Outra característica importante observada experimentalmente e computacionalmente sobre o arranjo deste péptido, é que os seus três únicos resíduos hidrofílicos estão posicionados junto ao C-terminal e quase que ancorados fora da membrana, ou seja, perfeitamente posicionados para interação com as cabeças polares dos fosfolípidos da bicamada.<sup>[44]</sup>

Tieleman et. al.<sup>[45,46]</sup> também simularam canais transmembranares formados com diferentes números de hélices de Alm, de forma a determinar qual o canal mais estável. Canais com 4 a 8 monómeros de Alm foram desenhados e inseridos em membranas de POPC previamente equilibradas, e os resultados demonstraram que o canal com 6 hélices é o arranjo mais estável e é aquele no qual a condutância está de acordo com dados experimentais. O canal de 6 monómeros também forma uma coluna de água, enquanto o canal com 4 monómeros aparenta ser muito pequeno para formar um canal estável. Os canais de Alm têm sido estudados intensivamente e, de uma forma geral, os mais estáveis podem ser compostos por 6 a 12 monómeros. Os octâmeros também demonstraram ser uma forma bastante estável e com bom nível de condutância.<sup>[34]</sup>

### **1.3.2 Função**

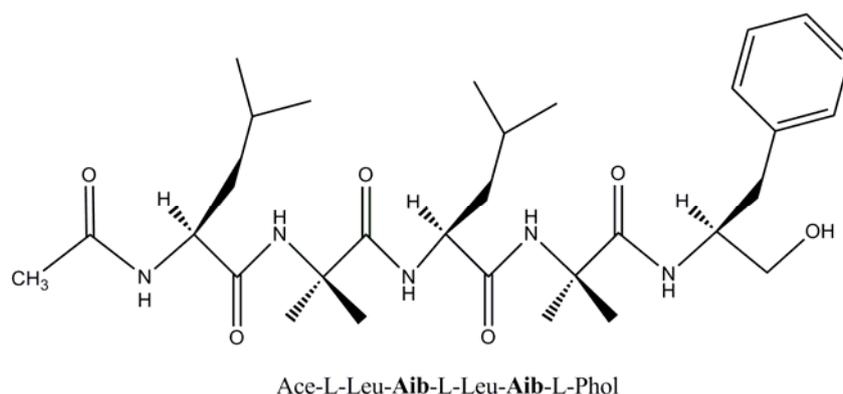
Do ponto de vista antimicrobiano, a Alm pode apresentar atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas também foram relatadas outras atividades deste peptaibol, tais como: 1) capacidade de formar canais em células adrenais bovinas e transportar íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ , 2) promover a liberação de catecolaminas das glândulas adrenais dos gatos, 3) promover a lyse de eritrócitos humanos, 4) induzir o metabolismo de células endoteliais da aorta bovina e 5) causar um aumento na respiração no fígado dos ratos.<sup>[47,48,49,50,51]</sup>

## **1.4 Peptaibolin**

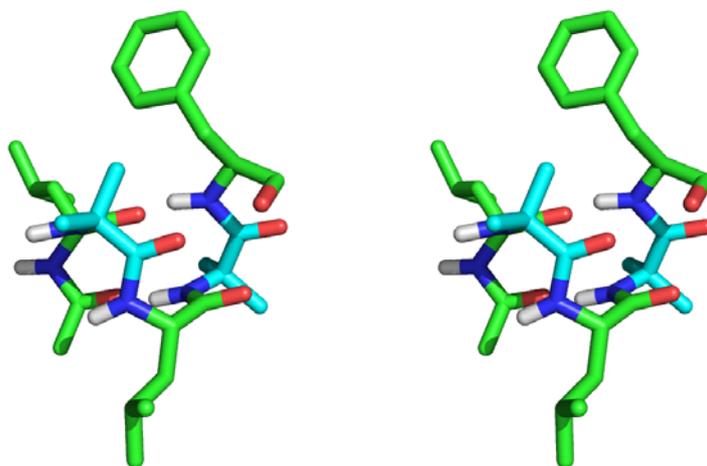
O Peptaibolin (Pep) é um peptaibol de cadeia curta encontrado em duas linhagens fúngicas: *Sepedonium sp.* HKI-0117 e *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 que foi isolado

recentemente por Hulsmann et al.<sup>[52]</sup> A sua estrutura contém apenas quatro aminoácidos em combinação com um grupo acetil no terminal-N e um grupo 1,2-amino álcool fenilalaninol no terminal-C.

O Pep exibe atividade antimicrobiana moderada contra bactérias Gram-positivas e leveduras. Pouco se conhece sobre as propriedades deste péptido, mas uma grande vantagem a seu respeito está relacionada com seu tamanho e mecanismo de síntese. Crisma et al. desenvolveram o esquema completo de síntese do Pep e a relativa facilidade em reproduzir as suas experiências possibilita o desenvolvimento de diversos análogos a serem testados como potenciais peptidomiméticos com atividade antibiótica.<sup>[53]</sup> A Figura 9 apresenta a fórmula estrutural do Pep e a respectiva sequência peptídica, e a Figura 10 a estrutura tridimensional do péptido, idealizada em  $\alpha$ -hélice, com os resíduos de AIB em destaque na cor azul-ciano. Crisma et al.<sup>[53]</sup> caracterizaram experimentalmente, por difração de raios-X, a estrutura do Pep, no entanto, esta estrutura não se encontra disponível em bases de dados públicas.



**Figura 9.** Estrutura bidimensional do Peptaibolin e respectiva sequência de resíduos.



**Figura 10.** Estrutura tridimensional em *cross eye* do Peptaibolin, com os resíduos AIB em destaque na cor azul-ciano. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5.

## 1.5 Modelação e Simulação Estrutural

A necessidade de estudar a estrutura da matéria ao nível molecular impulsionou o desenvolvimento de uma área de investigação, conhecida atualmente como Modelação Molecular. Qualquer sistema molecular pode ser entendido, em grande profundidade, se formos capazes de descrever em detalhe as suas interações moleculares e amostrar a distribuição dos seus estados conformacionais e respectivas energias. Neste sentido, a Modelação Molecular consiste num conjunto de métodos teóricos, suportados pelos fundamentos da física, que são implementados para modelar, visualizar e simular o comportamento de sistemas moleculares.

Os sistemas biológicos, como os investigados no presente trabalho, devem ser vistos numa perspectiva dinâmica e todas as propriedades dos sistemas provêm de uma amostragem dos diferentes estados conformacionais explorados por estes sistemas. Este tipo de amostragem pode ser obtido recorrendo-se a técnicas de DM e usando um campo de forças (FF) que descreva a realidade física dos nossos sistemas.

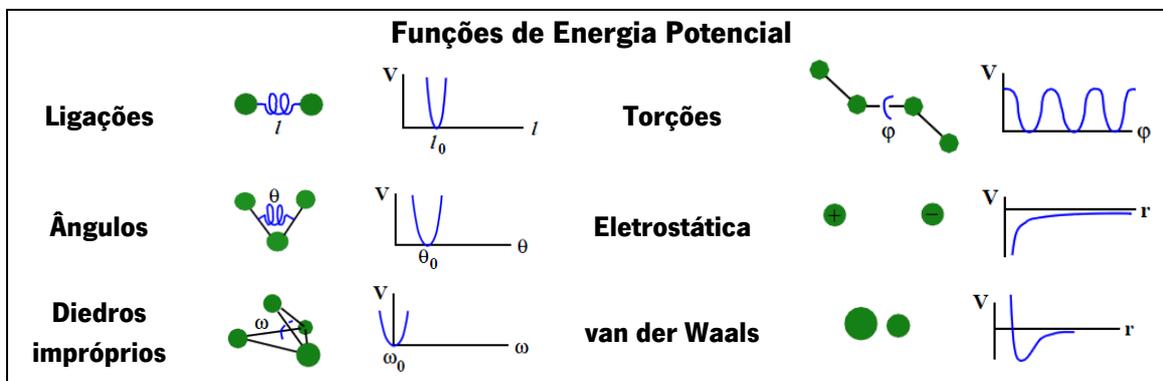
As simulações de DM são ferramentas essenciais para o entendimento das bases físicas da estrutura e da função das macromoléculas biológicas. Além disso, podem prover detalhes minuciosos relacionados com os movimentos das partículas ou investigar particularidades sobre as propriedades de um sistema modelo, de forma muito mais detalhada do que a maioria das técnicas experimentais.<sup>[54]</sup>

As simulações computacionais empregues neste estudo servem de base para explicar as propriedades das diversas estruturas e para descrever a função biológica dos novos análogos, pois prevêem a conformação detalhada e outras distribuições que determinam o comportamento dos sistemas no tempo e no espaço.<sup>[55]</sup> O FF GROMOS 54a7<sup>[56]</sup>, disponível no pacote computacional GROMACS<sup>[57]</sup>, foi o escolhido para este trabalho, uma vez que é bastante adequado na modelação de biomoléculas, como proteínas e lípidos. O GROMACS é extremamente rápido a calcular as interacções não ligantes que tipicamente dominam as simulações e, por isso, é adequado para o estudo de sistemas biológicos envolvendo grande número de partículas.

A seguir estão descritos os principais aspectos inerentes a um FF biomolecular, às simulações de DM e aos principais métodos de modelação molecular.

Um FF biomolecular é um somatório das energias de todas as interações covalentes entre os átomos, tais como, a vibração das ligações, os ângulos de ligação e as torsões próprias e impróprias dos diedros. Um FF inclui também as energias resultantes das interacções não

ligantes (van der Waals e eletrostáticas) entre diferentes moléculas e entre átomos de uma mesma molécula que estão separados por mais de três ligações covalentes.<sup>[55]</sup> As funções de energia potencial mais comuns que descrevem um FF biomolecular estão descritas na Figura 11.



**Figura 11.** Representação esquemática das funções de energia potencial ( $V$ ) mais comuns de um campo de forças de mecânica molecular. Figura adaptada de Steinbach<sup>[58]</sup>.

Nos métodos atomísticos clássicos de mecânica molecular (ex: FF GROMOS) a energia potencial de um sistema ( $V$ ), pode ser entendida como uma contribuição de vários termos:

$$V = V_{\text{ligações}} + V_{\text{ângulos}} + V_{\text{diedros}} + V_{\text{torções}} + V_{\text{eletrostático}} + V_{\text{vdW}} \quad (1.1)$$

Detalhando a equação 1.1 nos termos que a compõe, tem-se:

$$V(r^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (1.1a)$$

onde,  $V(r^N)$  refere-se a energia potencial em função da posição das  $N$  partículas do sistema e as constantes apresentadas na equação 1.1a correspondem a constantes de força e parâmetros de equilíbrio para os vários tipos de interações físicas descritas. Estas constantes estão definidas nas topologias das moléculas parametrizadas no FF G54a7 (apresenta-se em detalhes no Anexo I os parâmetros usados para as moléculas estudadas neste trabalho).

Uma topologia descreve todos os parâmetros físicos de uma molécula, tais como, tipos de átomos presentes, carga pontual, constante de força e distância/ângulo de equilíbrio das ligações entre átomos, ângulos e diedros. No presente trabalho, foi necessário definir novas topologias para as  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas, que são moléculas que podem ser entendidas como aminoácidos não naturais e, portanto, estas topologias foram definidas à semelhança dos parâmetros existentes para os aminoácidos naturais análogos (veja topologias na secção de Anexos – Anexo I).

Na equação 1.1, destaca-se que o termo  $V_{\text{eletrostático}}$  inclui um termo adicional que inclui as interações eletrostáticas a longa distância. Neste trabalho utilizou-se o método *Reaction-Field*<sup>[59]</sup> que assume a existência de um meio contínuo para além de um determinado raio de corte, tipicamente a 1.4 nm, descrito por uma constante dielétrica correspondente ao solvente usado nas simulações.

Na DM, as interações entre os átomos do sistema são descritas de acordo com as teorias da mecânica clássica Newtoniana.<sup>[54]</sup> De acordo com a 2ª Lei de Newton:

$$F(i, t_j) = m(i) \times a(i, t_j) \quad (1.2)$$

Na equação (1.2),  $F(i, t_j)$  corresponde a força que atua na partícula  $i$  no momento  $t_j$ ,  $a(i, t_j)$  é a correspondente aceleração e  $m(i)$  é a massa da partícula  $i$ . Desta equação, deriva a equação de movimento de Newton, para  $N$  partículas de um sistema:

$$\frac{\partial^2 r(i, t_j)}{\partial t_j^2} = \frac{F(i, t_j)}{m(i)} \quad (1.3)$$

$$i = 1, \dots, N$$

onde,  $r(i, t_j)$  é a posição da partícula  $i$  no momento  $t_j$ . A força  $F(i, t_j)$  das equações 1.2 e 1.3 pode ser obtida a partir do gradiente da energia potencial obtido pelo FF (1.1) para cada partícula  $i$  no momento  $t_j$ .

$$F(i, t_j) = -\nabla V_{\{r(i, t_j)\}} \quad (1.4)$$

$$e, \quad \nabla V_{\{r(i, t_j)\}} = \frac{\partial V}{\partial r(i, t_j)} \quad (1.5)$$

De um ponto de vista prático, as simulações de DM envolvem uma série de técnicas e procedimentos adicionais necessários para gerar a amostragem pretendida. O protocolo associado a uma simulação de DM pode ser resumido da seguinte maneira:

- (1) Condições iniciais do sistema e definição da estrutura de partida. As coordenadas espaciais da estrutura de partida das biomoléculas é geralmente obtida experimentalmente (por exemplo, através de técnicas de cristalografia de raios-X ou RMN) ou por técnicas teóricas de modelação por homologia. É adequado inserir a estrutura de partida num solvente, como água, etanol ou uma membrana, e modelar condições periódicas de fronteira, onde a célula central está rodeada por réplicas de si mesma.<sup>[55]</sup> Estas estratégias são feitas para minimizar o efeito de superfície que ocorreria se o sistema interagisse com o vazio, além disso, a utilização de um solvente explícito introduz um elevado grau de realismo nas simulações das biomoléculas.<sup>[55]</sup>
- (2) Minimização da energia do sistema. Nesta etapa a geometria do sistema é otimizada, de forma a obter uma estrutura que corresponda a um estado de menor energia. Geralmente, as técnicas de minimização de energia permite localizar o mínimo de energia local em relação ao ponto de partida. Um dos algoritmos utilizados para a minimização da energia é o *Steepest Descent* (SD). O SD é um método muito usado, pois é de fácil implementação e muito eficaz para estruturas que estão muito distantes de um mínimo de energia.<sup>[60,61]</sup> Este algoritmo utiliza os valores de força e energia potencial computados para definir as novas posições dos átomos:

$$r_{i,n+1} = r_{i,n} + \frac{F_{i,n}}{\max(|F_{i,n}|)} h_n \quad (1.6)$$

$$i = 1, \dots, N$$

onde,  $F_{i,n}$  é a força resultante no átomo  $i$  e é obtida de acordo com a equação (1.4).

$\max(|F_{i,n}|)$  significa o máximo valor absoluto que os componentes de força podem assumir,  $h_n$  é um parâmetro escalar ajustado para acelerar a minimização e  $r_{i,n+1}$

corresponde a nova posição do átomo  $i$ . Os valores de  $h_n$  variam de acordo com as forças e energias computadas para as novas posições, ou seja:

$$h_{n+1} = \begin{cases} 1, 2h_n \rightarrow V_{n+1} \leq V_n \\ 0, 2h_n \rightarrow V_{n+1} \geq V_n \end{cases} \quad (1.7)$$

Se  $V_{n+1} \leq V_n$  as novas posição são aceites. O algoritmo pára quando atinge o número de passos determinado ou respeitando um critério de convergência (valor próximo de zero para norma do gradiente do potencial).

(3) Inicialização: Atribuição de velocidades iniciais para os átomos do sistema e integração das equações de movimento. A velocidade inicial de cada átomo não é conhecida, por isso, é necessário gerar as velocidades iniciais de acordo com uma dada temperatura. Isto faz-se através da distribuição de Maxwell-Boltzmann, que atribui velocidades iniciais  $v_i$  para cada átomo do sistema:

$$p(v_i) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi kT}} \exp\left(-\frac{m_i v_i^2}{2kT}\right) \quad (1.8)$$

$$i = 1, \dots, 3N$$

onde,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta no momento inicial e  $m_i$  é a massa do átomo. Uma vez que as velocidades iniciais estão definidas, bem como a energia potencial do sistema, começa-se a integrar as equações de movimento de Newton (1.3) para todas as partículas do sistema, que determinará uma trajetória para cada átomo. A integração do movimento das partículas pode ser conseguido usando diversos algoritmos. No presente trabalho utilizou-se o algoritmo *Leap-Frog* que é uma modificação do algoritmo de *Verlet*. Este algoritmo é menos susceptível a erros numéricos e é capaz de acoplar o sistema a um banho térmico através de correções nas velocidades.<sup>[61]</sup>

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) \quad (1.9)$$

$$v(t + \frac{1}{2} \delta t) = v(t - \frac{1}{2} \delta t) + \delta t a(t) \quad (1.10)$$

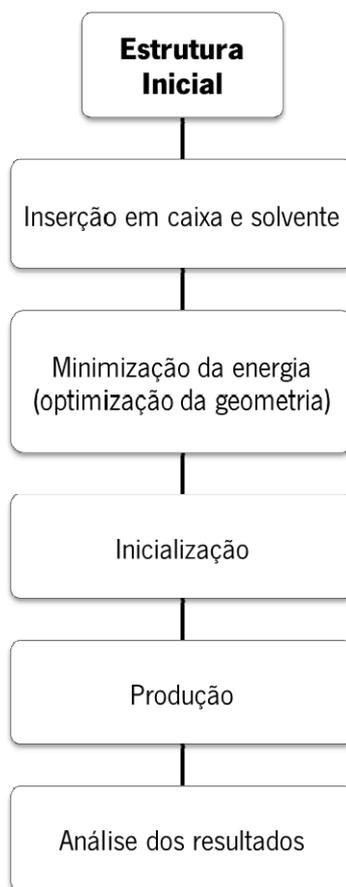
onde,  $r(t)$  é a posição de uma partícula  $i$  no momento  $t$ ,  $r(t + \delta t)$  corresponde à nova posição assumida pelo átomo  $i$  no momento  $t + \delta t$ , e  $v$  e  $a$  são as correspondentes velocidade e aceleração. Neste algoritmo, a velocidade é incluída na determinação das novas posições e há maior precisão numérica devido ao fato de que não é necessário usar o termo  $\delta t^2$  existente no algoritmo de *Verlet*.

A dinâmica de equilibração é comumente feita em três etapas. Nas duas primeiras etapas utilizam-se técnicas de *position restraints* para impor restrições às posições dos átomos dos sistemas sob estudo. Na primeira etapa impõem-se restrições aos átomos de todo o péptido, enquanto na segunda as restrições são impostas apenas aos átomos da cadeia principal. Na terceira etapa o sistema fica livre para que os átomos dos péptidos possam interagir com as moléculas do meio e acomodarem-se melhor nas camadas de solvatação.

Outros algoritmos importantes utilizados a partir desta etapa são os algoritmos de Berendsen<sup>[62]</sup> para o controle da temperatura e pressão, e o algoritmo *LINCS*.<sup>[63,64]</sup> Os algoritmos de Berendsen garantem que a biomolécula e o solvente estejam sob a mesma temperatura e pressão no decorrer da simulação, e o algoritmo LINCS, é um método utilizado para manter as ligações e ângulos constrangidos e eliminar os modos vibracionais de maior frequência e, assim, permitir um tempo de integração maior.

- (4) Produção: Simulação de DM sem constrangimentos. Após a etapa de equilibração, é feita a simulação de DM durante o tempo necessário para garantir uma boa amostragem dos estados conformacionais explorados pelo sistema. O tempo de simulação deverá ser superior ao tempo de relaxação das propriedades que pretende-se analisar. Durante a simulação de DM são registadas as posições dos átomos ao longo do tempo sob a forma de trajetórias e, opcionalmente, podem ser registadas as velocidades e forças. As trajetórias obtidas são posteriormente analisadas de forma a calcular uma grande variedade de propriedades estruturais úteis, tais como: desvio em relação a uma estrutura inicial, número de ligações de hidrogénio, área exposta ao solvente, tipo de estrutura secundária, entre outras propriedades.

A Figura 12 seguinte, resume o protocolo associado a uma simulação de DM.



**Figura 12.** Esquema ilustrativo das etapas associadas a um protocolo padrão de experiências de simulação de DM.

Outras experiências implementadas neste estudo dizem respeito ao cálculo de energia livre ( $\Delta G$ ) relativo ao processo de substituição dos resíduos de AIB por novas  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicinas na Alm inserida em membrana, recorrendo-se a técnicas de Integração Termodinâmica (IT).

As experiências de IT realizadas no presente trabalho empregaram uma série de simulações, nas quais um parâmetro denominado  $\lambda$  varia discretamente de 0 a 1, de forma a transformar suavemente os resíduos de AIB por outros aminoácidos e calcular a energia livre de transformação do estado contendo o aminoácido nativo para outro estado contendo o novo aminoácido. A energia livre deste processo é calculado da seguinte forma:

$$\Delta G = \sum_{\lambda} \Delta G_{\lambda} = RT \sum_{\lambda} \ln \left\langle e^{\frac{U_{\lambda} - U_{\lambda+\Delta\lambda}}{RT}} \right\rangle \quad (1.11)$$

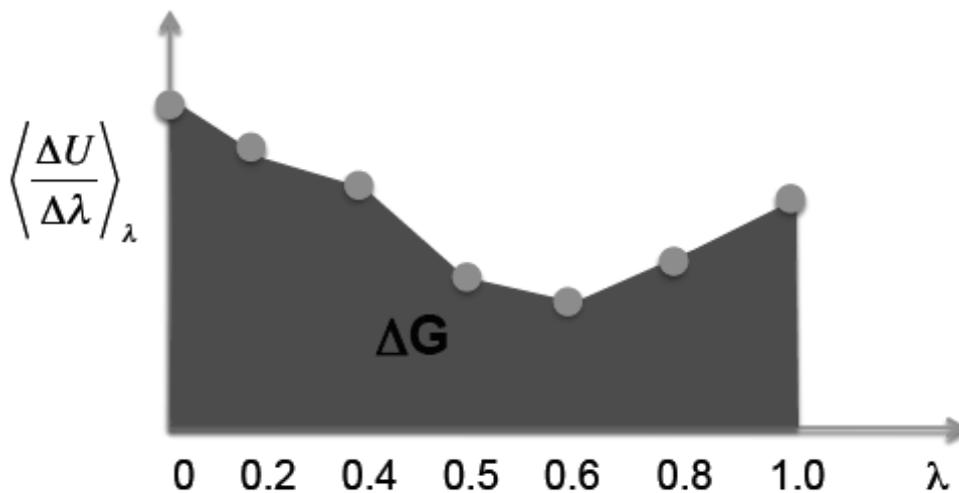
Na equação 1.11 o valor de  $\Delta G$  é determinado a partir do somatório de  $\Delta G_{\lambda}$  a valores discretos de  $\lambda$ . Note que, na prática, estas transformações não são quimicamente possíveis, entretanto, como a energia livre é uma função de estado, apenas importam definir claramente os

estados inicial e final do sistema. Portanto, para variar o  $\lambda$  de 0 a 1, foram feitas 21 simulações de 10ns, espaçadas de 0.05. Assim, para cada  $\lambda$  foi calculado o  $\Delta G_\lambda$  a partir da média da derivada do potencial em relação à amplitude da perturbação  $\Delta\lambda$  para cada um dos  $\lambda$  empregues:

$$\Delta G_\lambda = \left\langle \frac{\Delta U}{\Delta\lambda} \right\rangle_\lambda \quad (1.12)$$

Com estes valores é possível traçar um gráfico como o da Figura 13 e, a partir dele, utilizar a regra do trapézio para integrar a área abaixo do gráfico, obtendo-se assim, a energia livre para aquela transformação.

$$\int_0^1 \left\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \right\rangle d\lambda \approx \sum_{\lambda=0}^1 \left\langle \frac{\Delta U}{\Delta\lambda} \right\rangle_\lambda \Delta\lambda \quad (1.13)$$



**Figura 13.** Exemplo ilustrativo de um gráfico gerado a partir de médias obtidas numa experiência de IT.



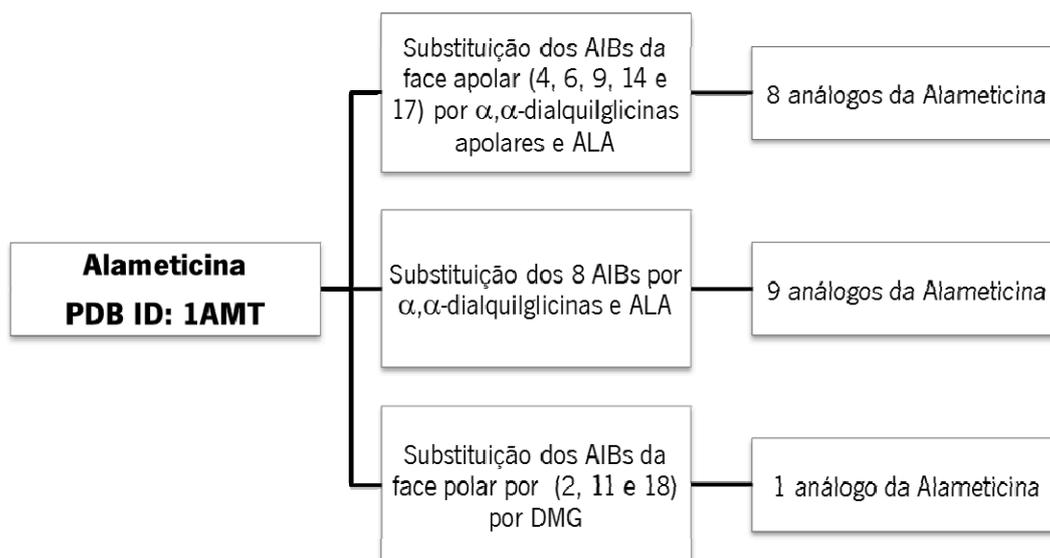
## **2 Materiais e Métodos**

## 2.1 Parametrização de aminoácidos não-naturais

O desenvolvimento de análogos da Alm e do Pep teve início a partir da construção e parametrização de novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas. Estes novos aminoácidos não naturais foram desenhados com o programa Pymol<sup>[33]</sup> e, em seguida, foram criadas topologias baseadas em parâmetros existentes para os aminoácidos naturais, já catalogados no campo de força GROMOS 54a7. Uma topologia descreve todos os parâmetros físicos de uma molécula, tais como, termos Lennard-Jones, cargas parciais, constantes de força e valores de equilíbrio para as ligações entre átomos, ângulos e diedros. Para a validação dos parâmetros propostos, estes novos aminoácidos foram submetidos a cálculos de minimização de energia e a simulações de dinâmica molecular durante 100ps em caixa dodecaédrica com água. As tabelas que apresentam as componentes ligantes e não-ligantes de cada aminoácido não-natural sob estudo, baseadas nos códigos do FF G54a7 são apresentadas na secção de Anexos – Anexo I.

## 2.2 Construção de Análogos da Alameticona

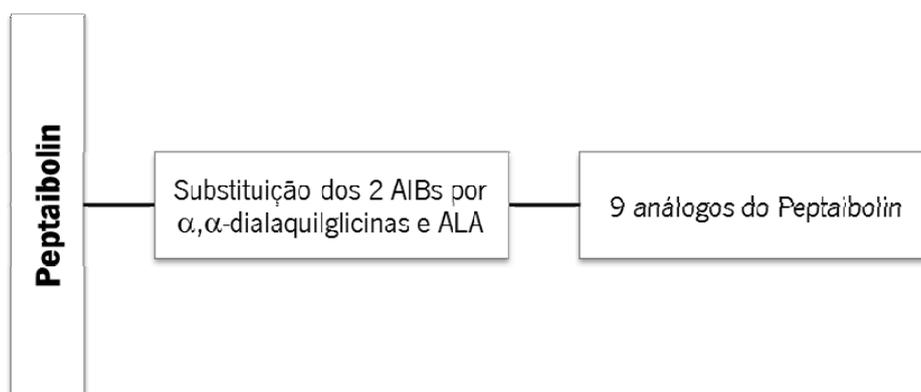
A Alm é constituída por 21 resíduos, entre os quais estão 8 moléculas de AIB, nas posições 2, 4, 6, 9, 11, 14, 17 e 18 (Figuras 6 e 8). Esta organização possibilita a modelação de inúmeros análogos, por substituição dos AIBs por todas as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas. Contudo, no presente estudo, modelou-se apenas 3 tipos de análogos da Alameticona (Figura 14). O primeiro grupo de análogos resulta da completa substituição dos 8 AIBs por novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas ou ALA. O objetivo neste caso, é, investigar qual a  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina com maior capacidade de impor ao péptido uma estrutura mais próxima da forma em  $\alpha$ -hélice e compará-los com a Alm nativa. Outras duas categorias foram geradas a partir da substituição dos AIBs de apenas uma das faces do monómero, ou seja, substituíram-se os AIBs das posições 4, 6, 9, 14 e 17 (face apolar), por  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas apolares ou ALA e os AIBs das posições 2, 11 e 18 (face polar) por uma  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina polar, o DMG. O objetivo da modelação desses dois últimos grupos de péptidos é variar a sua polaridade/anfipaticidade em relação a Alm nativa, mas sem gerar péptidos tão fortemente apolares como no primeiro caso e, assim, comprometer o carácter anfipático do péptido. Um resumo das estratégias utilizadas para a construção dos análogos da Alm pode ser visto na Figura 14.



**Figura 14.** Esquema da modelação de análogos construídos a partir da Alm nativa.

### 2.3 Construção de Análogos do Peptaibolin

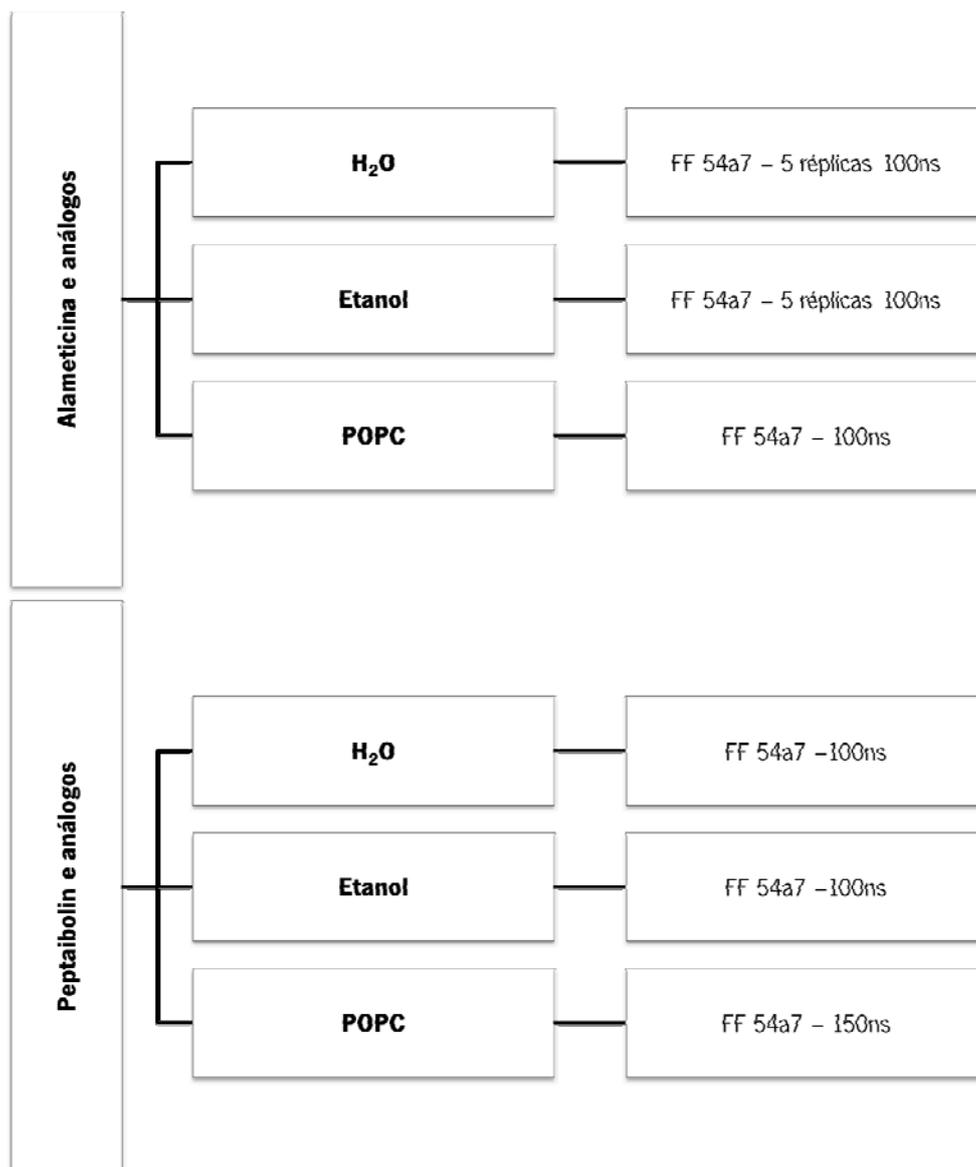
A construção de análogos do Pep teve início a partir da modelação do Pep original contendo AIB. Não há estruturas experimentais disponíveis para este peptaibol, portanto, o desenho da sua estrutura baseou-se na sequência peptídica sintetizada e caracterizada por Crisma et al.<sup>[53]</sup> É importante salientar que modelou-se uma estrutura em  $\alpha$ -hélice, uma vez que esses autores conseguiram caracterizar ligações de hidrogénio típicas deste tipo de arranjo. A Figura 15 apresenta o esquema de modelação dos análogos do Pep.



**Figura 15.** Esquema dos análogos construídos a partir do Pep nativo.

## 2.4 Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de DM foram realizadas utilizando o programa GROMACS (versão 4.0.5) e o FF G54a7. As experiências realizadas com os sistemas sob estudo estão resumidamente descritas nos organogramas da Figura 16.



**Figura 16.** Esquemas das experiências de simulação de DM realizadas para a Alm, o Pep e seus respectivos análogos, nos diferentes meios estudados: água, etanol e POPC.

Nas experiências descritas na Figura 16, considerou-se uma temperatura fisiológica de 310K e pressão de 1 atm. Em água, a Alm, o Pep e seus respectivos análogos foram simulados em caixas dodecaédricas construídas considerando-se uma camada de solvatação de, no

mínimo, 1nm entre o péptido e as paredes da caixa e usando o modelo de água SPC (*Simple Point Charge*)<sup>[65]</sup>. Deste modo, os sistemas baseados na Alm apresentam cerca de 3300-3500 moléculas de água, enquanto os sistemas baseados no Pep entre 800-1000 moléculas de água.

Em etanol, os sistemas sob estudo foram simulados em caixas cúbicas e o modelo de etanol usado foi importado do FF G53a6.<sup>[66]</sup> Para a Alm e análogos, as caixas apresentam dimensão 70x70x70 (nm) e contém aproximadamente 3300 moléculas de etanol. Para os sistemas baseados no Pep foram usadas caixas de dimensão 40x40x40 (nm) que contém cerca de 600 moléculas de etanol. É importante salientar que, em ambos os meios, os sistemas baseados na Alm foram neutralizados com a adição de dois iões Na<sup>+</sup>.

Para o tratamento das interações a longa distância, usou-se o método *Reaction Field*, com *cut-off* a 1.4 nm e constantes dielétricas de  $\epsilon = 54$  para a água e  $\epsilon = 24,3$  para o etanol. A constante dielétrica da água foi escolhida em função da temperatura e modelo de água usados em estudos de Smith e van Gunsteren,<sup>[67]</sup> e a constante dielétrica do etanol é um valor estimado para a temperatura de 310K.<sup>[68]</sup> As interações de van der Waals também foram calculadas com um raio de *cut-off* de 1.4nm. Outros parâmetros escolhidos dizem respeito ao uso do algoritmo LINCS para constranger as ligações químicas dos péptidos.<sup>[64]</sup> Para o caso específico da água foi usado o algoritmo SETTLE.<sup>[60]</sup> Além disso, os algoritmos de Berendsen para a temperatura e pressão foram usados para controlar temperatura a 310K e pressão de 1 atm.<sup>[62]</sup>

Nas experiências em água e etanol, foram realizadas três etapas de minimização de energia, salientando-se que nas duas primeiras foram aplicados *position restraints* (com constante de força em 1000 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>) na proteína e na cadeia principal, respectivamente, e na última não foram usados *position restraints*. De forma, análoga, seguiram-se duas etapas de inicialização de 100ps, com *position restraints* nos mesmos grupos de átomos. Por fim, foram realizadas as simulações de DM, para os diferentes sistemas, nos diferentes meios, conforme está representado na Figura 16. Nestas experiências a simulação foi feita em 50000000 passos com intervalo de integração de 0.002ps, o que resulta numa simulação de 100000ps (100ns).

As experiências em membrana utilizaram uma membrana POPC previamente equilibrada com água, disponibilizada por Peter Tieleman.<sup>[69]</sup> Esta membrana apresenta em sua constituição 128 lípidos e 2460 moléculas de água.

Nos sistemas baseados no Pep, posicionaram-se os péptidos entre as moléculas do solvente e a superfície da membrana, sendo necessário remover algumas moléculas de água que colidiam com os péptidos e não alterou-se nada na bicamada lipídica.

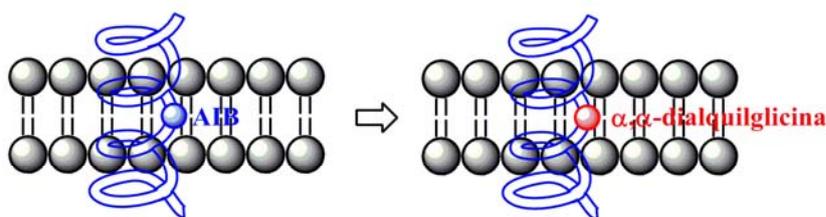
Realizaram-se dois tipos de experiências com a Alm em membrana. Primeiramente inseriu-se manualmente a Alm nativa e seus análogos em membranas POPC. Foi necessário remover três fosfolípidos de cada camada, de forma a minimizar os choques com os péptidos e obteve-se 10 sistemas diferentes que foram submetidos a simulações de DM durante 100ns. Isto foi feito para avaliar o comportamento estrutural e dinâmico destes péptidos, quando inseridos em membrana. Para avaliar o custo energético de substituição dos AIBs da Alm por novos aminoácido não naturais, foram feitas experiências de Integração Termodinâmica (IT), onde cada um dos 8 AIBs foi “mutado” numa das 8 novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas ou em ALA. Dessas experiências, resultaram 72 novos sistemas e foi possível calcular uma energia livre de inserção das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas, avaliando-se termodinamicamente os aminoácidos mais favoráveis a preencherem determinada posição, antes ocupada por AIB (posições 2, 4, 6, 9, 11, 14, 17 e 18).

Outros aspectos inerentes às simulações em POPC são: o primeiro tipo de experiência em POPC também foi feito com intervalo de integração de 0.002ps, resultando numa simulação de 100ns. E, nas experiências de IT, cada uma das 21 simulações necessárias para variar o  $\lambda$  de 0 a 1, foram feitas com intervalo de integração de 0.002ps, resultando em simulações de 10ns cada. Neste meio, também utilizou-se o método *Reaction Field* para o tratamento das interações à longa distância, bem como os algoritmos de Berendsen como controladores de temperatura e pressão. Além disso, utilizou-se o algoritmo LINCS para o constrangimento das ligações dos péptidos e lípidos. Também considerou-se temperatura fisiológica de 310K e pressão de 1 atm.

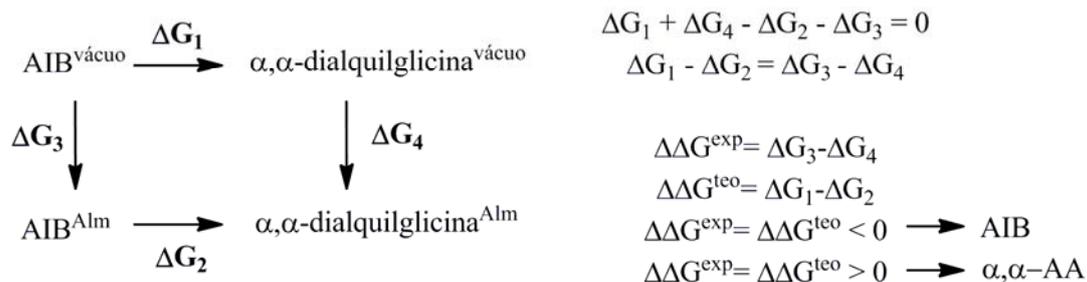
No caso da Alm e análogos em membrana, seguiu-se o mesmo protocolo implementado para estes péptidos em água e etanol, ou seja, realizaram-se três etapas de minimização de energia, aplicando-se *position restraints* nas duas primeiras (com constante de força em  $1000\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$ ) na proteína e na cadeia principal, respectivamente, e na última não foram usados *position restraints*. De forma, análoga, seguiram-se duas etapas de inicialização de 100ps, com *position restraints* nos mesmos grupos de átomos. Por fim, como já referido, realizou-se a DM durante 100ns.

A Figura 17 ilustra como foram realizadas as experiências de IT e como foi calculada a energia livre de inserção.

(A)



(B)



**Figura 17.** Esquema ilustrativo da (A) troca de um res\u00edduo de AIB por uma  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicina no p\u00e9ptido Alm inserido na membrana e (B) ciclo termodin\u00e2mico empregue para avaliar a energia livre associada ao processo de troca de um AIB por uma nova  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicina.

No ciclo termodin\u00e2mico apresentado na Figura 17, O  $\Delta G_1$  corresponde \u00e0 energia livre associada ao processo de transforma\u00e7\u00e3o do AIB, em v\u00e1cuo, por uma nova  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicina. Enquanto o  $\Delta G_2$  refere-se \u00e0 energia livre do processo de transforma\u00e7\u00e3o do AIB inserido na Alm por uma  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicina. O  $\Delta G_3$  e o  $\Delta G_4$  s\u00f3 podem ser determinados experimentalmente, e na verdade a rela\u00e7\u00e3o entre essas energias \u00e9 o que pretende-se determinar. Alternativamente, \u00e9 relativamente f\u00e1cil determinar por simula\u00e7\u00e3o a rela\u00e7\u00e3o entre o  $\Delta G_1$  e o  $\Delta G_2$ . Assim sendo, se  $\Delta \Delta G^{\text{teo}} < 0$ , \u00e9 mais favor\u00e1vel termodinamicamente manter o AIB nesta posi\u00e7\u00e3o, e se  $\Delta \Delta G^{\text{teo}} > 0$  \u00e9 prefer\u00edvel a incorpora\u00e7\u00e3o de uma nova  $\alpha, \alpha$ -dialquilglicina.

## 2.5 An\u00e1lises

A an\u00e1lise do comportamento conformacional dos sistemas sob estudo foi realizada atrav\u00e9s de programas dispon\u00edveis no GROMACS 4.0.5. Neste sentido, an\u00e1lises RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), SS (*Secondary Structure Analysis*), SAS (*Solvent Accessible Surface*), Ramachandran e PCA (*Principal Component Analysis*) foram realizadas usando este pacote de software de modela\u00e7\u00e3o.

As análises RMSD medem o quanto as configurações diferem de uma configuração de referência (tipicamente a estrutura experimental do péptido usada para inicializar as simulações).<sup>[60]</sup> No caso da Alm, calculou-se uma média dos desvios sofridos por cada réplica, de forma a obter uma média final dos RMSDs e um erro associado. A estratégia de replicar o sistema realizando 5 simulações de 100ns em alternativa a uma só simulação de 500ns, garante uma amostragem mais representativa e acurada do estados conformacionais possíveis em vez de uma única simulação. As demais análises também consideraram uma média dos valores obtidos para cada réplica, no caso dos sistemas baseados em Alm. É importante salientar que, para os sistemas baseados na Alm, a estrutura de referência usada foi a estrutura de raios-X, enquanto no caso dos análogos do Pep, a estrutura de referência usada foi a do Pep modelado em  $\alpha$ -hélice.

A análise RMSF avalia a amplitude do deslocamento dos resíduos ou de outra selecção de átomos, como os C $\alpha$ , por exemplo, em relação a uma estrutura média.<sup>[60]</sup> Assim, a flexibilidade e mobilidade de cada péptido pode ser facilmente avaliada para inferir o grau de amplitude do seu movimento em torno de uma posição média.

A análise SS permite avaliar a manutenção da estrutura secundária do péptido, ou seja, quantifica o número de resíduos em cada tipo possível de estrutura secundária ( $\alpha$ -hélices, folhas beta, hélices  $3_{10}$ , entre outras) ao longo do tempo.<sup>[60]</sup> Esta medida fornece um valor da propensão que o péptido tem em estar numa determinada conformação bem definida. No presente estudo, pretendeu-se avaliar quais os sistemas que se mantêm predominantemente em  $\alpha$ -hélice ao longo da simulação. Adicionalmente, é possível aliar estes resultados as medidas obtidas com o estudo do espaço de Ramachandran dos novos resíduos. A distribuição dos diedros Phi ( $\phi$ ) e Psi ( $\psi$ ) locais de cada resíduo permitindo avaliar localmente a preferência que cada resíduo tem para se encontrar nas zonas conhecidas do espaço de Ramachandran e determinar a sua propensão para induzirem estruturas secundárias específicas.

A análise SAS calcula as áreas, hidrofóbica e hidrofílica, e a área total exposta ao solvente.<sup>[60]</sup> Esta medida pode revelar comportamentos estruturais dos péptidos em diferentes meios, ou seja, sua capacidade de reorganização em meios com diferentes polaridades, efeito hidrofóbico de alguns sistemas e até mesmo, o constrangimento da estrutura em uma determinada forma, devido aos resíduos que constituem o péptido.

Por fim, a análise PCA permite projectar no espaço multidimensional a distribuição de configurações que descrevem a maior variabilidade estrutural do péptido.<sup>[60]</sup> Nos espaços 2D e

3D, pontos próximos são sinónimos de configurações possivelmente semelhantes que podem ser agrupadas em *clusters*. Além disso, pontos dispersos no espaço indicam estruturas que exploram maior número de conformações e arranjos muito distintos.

Nos sistemas baseados na Alm e nos solventes água e etanol, todas as medidas calculadas referem-se à média das cinco réplicas modeladas, com respectivo desvio padrão. Enquanto nos sistemas baseados no Pep, também calcularam-se médias das medidas realizadas, mas estas referem-se apenas à média da amostragem do péptido sob estudo, uma vez que não foram modeladas réplicas para este tipo de sistema.

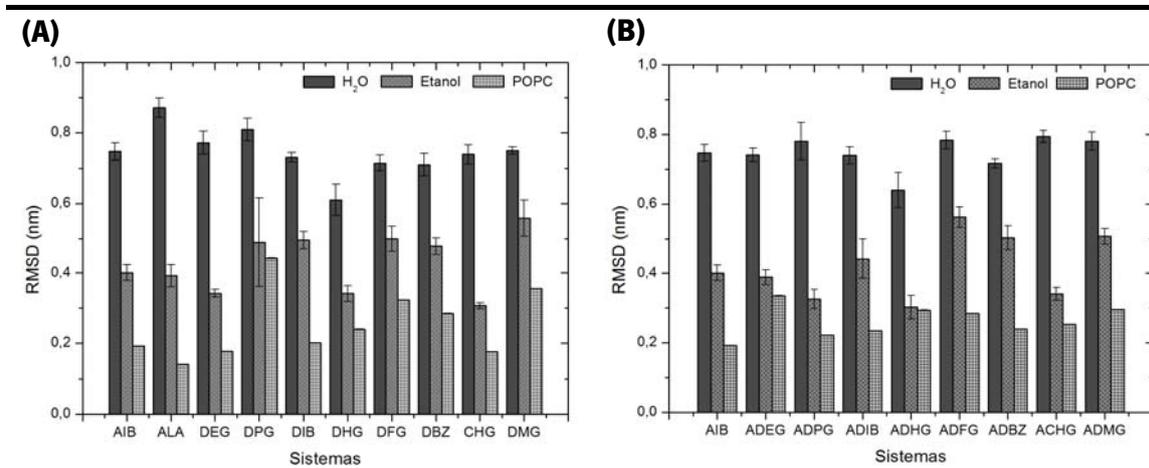


## **3 Alameticina e Análogos**

### 3.1 Estrutura em água, etanol e POPC

A Alm e os análogos propostos foram submetidos a uma sequência de análises que, quando juntas, esclarecem aspectos estruturais e conformacionais importantes sobre o constrangimento da estrutura dos análogos da Alm, obtidos por incorporação das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas na sua estrutura. Os resultados seguintes estão descritos de acordo com a seguinte nomenclatura: os péptidos contendo AIB ou uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina nas oito posições antes ocupadas por AIB (substituição nas duas faces), estão denominados com a sigla do novo aminoácido sob estudo (ALA, DEG, DPG, DIB, DHG, DFG, DBZ, CHG e DMG – veja Figuras 4 e 14) enquanto os péptidos substituídos numa só face, apresentam a letra A no início da sigla (ADEG, ADPG, ADIB, ADHG, ADFG, ADBZ, ACHG e ADMG).

O primeiro resultado a ser discutido refere-se às médias dos RMSDs dos  $C\alpha$  de cada péptido em relação à estrutura experimental em  $\alpha$ -hélice da Alm, calculadas a partir das cinco réplicas de cada novo péptido. Estas medidas de RMSD podem ser interpretadas como uma magnitude do desvio de cada péptido relativamente a um modelo em  $\alpha$ -hélice.



**Figura 18.** Médias dos RMSDs dos  $C\alpha$  em relação a estrutura experimental da Alm em  $\alpha$ -hélice, nos diferentes meios. Em (A) péptidos substituídos nas duas faces e em (B), péptidos substituídos numa só face. *Fitting* dos  $C\alpha$  relativamente à estrutura inicial de raios-X. O desvio padrão das médias das várias réplicas dos péptidos em água e etanol estão indicados no gráfico. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido.

Na Figura 18A observa-se um elevado desvio do péptido contendo ALA, em água. Este resultado é um primeiro indicio que o uso de um aminoácido natural na Alm, não deve favorecer a pré-organização em  $\alpha$ -hélice. Outra constatação importante é que a forma nativa da Alm perde uma parte substancial da sua estrutura helicoidal em água, tal como foi observado por Tieleman e colaboradores.<sup>[36]</sup> Também em água, verifica-se que o aminoácido dissustituído DHG promove uma configuração mais próxima da estrutura de referência em  $\alpha$ -hélice que o AIB, indicando que a cadeia lateral volumosa e extensa causa um impedimento estérico que favorece a estruturação em  $\alpha$ -hélice. Os aminoácidos DIB, DFG, DBZ, CHG e DMG demonstram estar pouco estruturados, de forma equivalente à Alm.

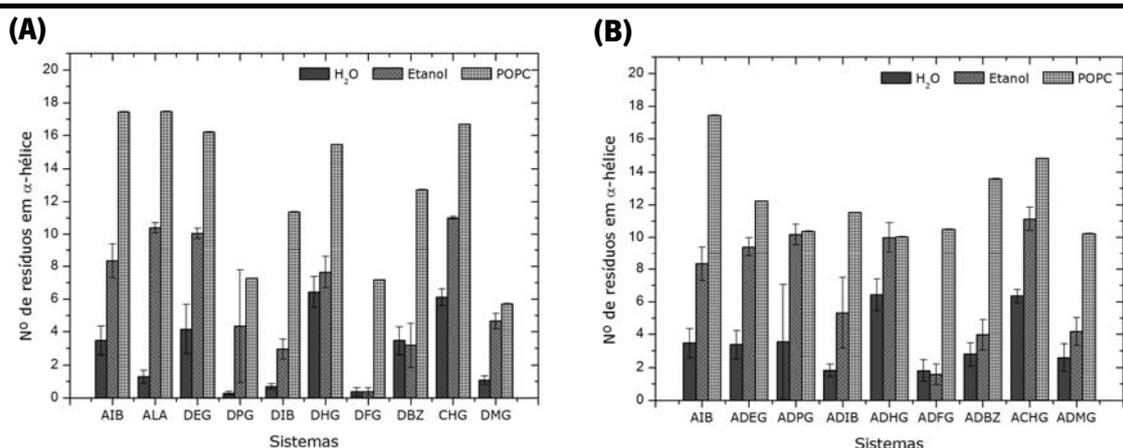
O único resíduo polar testado, o DMG, é desestabilizador em todos os meios. Enquanto o resíduo cíclico, CHG, apresenta baixos desvios em etanol e em membrana.

Todos os resíduos promovem menores desvio em etanol do que em água, indicando que neste meio mais apolar os aminoácidos não naturais tendem a formas estruturas mais helicoidais e estáveis, no entanto nem sempre o etanol mimetiza bem um meio apolar como uma bicamada lipídica genérica, pois para os resíduos AIB, ALA, DIB, DFG e DBZ, observa-se grande disparidade de valores ao compararmos os desvios em etanol e POPC.

Em POPC (Figura 18A), observa-se que os resíduos menos volumosos como, AIB, ALA, DEG e CHG impõem menores desvios aos seus péptidos e isto pode estar relacionado ao fato de que estes resíduos organizam-se mais facilmente entre as cadeias fosfolipídicas da membrana e, portanto, não exigem grande rearranjo estrutural aos péptidos nos quais estão inseridos.

Do ponto de vista estrutural, a substituição em uma face (Figura 18B), não parece conferir grande vantagem em relação aos péptidos substituídos nas duas faces. No entanto, há que referir que, em membrana, os aminoácidos DPG, DFG, DBZ e DMG, substituídos numa só face, parecem promover estruturas mais nativas que os péptidos substituídos com estes resíduos nas duas faces.

Outro resultado estrutural importante diz respeito ao número de resíduos que permanecem em  $\alpha$ -hélice durante a simulação. A Figura 19 apresenta as médias obtidas das 5 réplicas estudadas para cada péptido, em água, etanol e POPC.



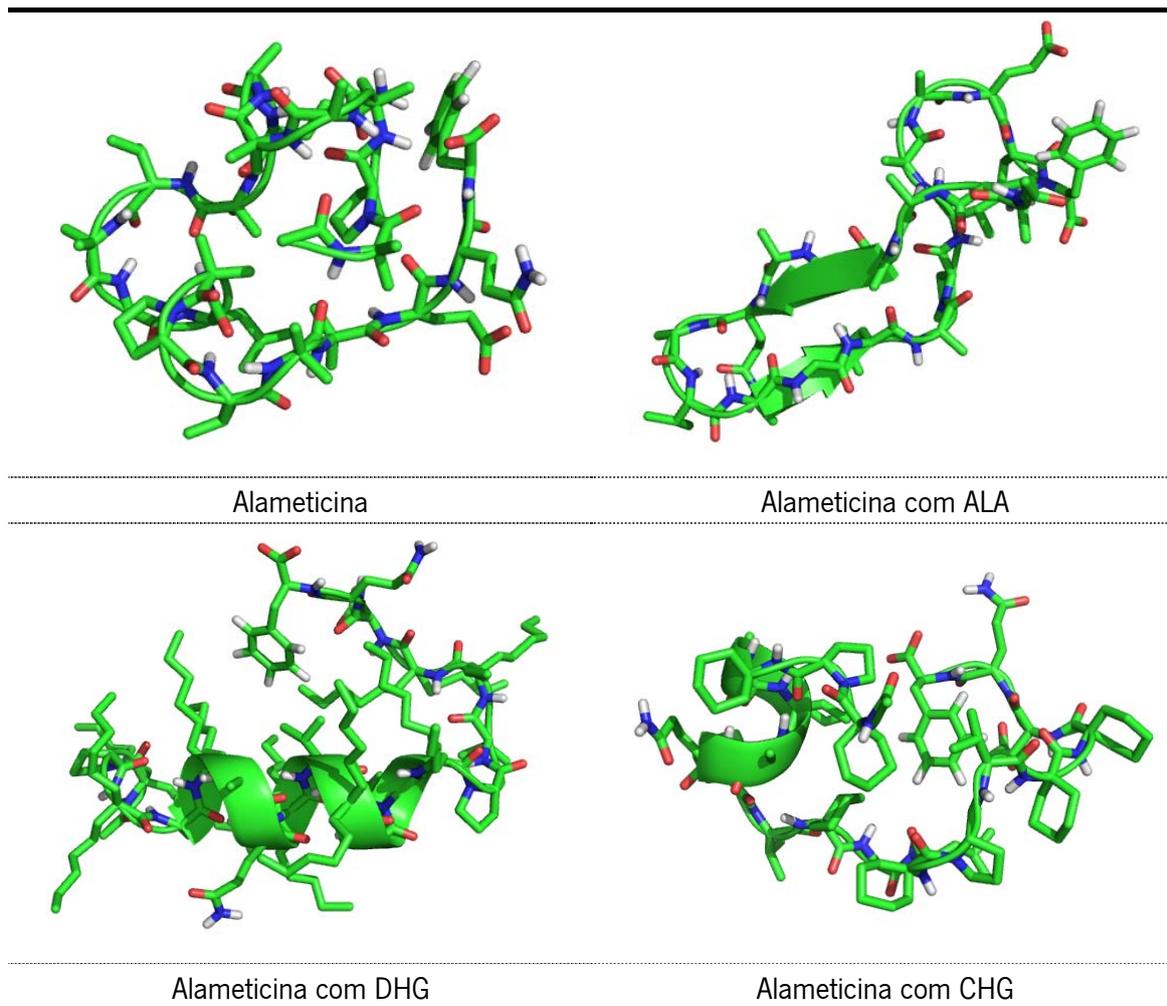
**Figura 19.** Média do número de resíduos em  $\alpha$ -hélice para os péptidos A) substituídos nas duas faces e para os análogos B) substituídos em apenas uma face. Valores médios obtidos das simulações com as cinco réplicas em água e etanol, incluindo barras do desvio padrão, e para uma réplica em POPC.

Observamos anteriormente que o CHG e o DHG são mais capazes de induzir conformações da Alm próximas de  $\alpha$ -hélice do que a forma nativa com AIB ou com ALA (Figura 18A). Também em água, as melhores substituições de forma a manter o maior número de resíduos em  $\alpha$ -hélice, acontecem na presença dos resíduos DHG e CHG (Figura 19A).

Alguns péptidos (ALA, DEG e DIB, por exemplo) necessitam de grande reorganização para passar de estados desorganizados em água para estruturas em  $\alpha$ -hélice em POPC. Como esperado, o etanol comporta-se como um meio com propriedades intermédias entre água e POPC, pois verifica-se um considerável aumento no número de resíduos em  $\alpha$ -hélice, em relação aos observados em água (Figura 19A), porém, não é tão capaz de permitir que um grande número de aminoácidos organize-se neste tipo de estrutura secundária, como em POPC.

Em POPC, a substituição nas duas faces favorece a organização em  $\alpha$ -hélice para os aminoácidos DEG, DHG e CHG (Figura 19A). Em geral, a substituição em uma face é prejudicial à formação deste tipo de estrutura secundária (Figura 19B). AIB, ALA e CHG promovem o maior número de resíduos em  $\alpha$ -hélice quando em POPC, corroborando que o tamanho destes aminoácidos deve promover péptidos mais estáveis quando em membrana.

Para ilustrar estas duas primeiras análises, a Figura 20 seguinte apresenta as estruturas centrais de alguns péptidos em água, onde fica claro o desvio sofrido em relação a estrutura experimental em  $\alpha$ -hélice (Figura 8).



**Figura 20.** Estruturas centrais em água, de uma das réplicas simuladas com o FF G54a7, da Alm e dos péptidos contendo ALA, DHG e CHG. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5.

Na Figura 20, observa-se que a Alm em água perde a sua estrutura secundária inicial. Este arranjo estrutural confirma as observações anteriormente feitas sobre os resultados de RMSD e do número de resíduos em  $\alpha$ -hélice. Experiências realizadas por Tieleman et al. corroboram esta perda de estrutura da Alm em água.<sup>[36]</sup> Estes estudos demonstraram, ainda, que este péptido reestrutura-se quando se aproxima de uma bicamada lipídica.

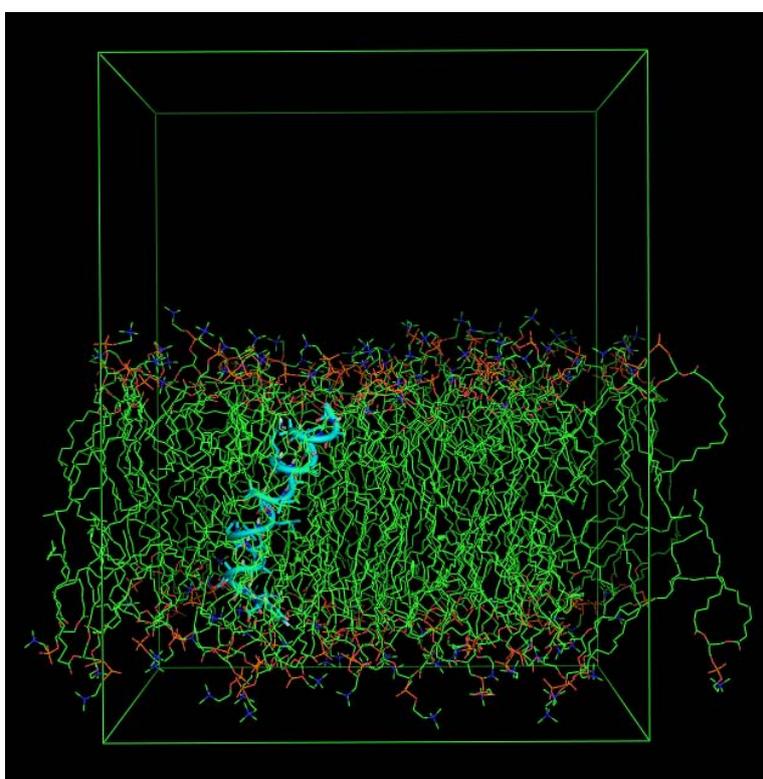
O análogo contendo ALA apresenta perda total da estrutura inicial em  $\alpha$ -hélice e na Figura 19A observa-se uma média inferior a 2 resíduos em  $\alpha$ -hélice. A ALA parece promover a formação de folha  $\beta$ , durante os 100ns de simulação em água.

No péptido contendo DHG, os resíduos centrais permanecem em  $\alpha$ -hélice (aproximadamente metade dos resíduos deste péptido) e apenas os terminais sofrem maiores desvios. Este é o péptido onde se observa maior fração de aminoácidos em  $\alpha$ -hélice. Esta pré-

organização sugere que o custo energético para que este péptido reorganize-se em  $\alpha$ -hélice antes de inserir-se na membrana, será menor que o sofrido pelos demais péptidos sob estudo.

O péptido contendo os aminoácidos cíclicos CHG, também apresenta uma região em  $\alpha$ -hélice, trata-se portanto de um resíduo menos volumoso que o DHG mas que também promove maior número de resíduos em  $\alpha$ -hélice que o AIB na Alm nativa.

As Figuras seguintes (Figuras 21 a 25) apresentam a estrutura final (após 100ns de simulação) dos péptidos de referência simulados em POPC e dos péptidos contendo DHG, DEG e CHG, de forma que o aspecto visual de suas estruturas secundárias ilustre o desvio em relação a Alm nativa em  $\alpha$ -hélice.

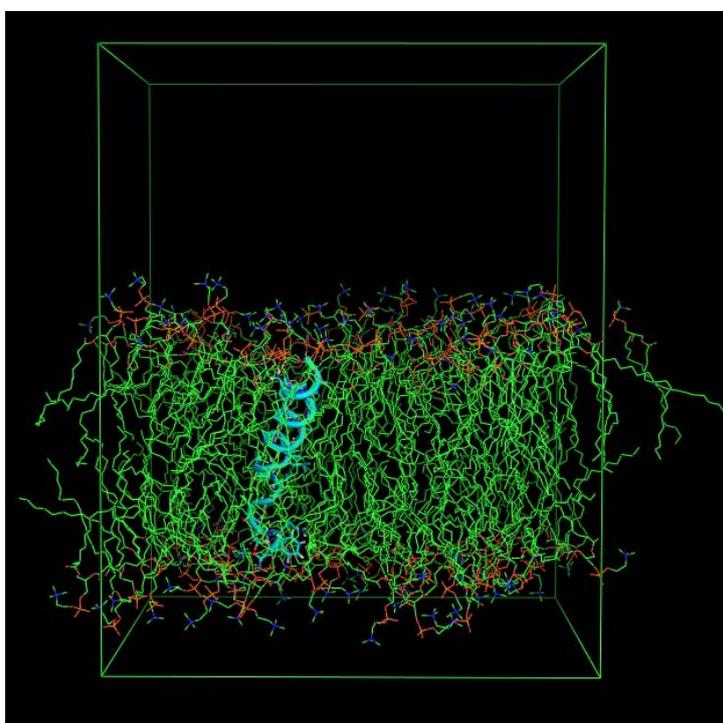


**Figura 21.** Alm em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-ciano. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização, no entanto as linhas que definem a caixa, representam os limites da célula onde as moléculas de água estão confinadas.

Na Figura 21 observa-se a estrutura da Alm ligeiramente inclinada entre as cadeias dos fosfolípidos. Esta constatação visual é coerente com o observado por Tieleman et. al.,<sup>[45-46]</sup> pois os monómeros de Alm dos canais transmembranares apresentaram esta mesma tendência.

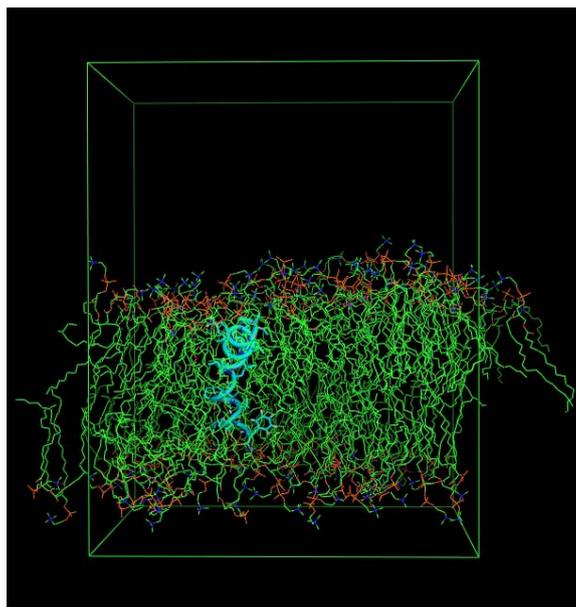
Verifica-se também que a membrana de POPC é um meio que estabiliza a organização da Alm em  $\alpha$ -hélice (os resultados do número de resíduos em  $\alpha$ -hélice apresentados na Figura

19A corroboram esta afirmação). Isto ocorre porque as interações entre grupos predominantemente apolares estão favorecidas e em parte, porque os resíduos pequenos como o AIB devem facilmente organizam-se entre as cadeias alifáticas dos fosfolípidos. A interação entre péptido e membrana pode ser entendida com um mecanismo de ação e reação, onde os resíduos que “chocam” com as cadeias dos fosfolípidos perturbam a membrana e esta, por sua vez, exige reorganização estrutural por parte dos péptidos que contém estes resíduos. Isto sugere que além dos aspectos energéticos que possam favorecer a interação dos péptidos anfipáticos com a membrana predominantemente apolar, devem ser levados em conta os impedimentos estéricos envolvidos nestas interações.



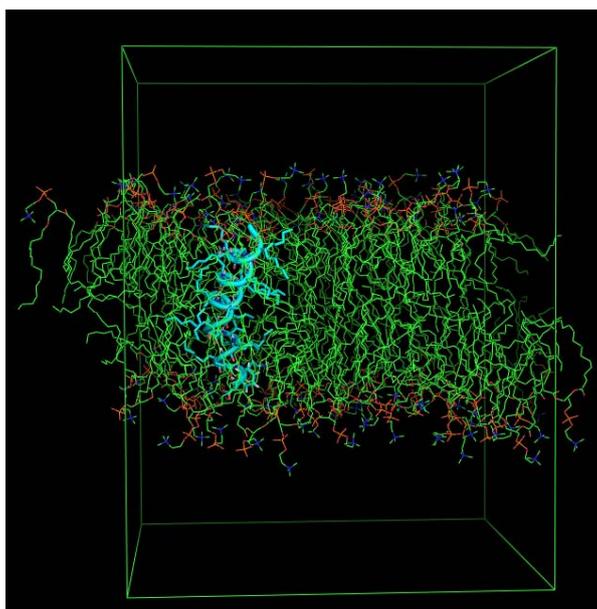
**Figura 22.** Alm com ALA em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização.

Na Figura 22, observa-se um ligeiro desenrolamento de um dos terminais do análogo com ALA. Este péptido apresenta uma média de 17 resíduos em  $\alpha$ -hélice quando em POPC, tal como a Alm (Figura 19A), no entanto, a estrutura final da simulação parece sugerir ligeira perda da forma helicoidal em relação a Alm em POPC. Esta observação corrobora com os outros resultados já apresentados que indicam que os aminoácidos naturais, como a ALA, não promovem o constrangimento necessário para manter a estrutura do péptido em  $\alpha$ -hélice.



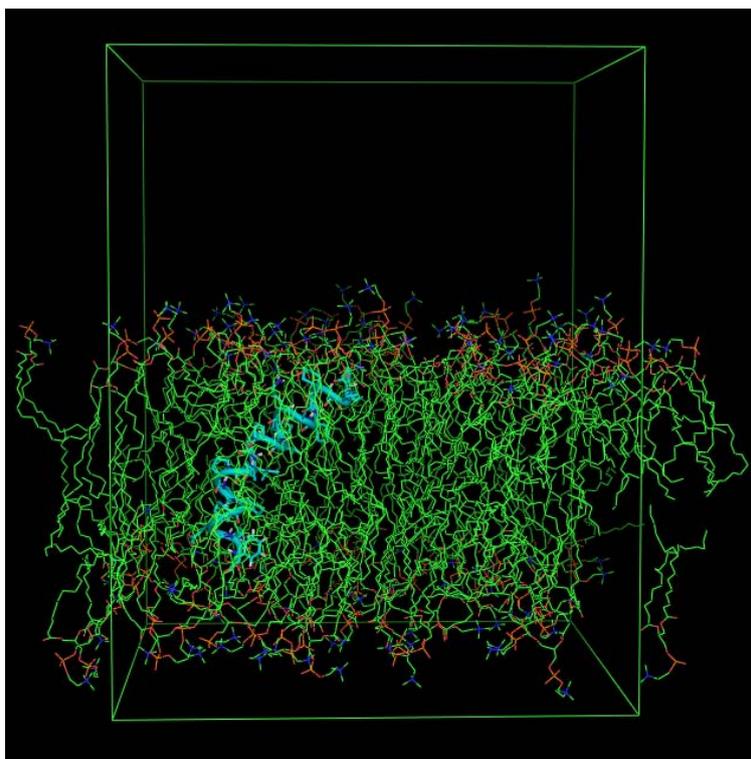
**Figura 23.** Alm com DEG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização.

O análogo da Alm contendo DEG, demonstrou manter-se em  $\alpha$ -hélice quando inserido em uma membrana de POPC, entretanto, observa-se uma maior curvatura do péptido em relação a Alm. Esta constatação é apenas visual, uma vez que não há uma medida da curvatura destes péptidos em membrana e este efeito pode ser perfeitamente aceitável devido a necessidade que o péptido tem de organizar-se entre as cadeias fosfolipídicas.



**Figura 24.** Alm com DHG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização.

Na Figura 24, observa-se que o péptido contendo DHG deve causar maior perturbação à membrana, uma vez que as cadeias laterais destes aminoácidos têm que organizar-se entre as cadeias carbonadas dos fosfolípidos. Este resultado sugere que apesar deste péptido apresentar a melhor pré-organização em água, pode, em algumas posições não ser energeticamente favorável na membrana, devido ao impedimento estérico resultante entre as cadeias alifáticas do aminoácido e dos fosfolípidos.



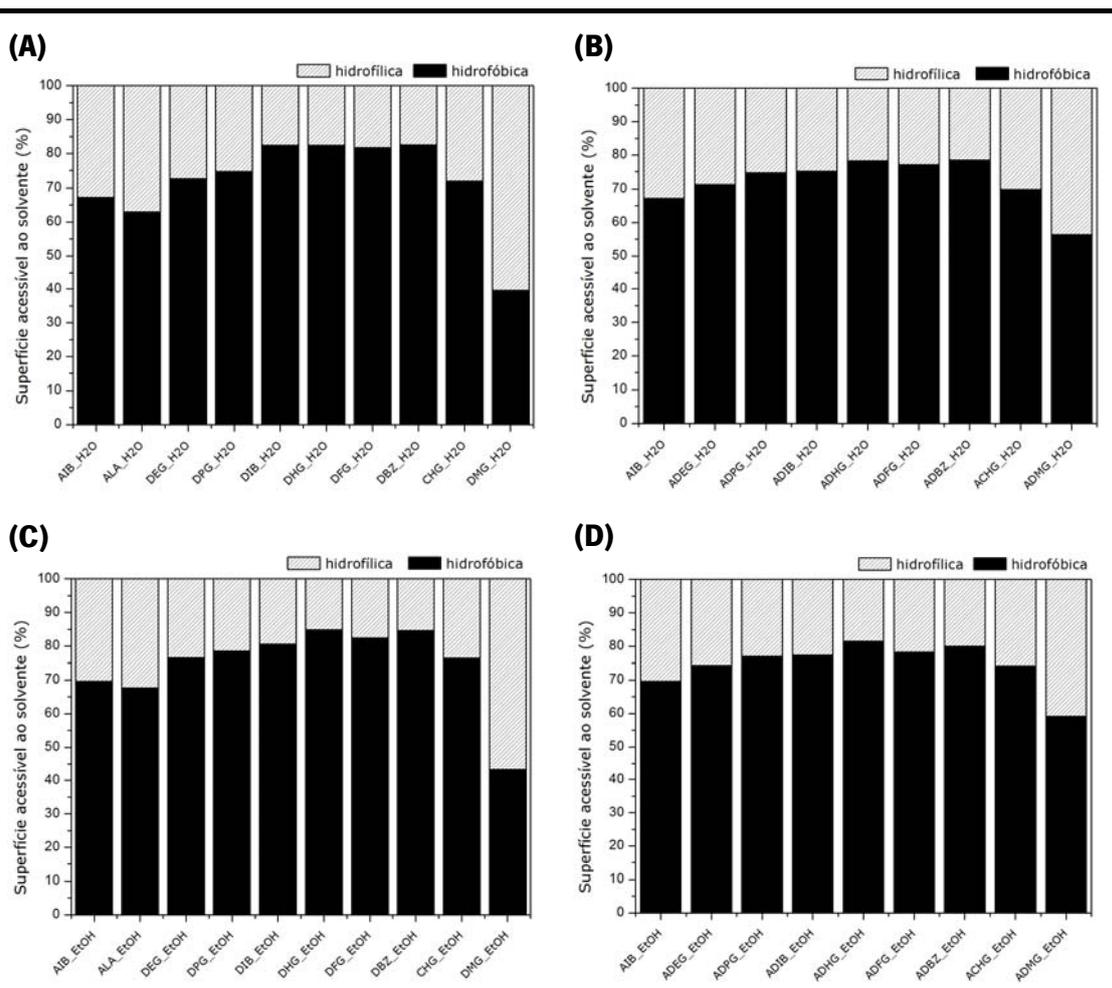
**Figura 25.** Alm com CHG em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-turquesa. As moléculas de água foram omitidas nesta imagem para melhor visualização.

Analogamente ao observado com o péptido contendo DEG, o análogo contendo CHG apresenta acentuada curvatura em relação à estrutura da Alm. No entanto, permanece com elevado número de resíduos em  $\alpha$ -hélice. Os resultados de RMSD da Figura 18A mostram que este péptido sofre baixo desvio em POPC, bem como os resultados do número de resíduos em  $\alpha$ -hélice (Figura 19A) indicam elevado número de resíduos neste tipo de estrutura secundária quando este péptido está inserido na membrana.

Tieleman et al.<sup>[45-46]</sup> simularam a Alm em membranas POPC para avaliar sua participação na formação de canais iônicos. Estas experiências foram feitas durante 4 a 20 ns e os canais investigados eram constituídos por 4 a 8 monómeros de Alm. Não há resultados na literatura diretamente comparáveis aos obtidos no presente estudo. Além disso, ressalta-se que os

resultados estruturais visualizados a seguir podem ter sido influenciados pelo fato da Alm e seus análogos terem sido simulados na forma de um monómero na membrana, no entanto, estes estudos permitem concluir que existem escolhas preferenciais de aminoácidos que promovem a estabilidade da Alm em água ou na membrana.

Os gráficos da Figura 26 seguinte apresentam a relação, em percentual, entre as áreas hidrofóbica e hidrofílica que a superfície de cada péptido expõe ao solvente.



**Figura 26.** Áreas hidrofílica e hidrofóbica expostas ao solvente, em percentual, para os péptidos substituídos nas duas faces e nos meios água e etanol, respectivamente quadrantes (A) e (C) e para os análogos substituídos em apenas uma face nos meios água e etanol, respectivamente, os quadrantes (B) e (D).

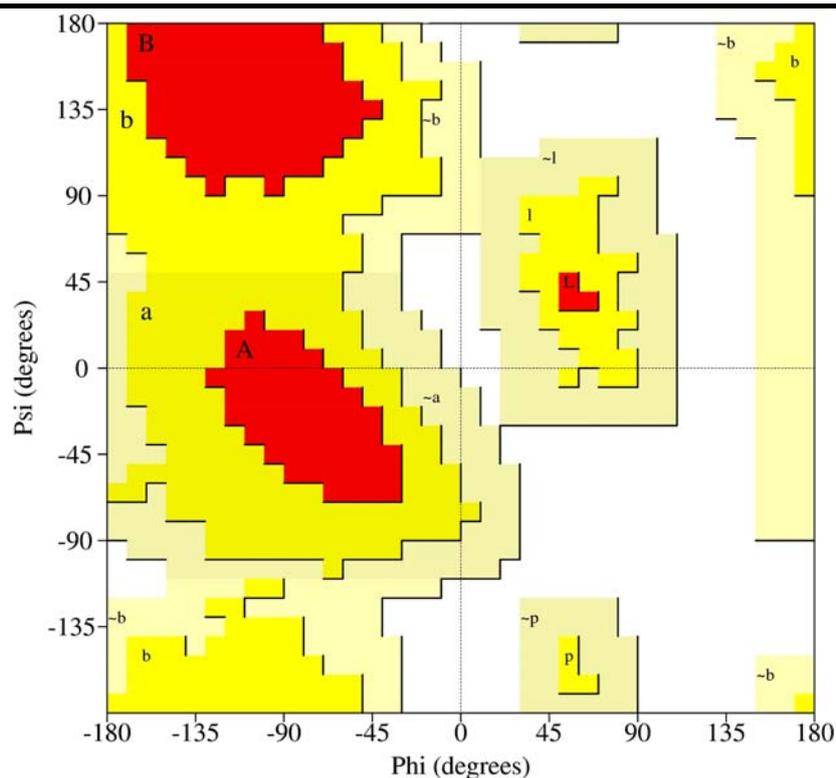
Da Figura 26 observa-se que os péptidos sob estudo são fundamentalmente apolares, dado o maior percentual de área hidrofóbica exposta ao solvente. Além disso, constata-se que mesmo com diferentes polaridades, como a água e o etanol, estes péptidos são incapazes de se reorganizar. Isto resulta de dois fatos: 1) alguns resíduos promovem a formação de péptidos

mais apolares que anfipáticos e 2) resíduos volumosos causam um impedimento estérico que não permite uma reorganização estrutural. Exemplos disso são os péptidos contendo aminoácidos volumosos, como DIB, DHG, DFG e DBZ.

Outro resultado importante observado nos gráficos da Figura 26 está relacionado com o fato de que a substituição em apenas uma face, também promove grande exposição de superfície hidrofóbica ao solvente, sugerindo que mesmo assim, estes péptidos continuam predominantemente apolares.

Ressalta-se porém, que mesmo que as propriedades predominantemente apolares/hidrofóbicas dos sistemas sob estudo não sejam favoráveis para a pré-organização em água, devem promover a inserção dos péptidos em meios hidrofóbicos, como as membranas de POPC.

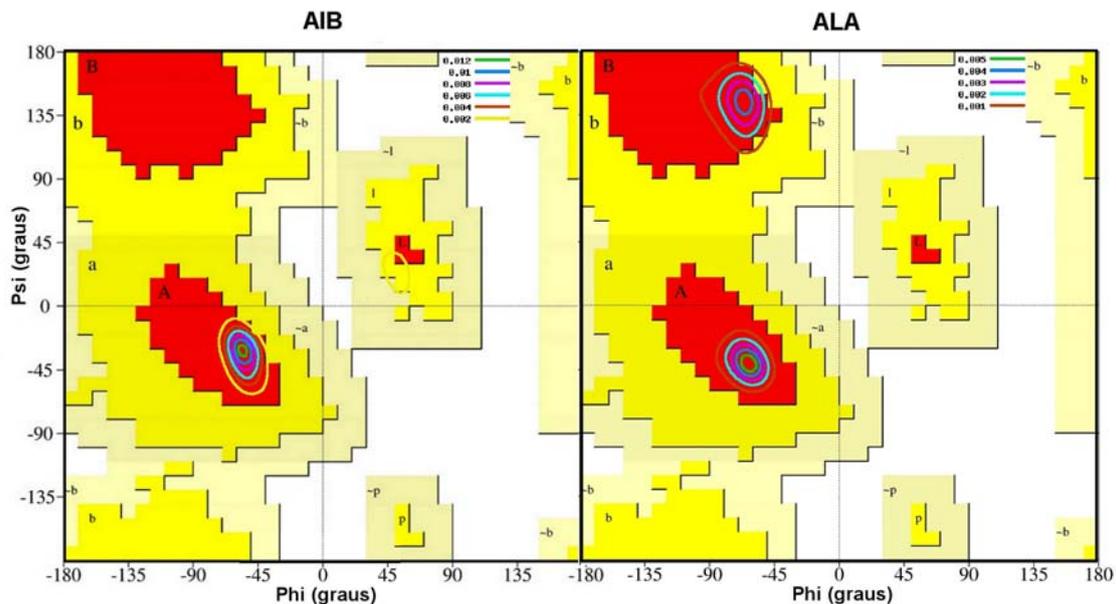
Dentro do contexto das análises estruturais, investigou-se os diedros *Psi* ( $\varphi$ ) e *Phi* ( $\psi$ ) que cada  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina assume quando inserida na Alm. Os diagramas de Ramachandran<sup>[70]</sup> foram gerados e sobrepostos a um diagrama padrão retirado do programa PROCHECK.<sup>[71,72]</sup> A Figura 22 apresenta o diagrama de Ramachandran padrão, com legendas das regiões permitidas e mais favorecidas correspondentes a diedros encontrados em estruturas secundárias conhecidas – hélices (regiões A e L na Figura 27) e folhas beta (região B na Figura 27) – com várias gamas de aceitação (vermelho mais favorecido que o amarelo claro) e as áreas em branco e não-sinalizadas correspondem a regiões proibidas. Destaca-se que os ângulos diedro observados para os aminoácidos codificados por ADN (presentes em péptidos e proteínas de ocorrência natural), estão na maior parte dos casos, na região correspondente a  $\alpha$ -hélices direita (região A na Figura 27) e que apenas a glicina costuma apresentar pares de diedro em regiões amarelo claro, pois sua cadeia lateral consiste em apenas um átomo de hidrogênio e isto possibilita maior liberdade conformacional a este aminoácido. No diagrama de Ramachandran, as regiões mais favorecidas correspondem a diedros que não causam sobreposição atômica. As regiões denominadas proibidas estão relacionadas a diedros que impõem choques atômicos entre os resíduos da cadeia peptídica e levam à torções nos ângulos e ligações dos aminoácidos de alta energia e conseqüentemente muito pouco prováveis. Este tipo de análise é essencial para perceber o grau de liberdade que as cadeias laterais conferem ao aminoácido e por conseqüência, o tipo de enovelamento que os aminoácidos induzem nos péptidos ou proteínas onde estão inseridos.



A, B e L – regiões permitidas: A =  $\alpha$ -hélice direita, L =  $\alpha$ -hélice esquerda e B = folhas  $\beta$   
a, b, l e p – regiões adicionalmente permitidas  
~a, ~b, ~l e ~p – regiões generosamente permitidas  
Não sinalizadas e brancas – regiões proibidas

**Figura 27.** Diagrama de Ramachandran padrão, retirado do programa PROCHECK.<sup>[71,72]</sup>

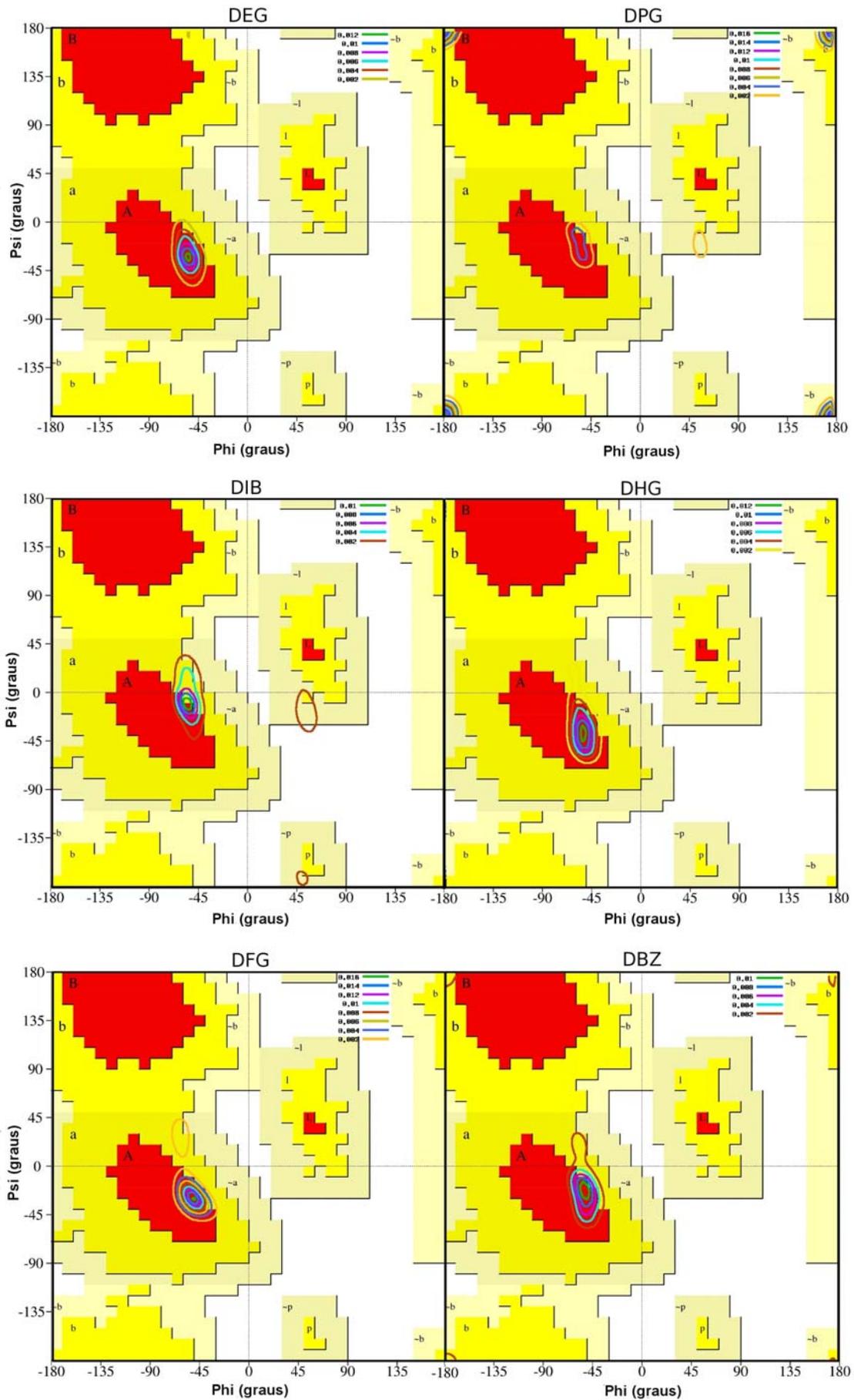
No presente trabalho investigou-se os diedros  $\varphi$  e  $\psi$  que cada  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina assume quando inserida na Alm e isto é importante porque trata-se de uma análise às características do aminoácido de interesse, ou seja, permite avaliar individualmente os aspectos estruturais dos aminoácidos sob estudo, enquanto as análises anteriores analisaram os péptidos no seu todo, nos quais estes resíduos estão inseridos. Neste sentido, os gráficos das Figuras 28 e 29 apresentam as densidades de probabilidade de ocorrência dos pares de ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  que o aminoácido de interesse no péptido apresenta durante a simulação, isto é, estes valores só foram calculados para o AIB, a ALA e as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas e não para todos os aminoácidos dos péptidos sob estudo. Quanto mais concentradas as curvas, maior a probabilidade de ocorrências daquele valor de diedro. Em outras palavras, curvas muito próximas indicam que há um grande número de configurações parecidas com aqueles valores de  $\varphi$  e  $\psi$ .

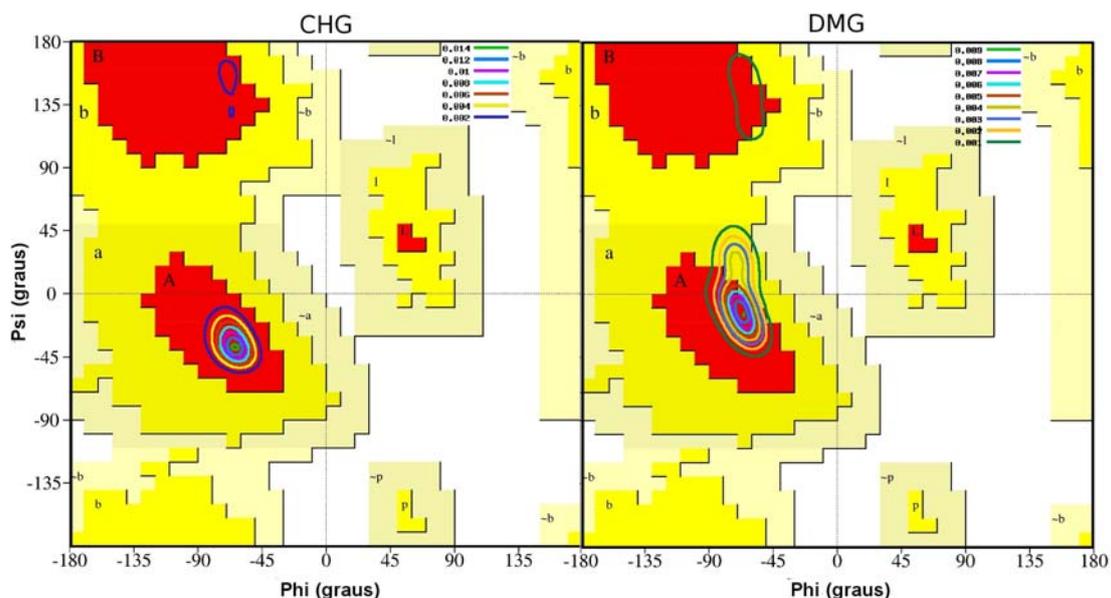


**Figura 28.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os aminoácidos AIB e ALA inseridos na Alm em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

O diagrama de Ramachandran obtido para o AIB inserido na Alm indica que os pares de ângulos  $\psi$  e  $\phi$  encontram-se em regiões correspondentes a  $\alpha$ -hélices direita e esquerda, mas a maior concentração de diedros está na região de  $\alpha$ -hélice direita, que é a região característica das proteínas e péptidos de atividade biológica. As  $\alpha$ -hélices esquerdas são comumente formadas por D-aminoácidos e o impedimento estérico causado pelas cadeias laterais neste tipo de arranjo determinam que hélices esquerdas não serem comuns em péptidos ou proteínas. O AIB é um aminoácido simétrico, onde o carbono não apresenta quiralidade, portanto, não pode ser classificado como *levo*-rotatório ou *dextro*-rotatório, por isso, é interessante reparar que este resíduo apresenta diedros em regiões de  $\alpha$ -hélices esquerdas, típicas dos D-aminoácidos.

Outra constatação importante é que as densidades de probabilidade observadas para o AIB, quando comparadas às obtidas pela ALA, revelam que o AIB é mais apropriado para constranger a estrutura peptídica em  $\alpha$ -hélice, uma vez que a ALA apresenta pares de diedros na região de folhas  $\beta$ . Isto deve-se a dupla metilação que o AIB apresenta no  $C\alpha$ , que elimina completamente configurações na região de folhas  $\beta$  e concentra as conformações no espaço das  $\alpha$ -hélices. A formação de folhas beta no péptido de Alm onde os resíduos de AIB foram substituídos por ALA pode ser revisto na Figura 20.

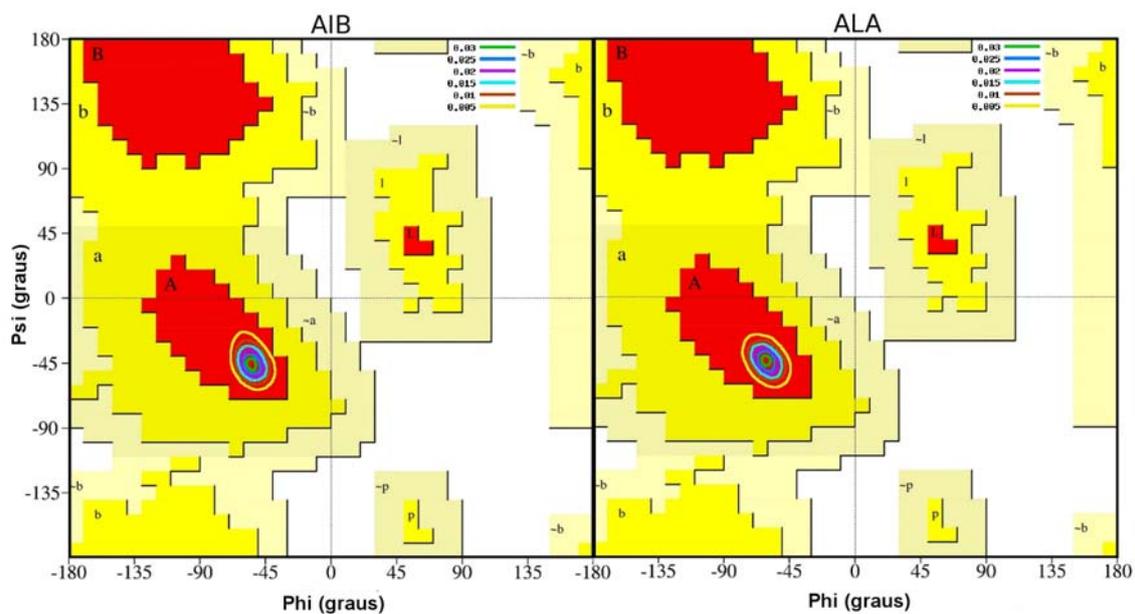




**Figura 29.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas na Alm em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

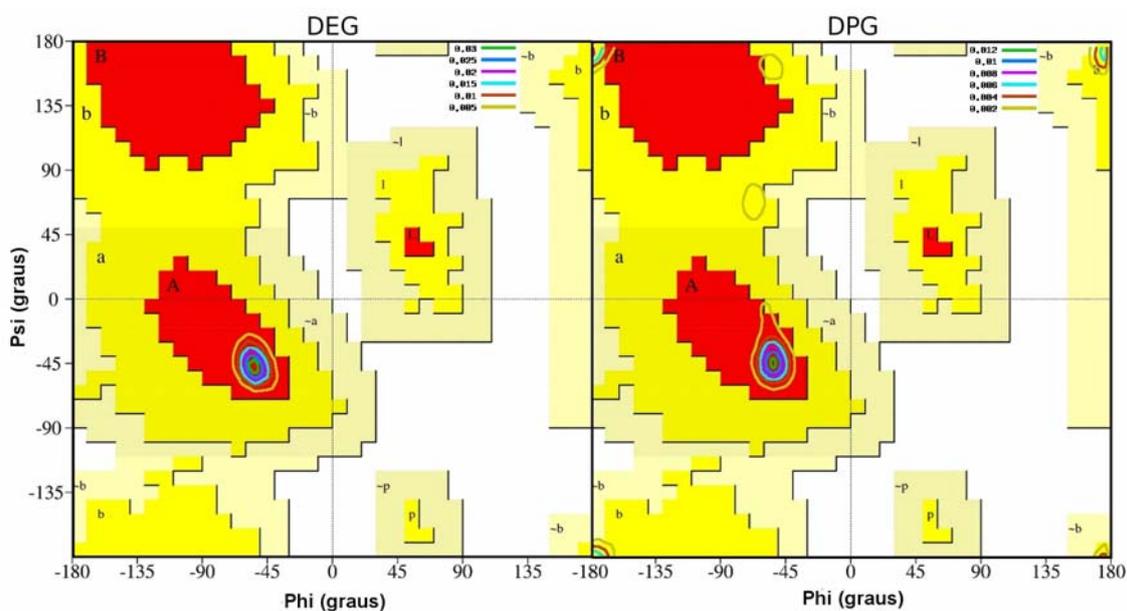
Os contornos apresentados nos Diagramas de Ramachandran apresentados na Figura 29 indicam que todas as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas exploram configurações em  $\alpha$ -hélice. As  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas DEG, DFG e DHG apresentam os pares  $\psi$  e  $\phi$  em regiões exclusivamente de  $\alpha$ -hélice direita, enquanto os novos aminoácidos DPG, DBZ, DIB, CHG e DMG também apresentam ângulos diedros dispersos em outras regiões permitidas, como em regiões de folhas  $\beta$ , por exemplo. Destaque para os aminoácidos não naturais DPG e DBZ, que apresentam pares  $\psi$  e  $\phi$  em  $180^\circ$ , indicando a possibilidade do arranjo em conformação estendida tal como sugerido anteriormente por Valle et al.<sup>[32]</sup>

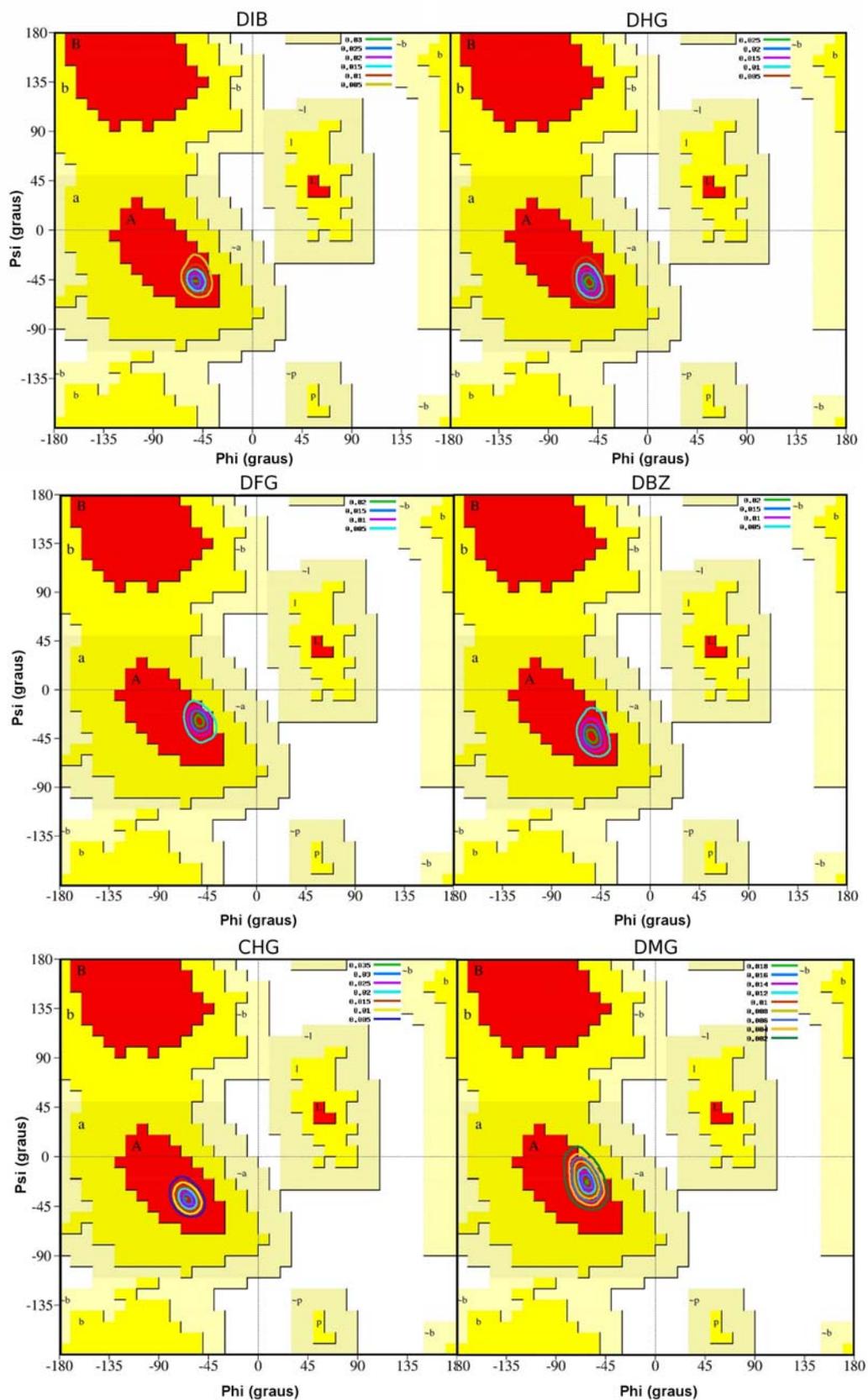
Os ângulos diedro dos aminoácidos sob estudo também foram investigados na Alm e análogos inseridos em POPC e os resultados estão apresentados na Figura 30 e 31, seguintes. Pretende-se com isso avaliar a capacidade de reorganização destes aminoácidos quando inseridos em membrana e se há, de facto, preferência por organização em  $\alpha$ -hélice.



**Figura 30.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para todos os aminoácidos AIB e ALA inseridos na Alm em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

Em POPC, o AIB, a ALA apresentam suas curvas do diagrama de Ramachandran concentradas exclusivamente na região de  $\alpha$ -hélice direita. Este resultado sugere que em membrana estes aminoácidos estão mais aptos a interagir com os aminoácidos da vizinhança e formar pontes de hidrogénio intramoleculares mais efectivas, resultando no constrangimento dos péptidos para este tipo de estrutura secundária.



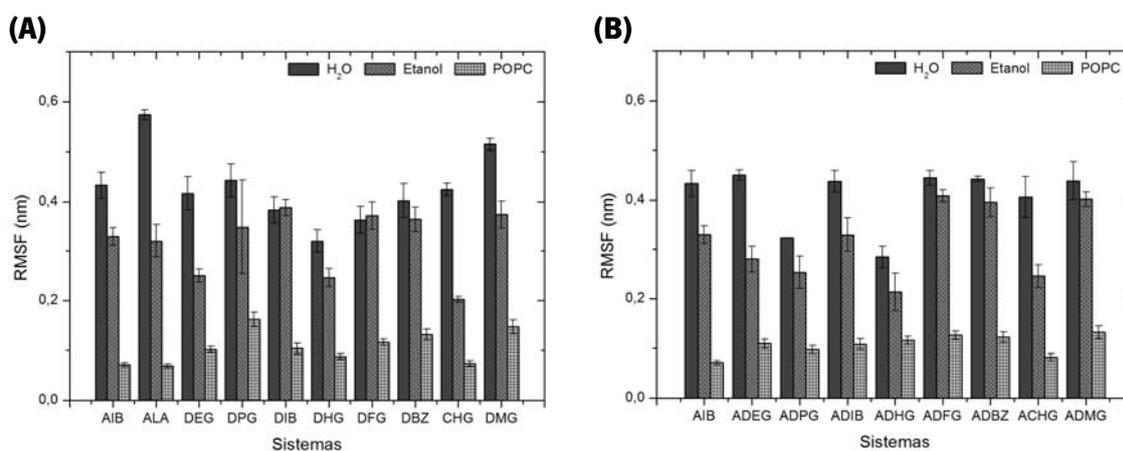


**Figura 31.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas na Alm em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

Todas as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas, com exceção do DPG, apresentam suas curvas do diagrama de Ramachandran concentradas na região de  $\alpha$ -hélice direita. Este resultado reforça que os aminoácidos apolares são ideais para a interação com as cadeias carbonadas apolares dos fosfolípidos e que neste meio, também são mais efetivos nas interações intramoleculares necessárias a manutenção da  $\alpha$ -hélice.

Destacam-se aqui os aminoácidos DHG e CHG que apresentam suas conformações mais concentradas na região de  $\alpha$ -hélice direita. Também se destaca o aminoácido DPG que, analogamente ao observado em água, volta a apresentar pares de diedro em  $180^\circ$ , revelando a preferência deste aminoácido por outro tipo de conformação do tipo distendido.

### 3.2 Propriedades Dinâmicas



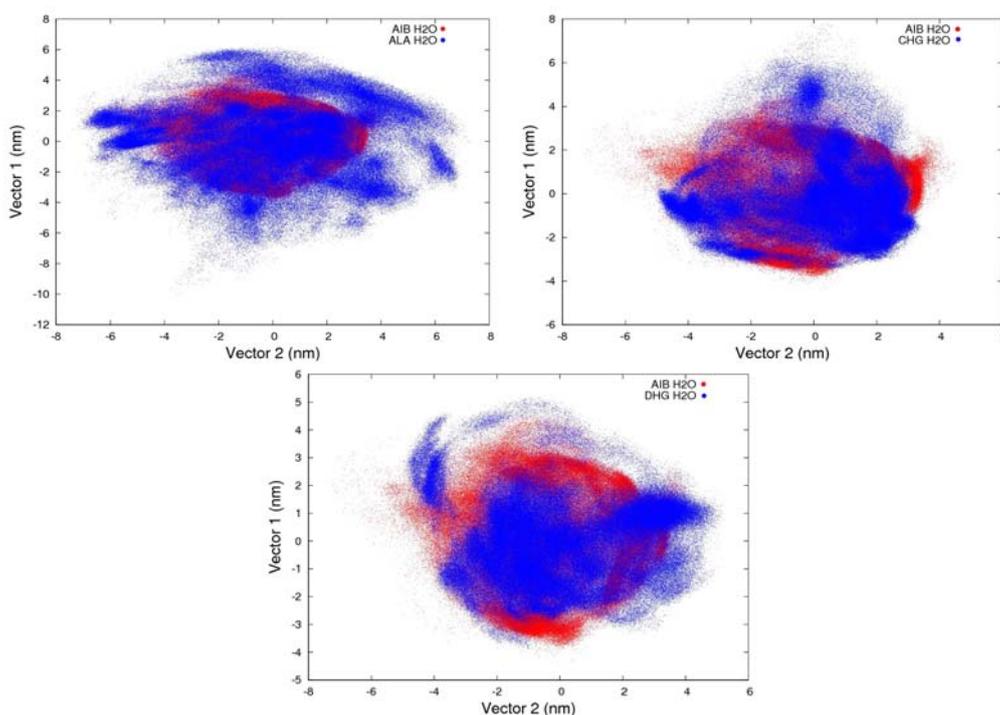
**Figura 32.** Médias dos RMSFs dos  $C\alpha$  em relação a estrutura experimental da Alm. Valores médios para as réplicas em água, etanol e POPC e respectivos desvio padrão de cada média. Em (A) observam-se os resultados para os péptidos substituídos nas duas faces e em (B) para os péptidos substituídos em uma face.

Na Figura 32 observa-se que em água, os aminoácidos dissustituídos constroem mais a estrutura peptídica do que a ALA. Também em água, verifica-se que o aminoácido que promove as menores flutuações é o DHG. Os demais péptidos sofrem flutuações semelhantes a sofrida pela Alm.

Em etanol verifica-se resultados muito distintos dos péptidos simulados em POPC. Neste caso, o etanol pode não estar a mimetizar devidamente um meio apolar, como, por exemplo, uma membrana lipídica. Os péptidos contendo os resíduos AIB, ALA, DHG e CHG sofrem as menores flutuações em POPC.

Quando a substituição se dá apenas na face apolar (posições 4, 6, 9, 14 e 17), o DHG também promove as menores flutuações em água. Em POPC, o CHG apresenta resultados equivalentes ao AIB, mesmo quando está só na face apolar.

Outra análise implementada para esclarecer propriedades dinâmicas e conformacionais dos sistemas sob estudo foi a análise dos componentes principais (PCA). Trata-se de um método matemático capaz de reduzir a dimensão do sistema mantendo os dados mais importantes sobre sua variabilidade, ou seja, permite reduzir o número de dimensões do espaço conformacional de forma a poderem ser visualmente observados em duas ou três dimensões usando os primeiros vectores mais representativos da distribuição em estudo.<sup>[73]</sup> Na Figura 32, comparou-se as projecções dos dois primeiros componentes do nosso péptido de referência (Alm com AIB) aos péptidos contendo ALA e as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas CHG e DHG. Estes últimos demonstraram nas análises anteriores, serem alternativas interessantes ao AIB, uma vez que causam menores desvios à estrutura nativa da Alm.



**Figura 33.** Análise dos componentes principais, comparando a Alm com os péptidos contendo ALA, CHG e DHG, em água.

Nos gráficos da Figura 33, pontos muito próximos sugerem configurações semelhantes, enquanto pontos dispersos indicam maiores diferenças estruturais. Os sistemas são comparados

em água, portanto espera-se observar pontos mais dispersos, refletindo o efeito hidrofóbico sofrido pelos péptidos e a consequente necessidade que têm em reorganizar-se, explorando estados conformacionais distintos. De facto, na Figura 33 observa-se grande variabilidade de configurações, no entanto, destaca-se o péptido contendo ALA, pois este aminoácido natural promove maior variabilidade conformacional que o AIB, reforçando a constatação que aminoácidos dissubstituídos constroem melhor o espaço configuracional dos péptidos do que os aminoácidos codificados por ADN. Entretanto, quando comparamos o AIB com uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina (CHG e DHG), verifica-se uma sobreposição de pontos que indica configurações semelhantes entre os dois péptidos comparados em água. Mas, ressalta-se que a aglomeração de alguns pontos (azul forte) provocada pelos resíduos CHG e DHG indica uma maior restrição do espaço conformacional destes péptidos nas condições simuladas.

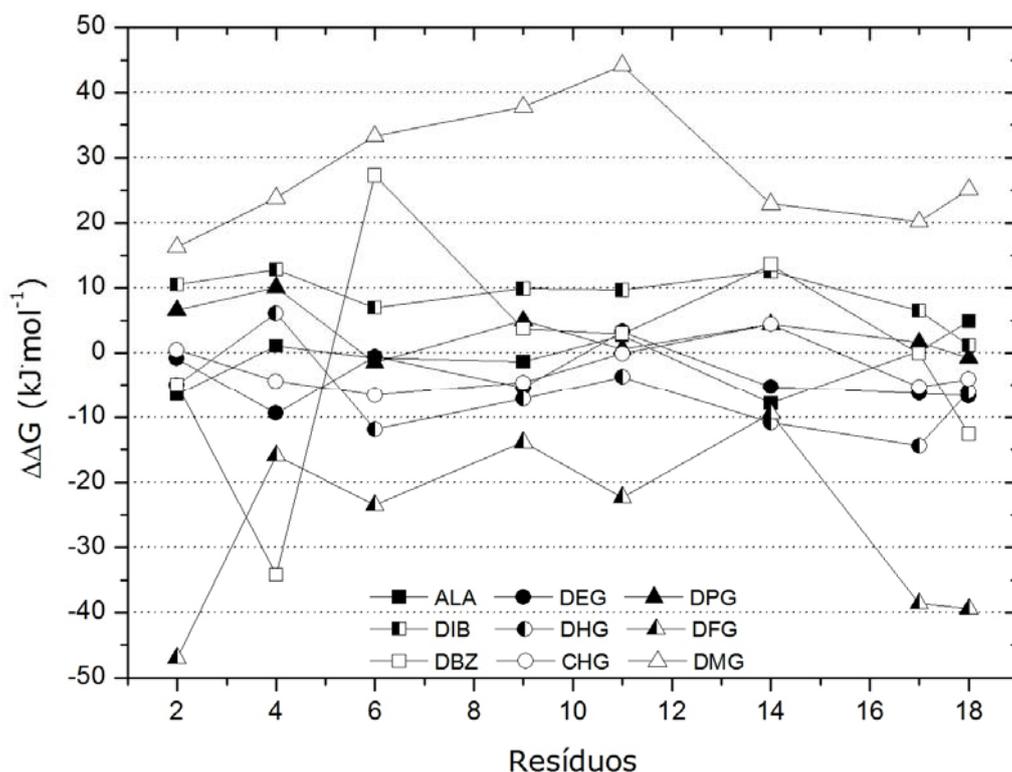
### 3.3 Propriedades Termodinâmicas

Os resultados estruturais e dinâmicos apresentados até esta secção, sugerem que existem alguns aminoácidos preferenciais que, ao ocuparem as posições antes pertencentes ao AIB, promovem estruturas secundárias mais constrangidas que a da Alm nativa. No entanto, é extremamente importante avaliar o custo energético de substituir o AIB por novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo, pois assim, aliam-se os aspectos conformacionais aos termodinâmicos e torna-se possível sugerir análogos ideais da Alm, suportados por observações sobre a estrutura e a termodinâmica.

As propriedades termodinâmicas dos sistemas foram avaliadas através de técnicas de integração termodinâmica, previamente definidas na secção 2.4 dos Materiais e Métodos. Os valores de Energia Livre de inserção/substituição ( $\Delta G$ ) de uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina em cada posição antes ocupada por AIB, estão apresentados no gráfico da Figura 34.

Relembra-se que as posições ocupadas por AIB na Alm nativa e substituídas por uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina, são as posições correspondentes aos resíduos 2, 4, 6, 9, 11, 14, 17 e 18.

O  $\Delta\Delta G^{\text{iso}}$  (Figura 17) foi calculado no sentido da transformação  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina  $\rightarrow$  AIB, portanto, valores negativos indicam um sentido e magnitude favoráveis para a incorporação do novo aminoácido nesta posição.



**Figura 34.** Energia livre de inserção ( $\Delta\Delta G$ ) dos novos aminoácidos não naturais na Alm em membrana POPC.

Na Figura 34, observa-se que para todas as posições de interesse há um novo aminoácido mais favorecido termodinamicamente a inserir-se na posição antes ocupada por um resíduo de AIB. Assim, os aminoácidos ideais para substituir o AIB seriam:

2    4    6    9    11    14    17    18  
**DFG DBZ DFG DFG DFG DHG DFG DFG**

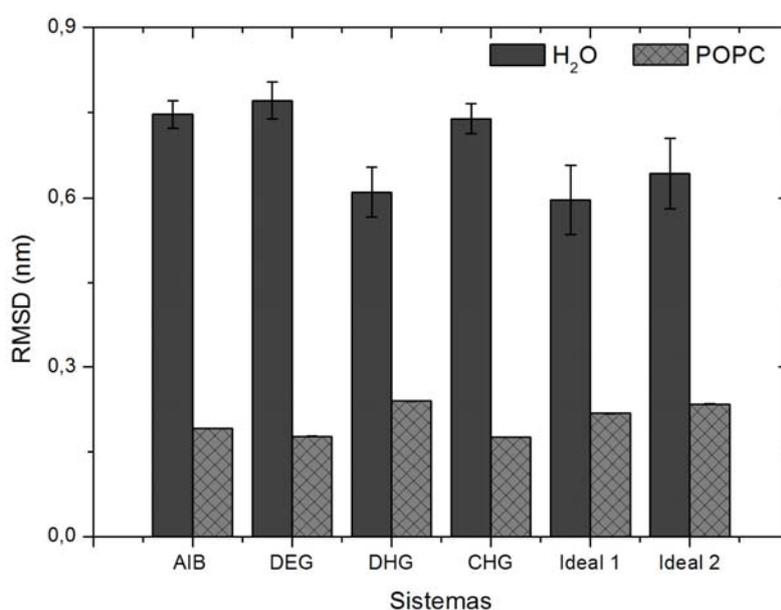
Contudo, é essencial considerar os aspectos estruturais e dinâmicos que cada nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina impõe aos péptidos sob estudo. Logo, o aminoácido DFG, nas posições 2, 6, 9, 11, 17 e 18 seria descartado, pois não promove boa pré-organização em água, de acordo com as observações feitas previamente, ou mesmo estrutura helicoidal bem definida em POPC. Considerando-se então todos os resultados obtidos, sugere-se dois possíveis análogos ideias da Alm:

2    4    6    9    11    14    17    18  
**DHG DEG DHG DHG AIB DHG DHG DEG**  
**DBZ CHG CHG DEG AIB DEG DEG ALA**

Estas duas sugestões de aminoácidos refletem as melhores combinações de características estruturais e termodinâmicas para a estrutura do péptido. De fato, resíduos como

o DHG, o DEG e o CHG, demonstram ser capazes de promover elevado número de resíduos em  $\alpha$ -hélice quando os péptidos estão inseridos em POPC. Além disso, o aminoácido DHG confere boa pré-organização em água. É importante, ainda, destacar que na posição 11 é indiferente termodinamicamente trocar o resíduo de AIB por uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina, por isso, sugeriu-se manter este resíduo nesta posição.

Neste sentido, os dois novos péptidos foram avaliados sob as mesmas condições de simulação dos péptidos simulados com o FF G54a7. Para cada novo análogo, cinco réplicas foram simuladas em água e avaliou-se também o comportamento estrutural e dinâmico em POPC. Os resultados obtidos destas simulações estão apresentados nas Figuras seguintes.

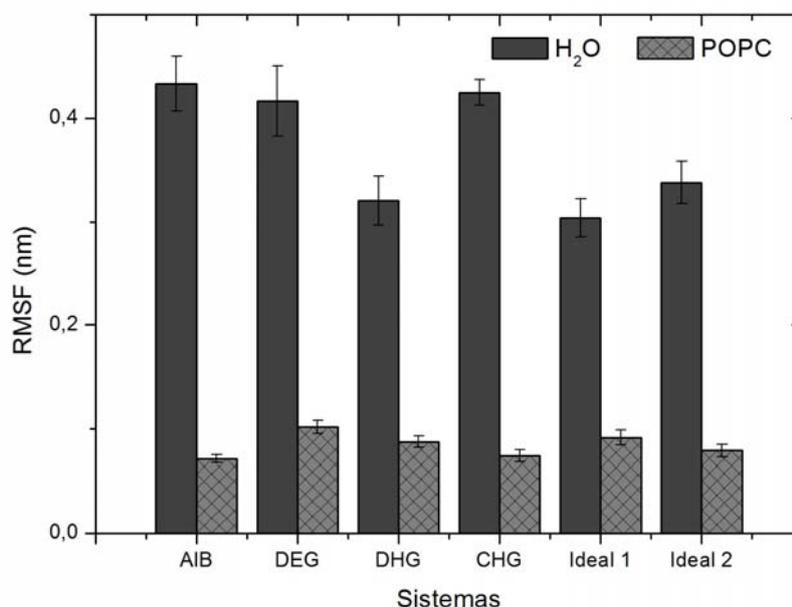


**Figura 35.** Médias dos RMSDs dos C $\alpha$  em relação a estrutura experimental da Alm em  $\alpha$ -hélice, nos meios água e POPC. *Fitting* dos C $\alpha$  dos péptidos foi feito relativamente à estrutura inicial de raios-X. Os valores médios para as cinco réplicas dos péptidos em água estão associados a um desvio padrão. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido.

Na Figura 35 observa-se que o RMSD sofrido pelo análogo ideal 1, durante a simulação em água, é ligeiramente menor do que o observado para o péptido contendo 8 resíduos de DHG, embora o desvio padrão praticamente iguale esses valores e o do ideal 2. Constata-se então, que ambos péptidos são aqueles que demonstram a melhor pré-organização em água.

Em POPC, verifica-se que os análogos 1 e 2 apresentam menores desvio em relação ao péptido contendo DHG, mas maiores que os péptidos contendo aminoácidos menos volumosos, como o AIB, o DEG e o CHG, no entanto as diferenças são relativamente pequenas entre si e não serão significativas. A melhoria em relação a Alm com DHG indica que a utilização de

resíduos DEG, AIB e CHG em alternância com resíduos de DHG, traz vantagens como a diminuição de impedimentos estéricos entre as cadeias dos aminoácidos e a membrana. Mais ainda, a incorporação destes aminoácidos na Alm quando inserida em membrana é termodinamicamente favorável relativamente à forma nativa contendo AIB, tal como foi observado anteriormente.

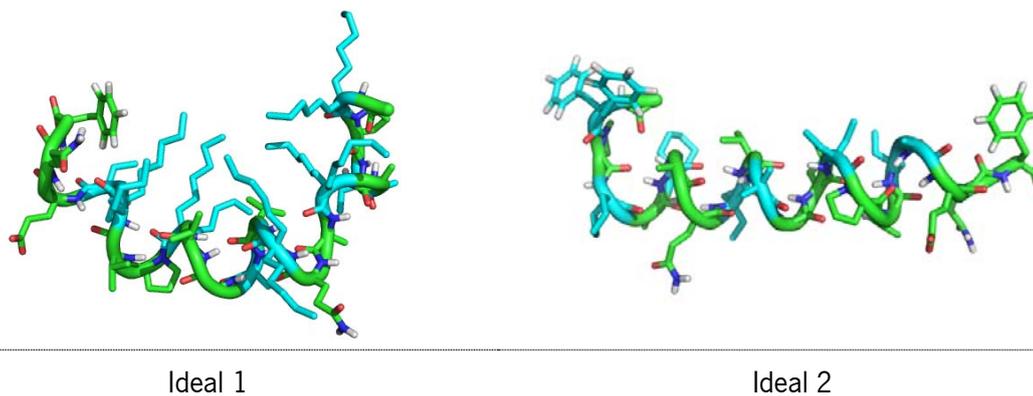


**Figura 36.** Médias e desvios padrão dos RMSFs dos C $\alpha$  em relação a estrutura experimental da Alm em  $\alpha$ -hélice, nos meios água e POPC. Em POPC, foi simulada apenas 1 réplica de cada péptido.

Analogamente ao observado nos resultados de RMSD, em água, o análogo ideal 1, revela sofrer as menores flutuações juntamente com a Alm com DHG. Em POPC, todos os péptidos comparados na Figura 36 sofrem baixos desvios, mas a Alm e o análogo com CHG ainda são os que apresentam as menores flutuações, embora o análogo ideal 2 apresente um valor estatisticamente equivalente a estes dois péptidos.

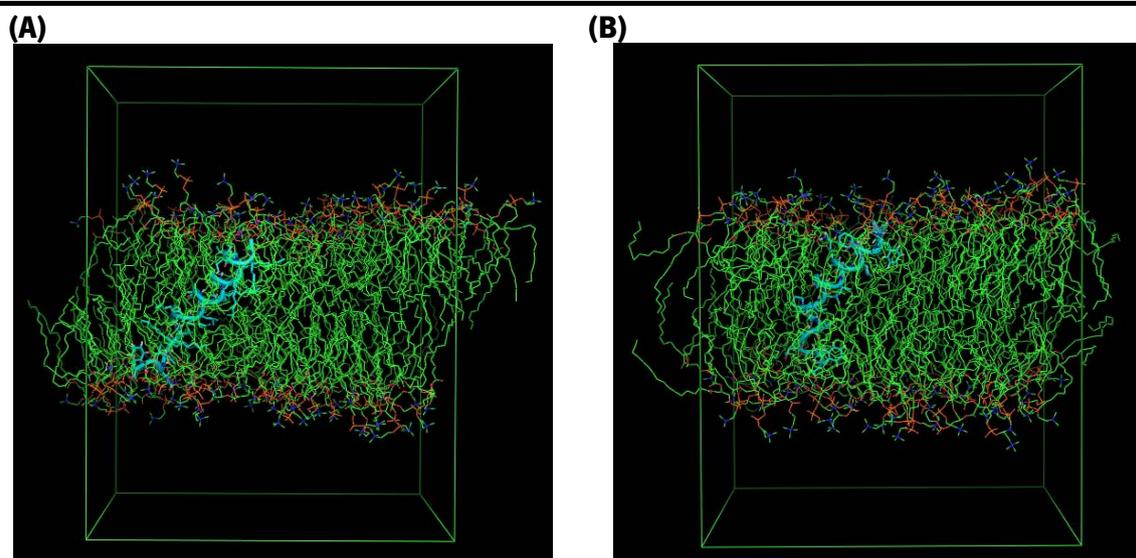
Os resultados estruturais e dinâmicos apresentados nas Figuras 35 e 36, quando aliados aos resultados termodinâmicos discutidos nesta secção, indicam que os análogos ideais 1 e 2, podem ser alternativas interessantes à modelação dos análogos contendo 8 resíduos iguais na posição de interesse. A escolha destes aminoácidos resultam numa melhor estabilidade estrutural e energética e o uso de aminoácidos menos volumosos como o AIB, o DEG e o CHG, podem facilitar os mecanismos de síntese destes péptidos.

A Figura seguinte apresenta a estrutura de uma das réplicas dos análogos ideais propostos em água, que servem para ilustrar a pré-organização destes péptidos neste meio.



**Figura 37.** Estruturas em água, de uma das réplicas simuladas com o FF G54a7, dos análogos ideais 1 e 2. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5.

Na Figura 37 fica clara a capacidade de permanência dos análogos da Alm na conformação helicoidal. O análogo ideal 1 mantém a  $\alpha$ -hélice ao longo de toda sua estrutura, embora haja algum enovelamento de sua estrutura, que provavelmente ocorre como reação ao efeito hidrofóbico sentido pelo péptido. O Análogo ideal 2 também é eficaz na manutenção da  $\alpha$ -hélice, mas observa-se que os seus terminais sofrem maior desenrolamento em relação ao análogo ideal 1. Em POPC, o comportamento estrutural destes dois péptidos também foi ilustrado e estes sistemas podem ser observados nas Figuras 38, seguintes.



**Figura 38.** Análogos ideais 1 (A) e 2 (B) da Alm em POPC, após 100ns de simulação. A coloração dos átomos segue a convenção definida na Figura 5 e o péptido sob estudo está em realce na cor azul-ciano. As moléculas de água foram omitidas nestas imagens para melhor visualização.

Visualmente, os análogos ideais 1 e 2, apresentam comportamento estrutural semelhante aos demais péptidos sob estudo, quando inseridos em POPC, ou seja, há manutenção da estrutura secundária em  $\alpha$ -hélice e ligeira dobra da estrutura para rearranjar-se entre as cadeias dos fosfolípidos.

### 3.4 Conclusões

As experiências realizadas com a Alm e os análogos propostos vêm responder à algumas questões pertinentes que foram colocadas com hipóteses de trabalho neste estudo: os novos aminoácidos são capazes de originar análogos da Alm com maior helicidade e mais estrangidos que a Alm nativa? A inserção de novos aminoácidos na Alm em membrana é termodinamicamente favorável? Tendo em conta o efeito estrutural e termodinâmico de cada novo aminoácido, quais são os análogos ideais da Alm?

Em água DHG, DFG e DBZ impõem, com seu volume, estruturas mais estrangidas e helicoidais do que o AIB, enquanto em etanol, DEG, DHG e CHG impõem maior helicidade a seus péptidos do que o AIB. Em POPC, ALA, DEG e CHG originam análogos com comportamento estrutural semelhante à forma nativa da Alm.

Os resultados termodinâmicos também sugerem que há melhores alternativas ao AIB em quase todas as posições antes ocupadas por AIB, exceto na posição 11. Foram propostos dois análogos ideais que reúnem as melhores propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas que podem ser alternativas interessantes à modelação dos análogos contendo 8 resíduos iguais na posição de interesse, pois os aminoácidos sugeridos nestes dois péptidos também acarretam boa pré-organização e estabilidade estrutural e dinâmica em água e POPC.

Conclui-se que a modelação de análogos da Alm através da inserção de novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sugere que é possível otimizar as características da Alm nativa e obter novos péptidos com atividade antibiótica, que provavelmente serão mais estáveis estruturalmente e mais efetivos no mecanismo de inserção na membrana. É também de notar que as várias  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas demonstraram ter diferentes propensidades para induzir estruturas secundárias, nomeadamente  $\alpha$ -hélice direitas e esquerda,  $\beta$ -sheets e estruturas planares. Assim sendo, é agora claro que os aminoácidos dissubstituídos não induzem exclusivamente conformações em  $\alpha$ -hélice, mas tem, na verdade, propriedades estruturais mais diversas que poderão ser objecto de estudo em futuros estudos de desenho de novos péptidos.

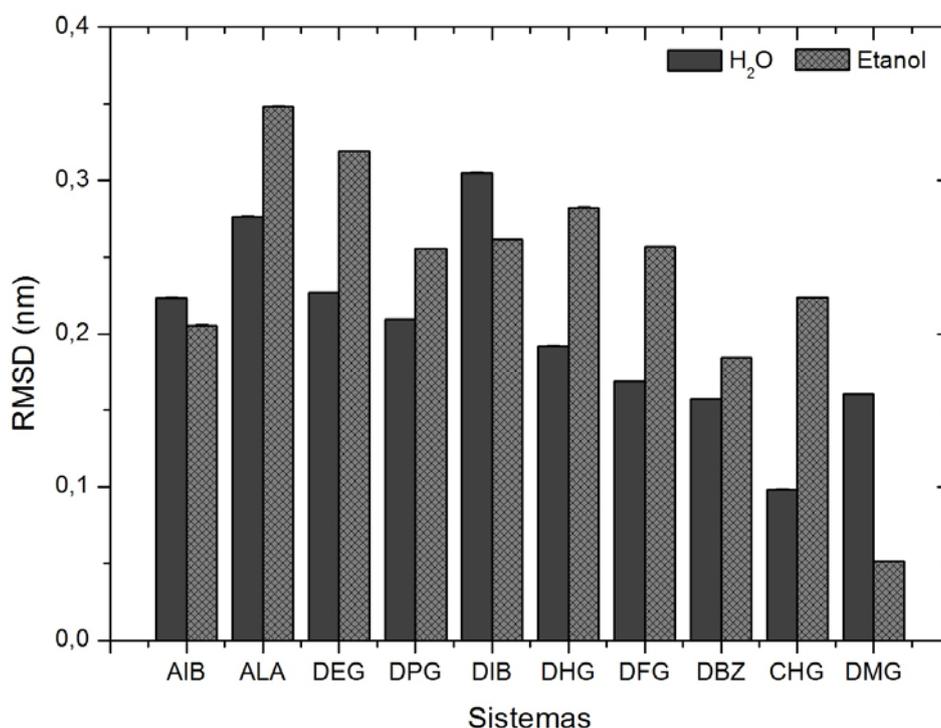
Os resultados deste capítulo estão em preparação para publicação.



## **4 Peptaibolin e Análogos**

#### 4.1 Estrutura em água e etanol

O Peptaibolin é um peptaibol de cadeia curta baseado em resíduos de Leucina e AIB. Este péptido tem despertado o interesse da comunidade científica porque, assim como a Alameticina, apresenta atividade antimicrobiana, mas revela vantagens devido seu pequeno tamanho e mecanismo de síntese. Neste trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas neste péptido de cadeia curta e, assim, perceber melhor as propriedades e características que estes novos resíduos impõem aos péptidos nos quais estão inseridos, tais como, pré-organização em água e capacidade de inserção em membrana. Os primeiros resultados a serem discutidos sobre o Pep e os análogos modelados dizem respeito às propriedades estruturais destes péptidos. A Figura 39 apresenta as médias dos RMSDs destes sistemas em dois meios, água e etanol, obtidos a partir de simulações de DM de 100ns de simulação. As simulações em água têm por objetivo avaliar a pré-organização dos péptidos, enquanto as simulações em etanol, servem para mimetizar um meio mais apolar, aproximando-se de uma bicamada lipídica genérica.

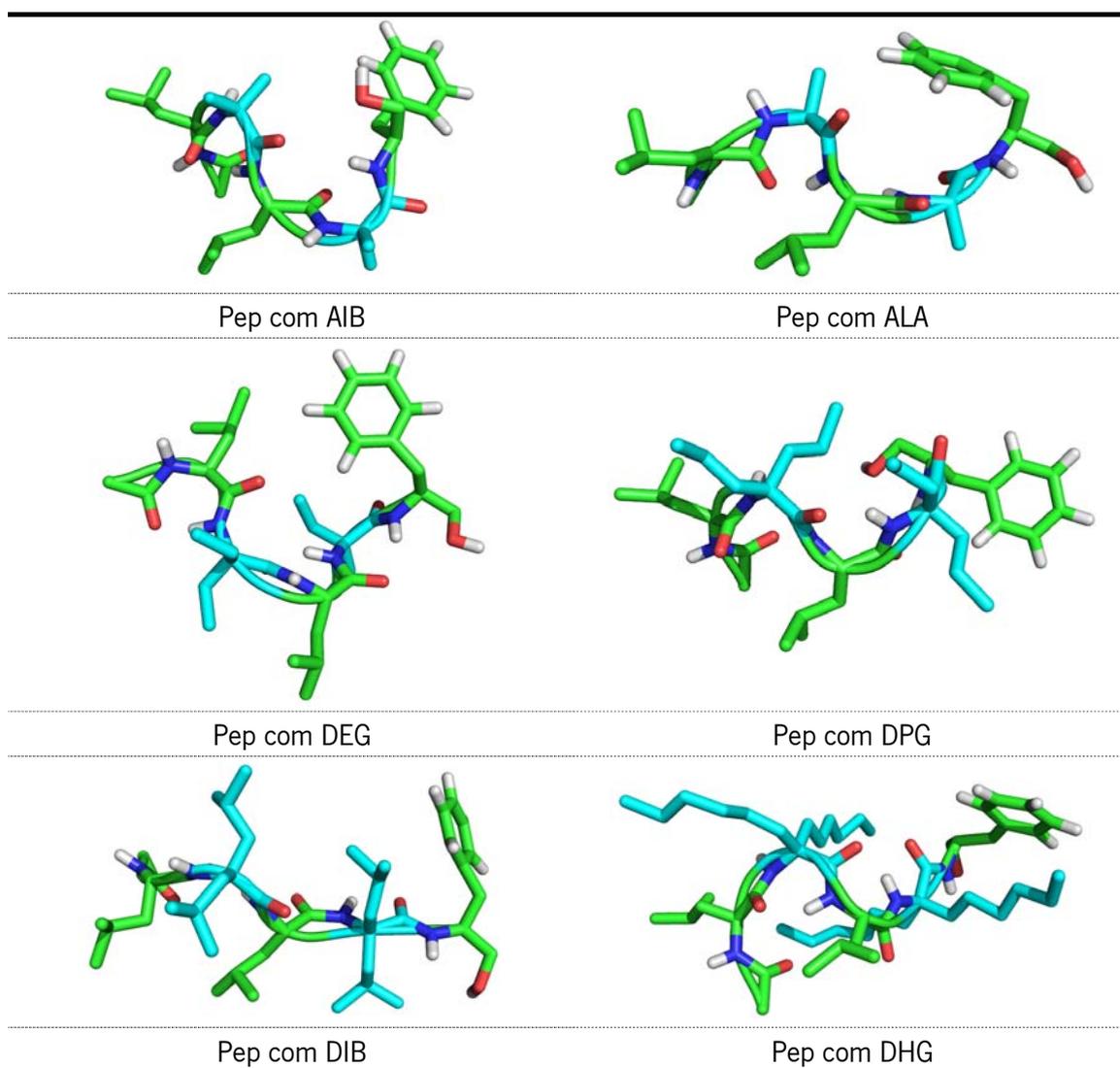


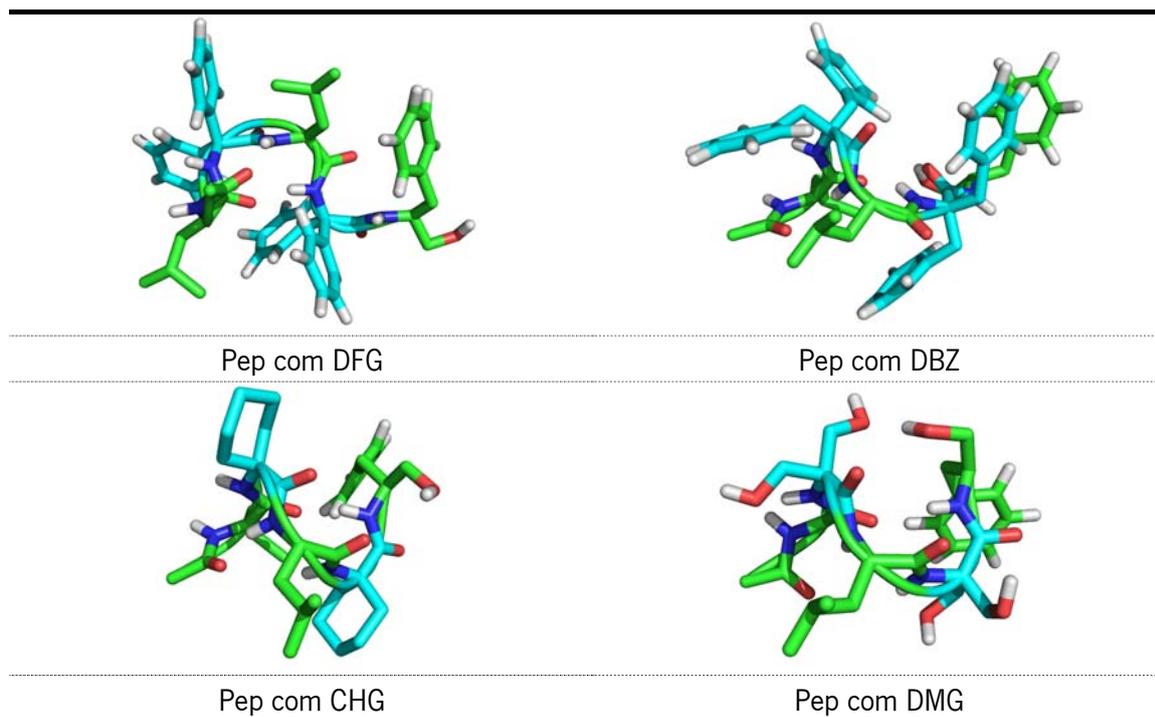
**Figura 39.** Médias dos RMSDs do C $\alpha$  do Pep e análogos, em água e etanol, em relação à estrutura de referência do Pep, em  $\alpha$ -hélice. Valores médios da totalidade da simulação, 100ns. *Fitting* dos C $\alpha$  relativamente à estrutura inicial do Pep modelada em  $\alpha$ -hélice.

Na figura 39 destaca-se o péptido constituído pelo aminoácido não natural CHG que, em água, apresenta um desvio consideravelmente menor que o Pep nativo e os demais análogos sob estudo. Outras  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas também acarretam menores desvios em água do que o AIB, é o caso do DFG, DHG e DMG. Em etanol, apenas os péptidos contendo DBZ e DMG apresentam menores desvio que o Pep.

Este primeiro resultado indica que há péptidos capazes de manterem-se em  $\alpha$ -hélice mais eficientemente que o Pep nativo e, analogamente ao observado para a Alm, algumas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas tem diferentes graus de propensão para imporem uma estrutura peptídica próxima da  $\alpha$ -hélice.

A Figura 40 seguinte apresenta as estruturas centrais obtidas a partir de uma matriz de RMSD calculada para cada péptido sob estudo. Estas estruturas correspondem a estrutura mais representativa do sistema durante a simulação.

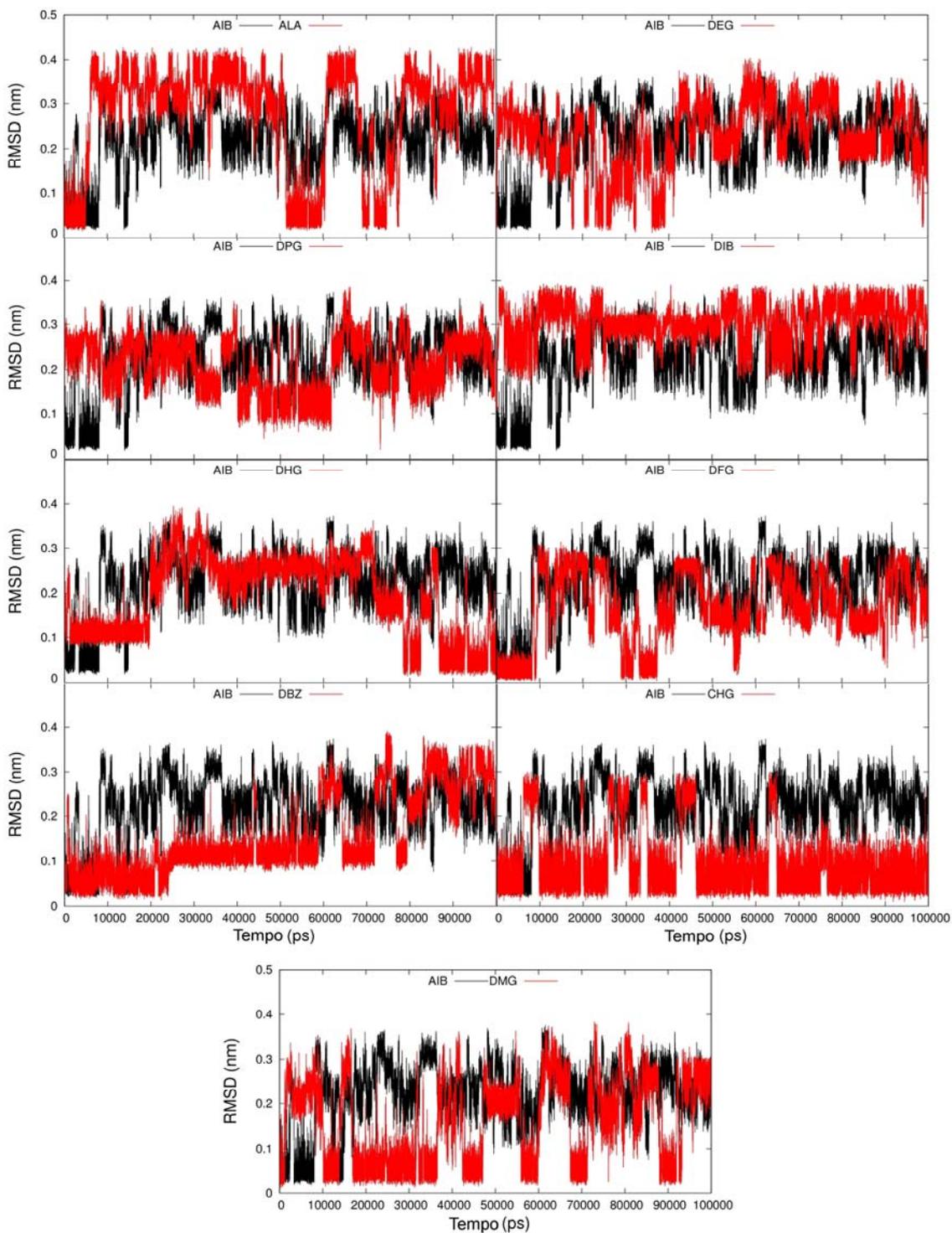




**Figura 40.** Estruturas centrais do Pep e análogos simulados durante 100ns em água.

Na Figura 40 observa-se que os péptidos análogos contendo ALA e DIB, apresentam estrutura central do tipo *random coil*. Os péptidos contendo DHG, DFG, DBZ e DMG demonstram manter algum enovelamento helicoidal, mas novamente destaca-se o aminoácido CHG, pois visualmente, este péptido aparenta ter uma estrutura em  $\alpha$ -hélice.

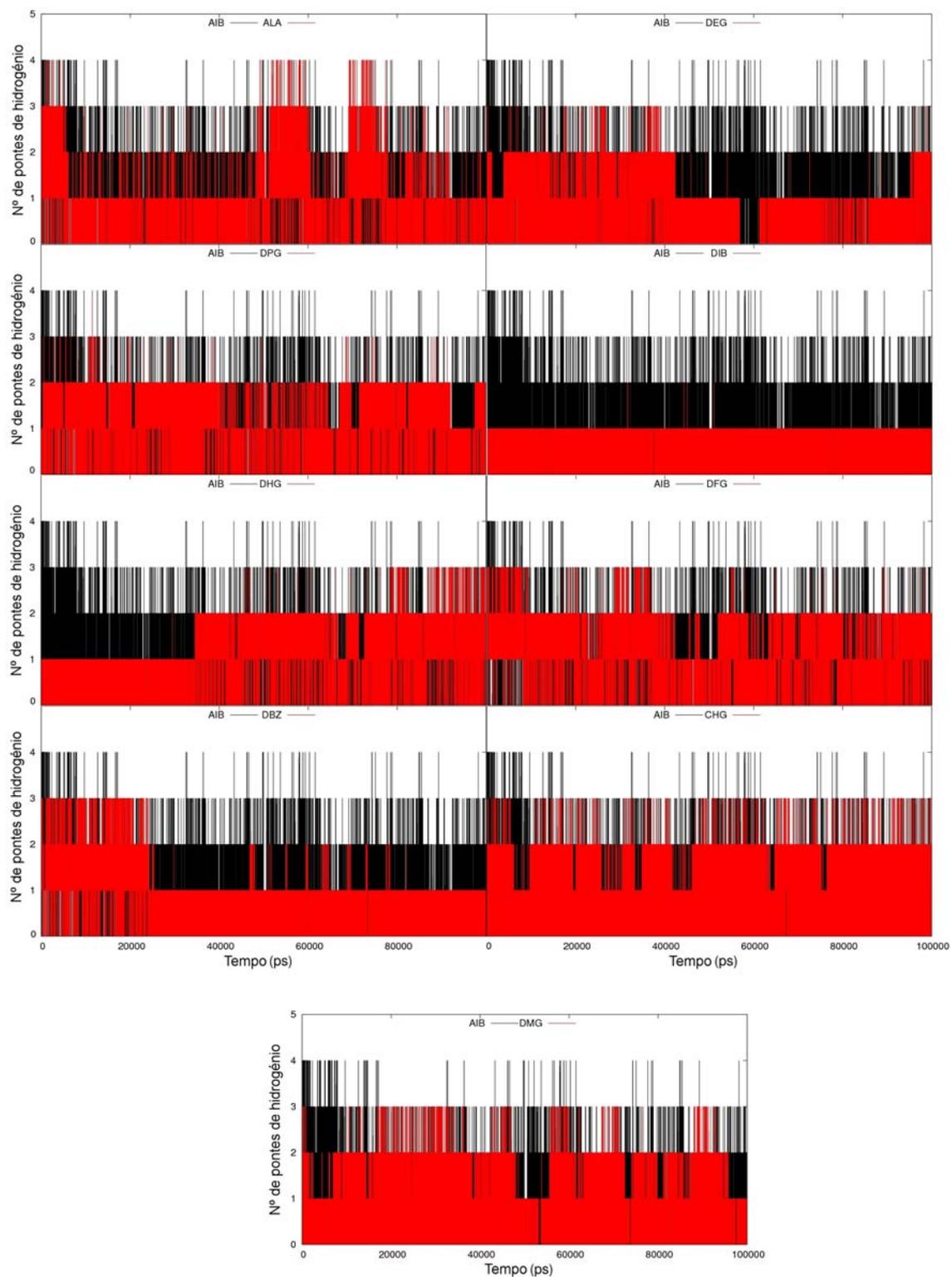
A Figura 41 seguinte apresenta os RMSDs ao longo do tempo, comparando o Pep e cada um dos análogos em água. Este tipo de análise ajuda a compreender melhor a estabilidade do novo péptido em relação ao Pep nativo durante a totalidade da simulação.



**Figura 41.** RMSDs dos  $C\alpha$  dos péptidos em água, ao longo dos 100ns de simulação, comparando o Pep com um análogo sob estudo. *Fitting* dos  $C\alpha$  dos péptidos em relação à estrutura de referência em  $\alpha$ -hélice. Pep representado a preto e análogos a vermelho.

Na Figura 41 observa-se que o Pep atinge rapidamente um equilíbrio após os primeiros 15ns de simulação e mantém uma alternância regular entre estados conformacionais semelhantes entre si. Os péptidos contendo ALA, DEG, DFG, DBZ e DMG, apresentam grande alternância entre estados conformacionais distintos, revelando a instabilidade destes péptidos em água. Os péptidos análogos contendo ALA e DIB, apresentam maior desvio que o Pep, em relação à estrutura helicoidal proposta para o Pep. Os valores de RMSD observados para o péptido com ALA indicam que, analogamente ao que ocorre na Alm com ALA, este aminoácido natural aparenta não estabilizar a estrutura do Pep. O péptido contendo DFG apresenta menor desvio que o Pep e o péptido com CHG apresenta valores de RMSD consideravelmente menores que o Pep. Os demais aminoácidos impõem aos seus péptidos desvios semelhantes ou ligeiramente menores que o observado para o péptido de referência. Estas observações sugerem que o resíduo CHG tem maior capacidade em induzir estados conformacionais do Pep semelhantes a uma estrutura em  $\alpha$ -hélice, do que os restantes aminoácidos testados.

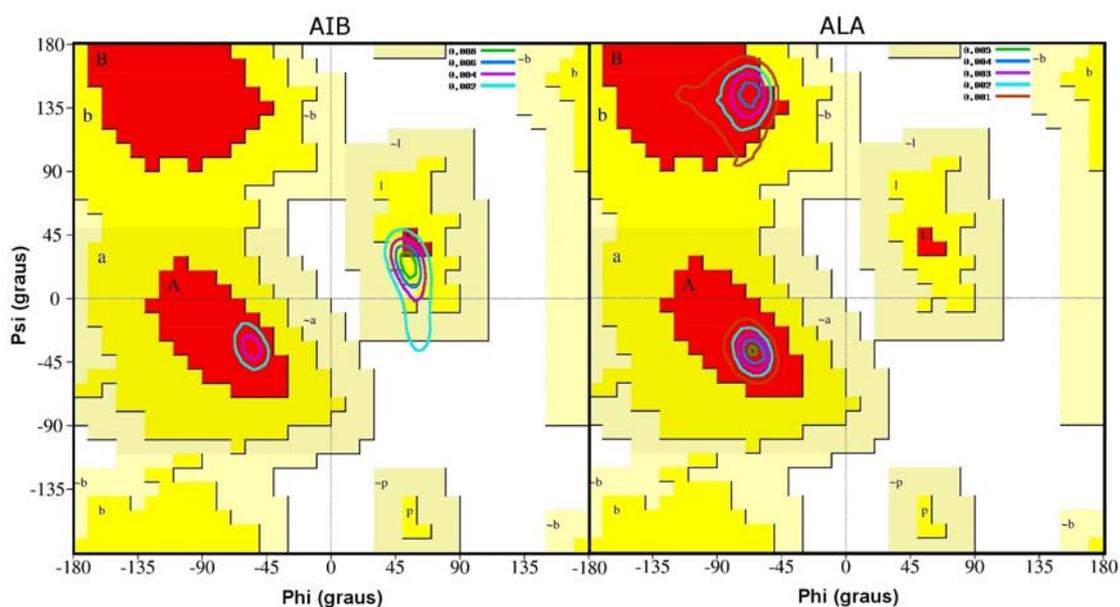
A figura 42 seguinte apresenta os gráficos que relacionam o número de pontes de hidrogénio intramoleculares que se formam durante a simulação do Pep e análogos em água. Uma ponte de hidrogénio é definida pela distância e ângulos entre os grupos dadores e receptores de hidrogénio. Para que se estabeleça uma interação deste tipo, o ângulo formado entre o aceitador, o dador e o hidrogénio tem que ser inferior a  $30^\circ$ , bem como a distância entre o átomo dador e o átomo aceitador deve ser menor que  $3,5\text{\AA}$ .

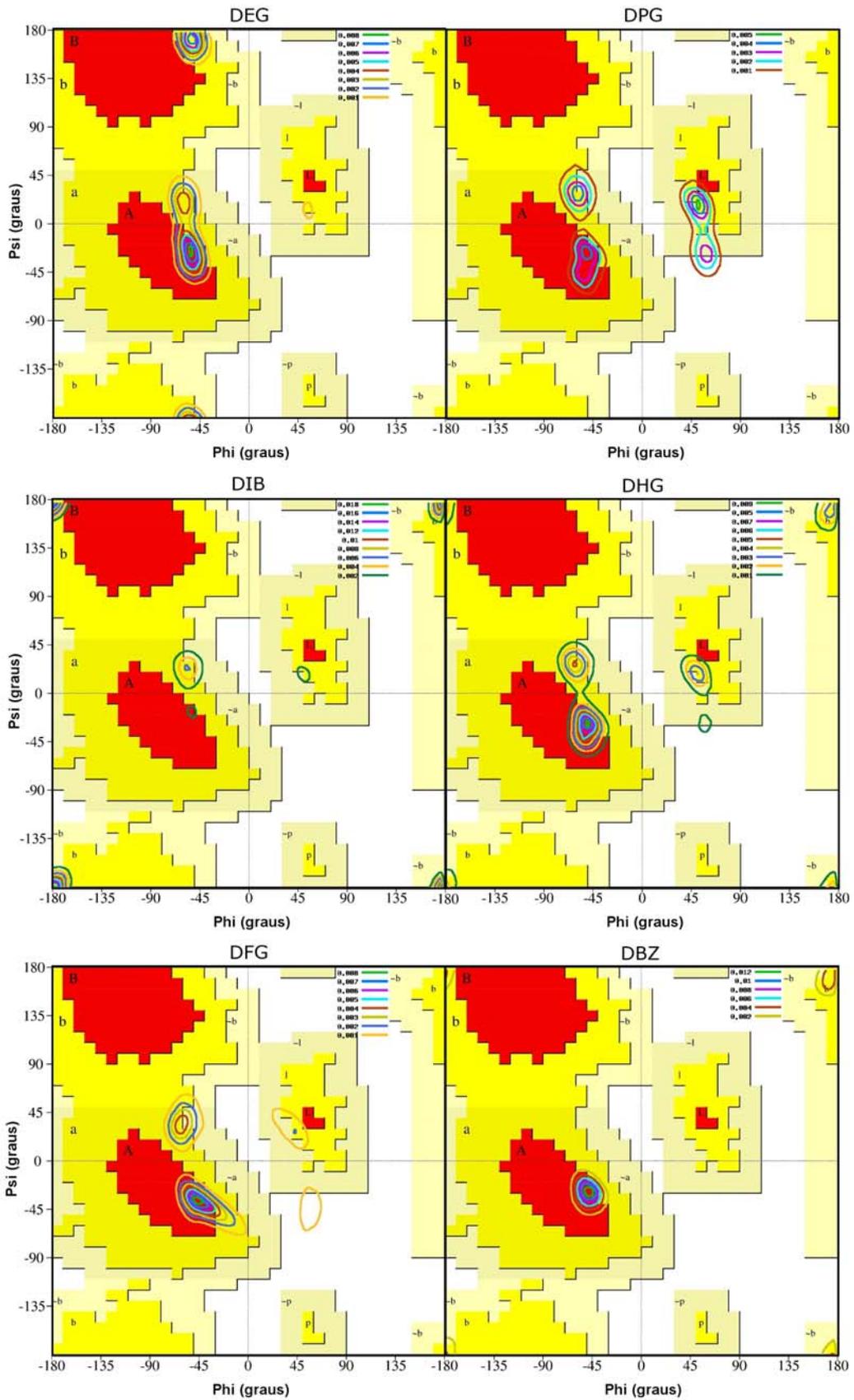


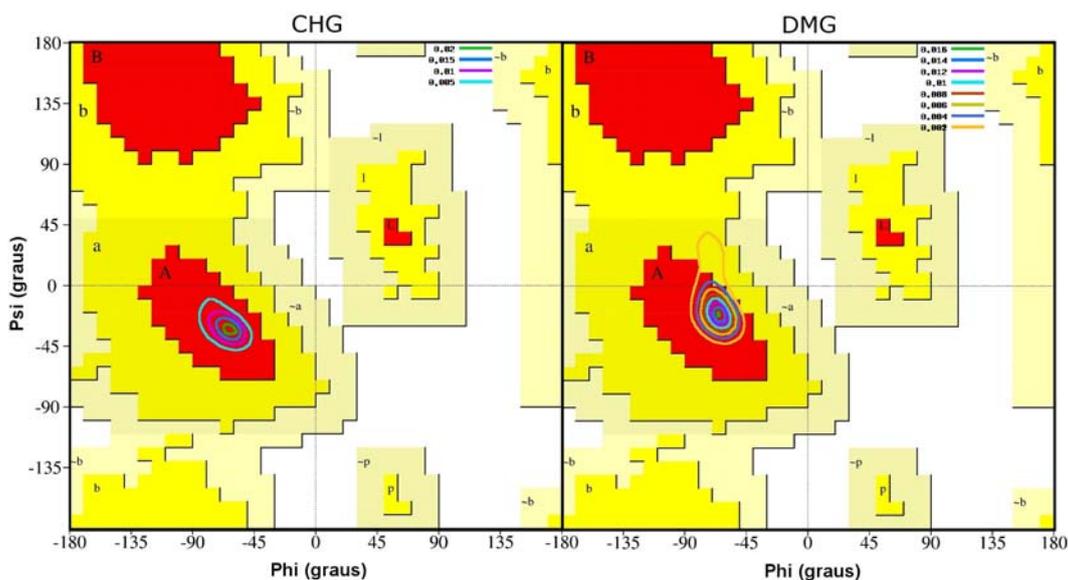
**Figura 42.** Número de pontes de hidrogénio intramoleculares que ocorrem para o Pep e análogos durante a simulação em água. Pep representado a preto e análogos a vermelho.

Ao comparar-se o Pep com AIB aos péptidos análogos, observa-se que o primeiro apresenta recorrentemente durante a simulação, quatro pontes de hidrogénio de quatro possíveis entre os seis resíduos da estrutura do péptido. As quatro pontes de hidrogénio referem-se às possíveis de acontecerem num péptido contendo 6 resíduos quando organizado em  $\alpha$ -hélice. Os demais péptidos dificilmente estruturam-se durante a simulação de forma a serem capazes de formar mais de três pontes de hidrogénio. O péptido contendo o aminoácido não natural DIB só é capaz de estabelecer uma ponte de hidrogénio durante a simulação. Por outro lado, os péptidos contendo DHG, DFG, CHG e DMG, são capazes de estabelecer duas a três ligações de hidrogénio das quatro possíveis na maior parte do tempo em que estão sendo simulados e isto indica que estes péptidos apresentam algum tipo de estruturação intramolecular e certa estabilidade em manter esta estrutura.

Os resultados seguintes dizem respeito à distribuição de ângulos  $\psi$  e  $\phi$  no espaço de Ramachandran, que ocorrem para os aminoácidos de interesse no Pep e análogos, durante as simulações em água e etanol. Estes diagramas de Ramachandran são complementares à análise anterior na medida em que dão indicações da preferência dos aminoácidos por conformações em  $\alpha$ -hélice ou folhas  $\beta$ , para cada um individualmente.







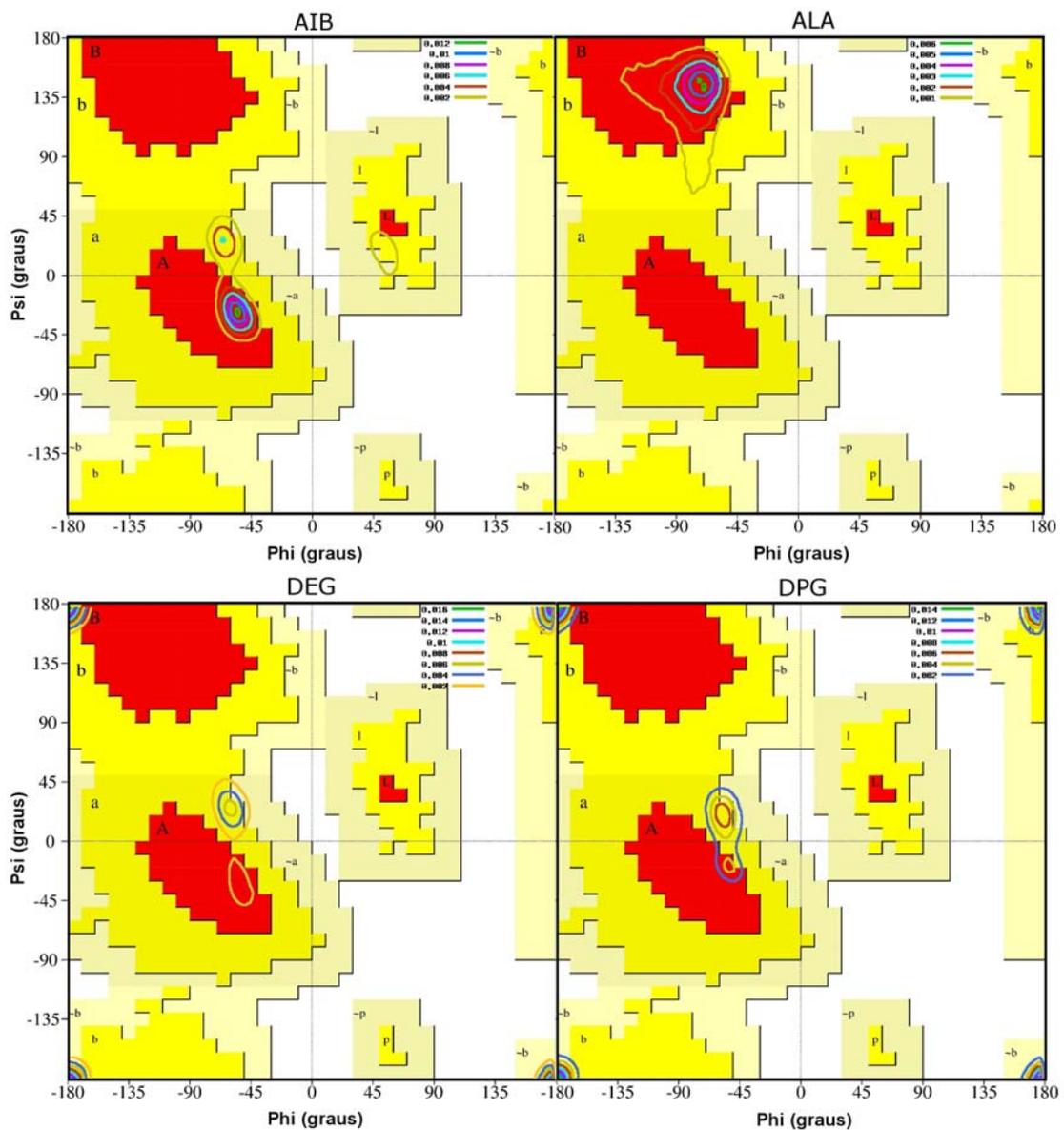
**Figura 43.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os aminoácidos AIB, ALA e as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em água, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

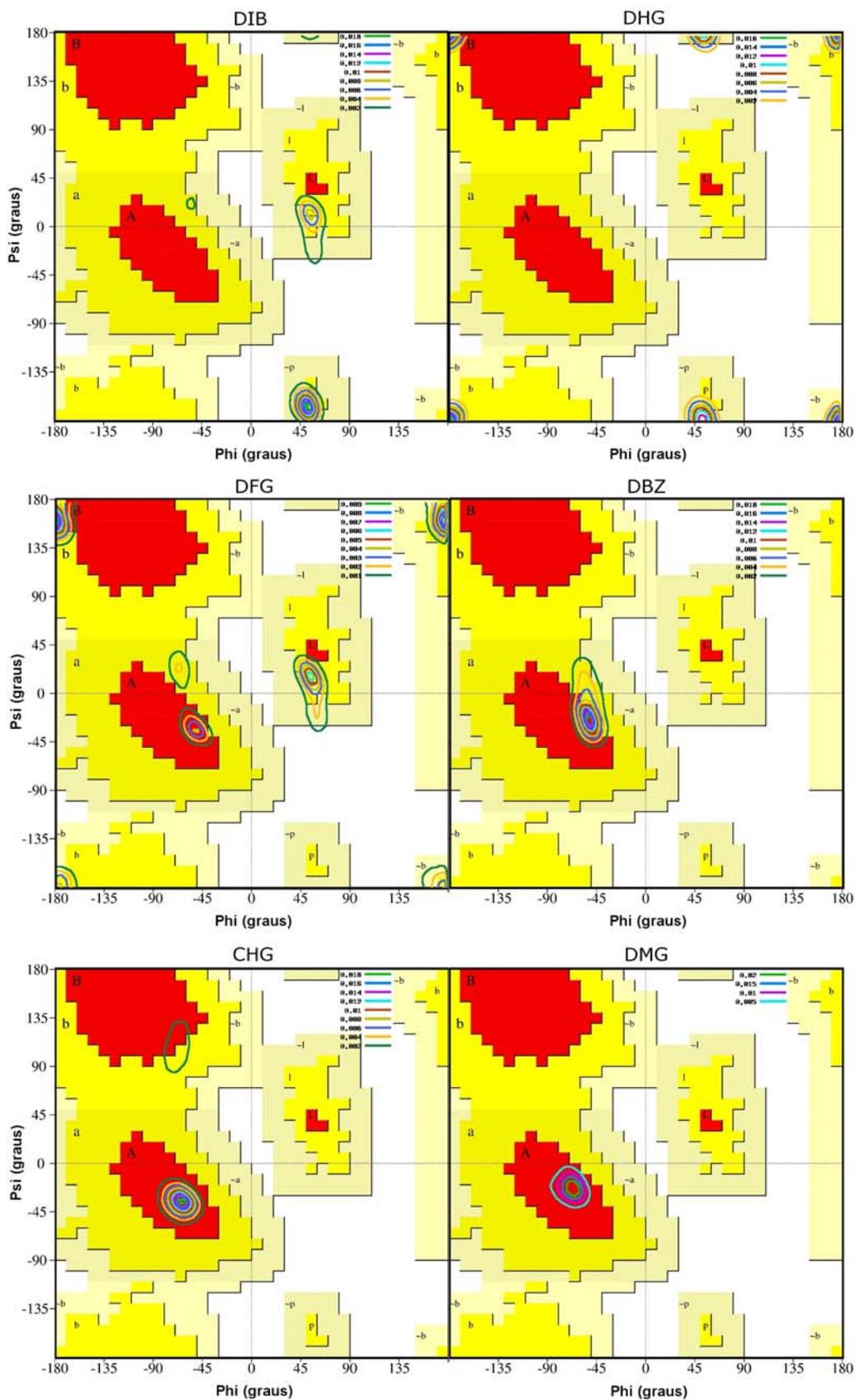
Em água, o AIB presente no Pep apresenta ângulos diedro nas regiões correspondentes à  $\alpha$ -hélices direita e esquerda, enquanto a ALA apresenta os pares de ângulos  $\psi$  e  $\phi$  nas regiões de  $\alpha$ -hélice direita e folhas  $\beta$ . Este resultado é análogo ao observado na Alm, pois a segunda metilação do  $C\alpha$  do AIB elimina a ocorrência de conformações na região de folhas  $\beta$ , típica do aminoácido natural ALA, onde o hidrogénio ligado ao  $C\alpha$  possibilita maior liberdade conformacional. Este resultado também é mais um indicativo que a ALA é menos eficaz em constranger a estrutura do Pep em uma conformação em  $\alpha$ -hélice do que o AIB. No entanto, algumas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas como o DEG, DIB e DHG também apresentam diedros em regiões não exclusivas de  $\alpha$ -hélices, porém também permitidas. Os aminoácidos não naturais DBZ, CHG e DMG são aqueles que quando inseridos no Pep e sob as condições de simulação, apresentam as curvas mais concentradas na região de  $\alpha$ -hélice direita, que corresponde aos diedros típicos observados para a maioria das proteínas conhecidas, constituídas por aminoácidos naturais. Mas o CHG e o DMG são os únicos aminoácidos não naturais que apresentam seus contornos exclusivamente na região de  $\alpha$ -hélice direita.

Destacam-se aqui os aminoácidos DIB, DHG e DBZ que apresentam pares de diedro em  $180^\circ$ , revelando que estes resíduos podem adotar um modelo de conformação estendida e planar em péptidos de pequena dimensão. O aminoácido DFG apresenta ângulos diedros em região proibida, embora isto não devesse ocorrer devido o volume deste resíduo que dificulta

certos tipos de rotação e reajuste nas ligações. De notar também que os aminoácidos AIB, DPG e DHG possuem uma grande população de conformações em  $\alpha$ -hélice esquerda comum nos D-aminoácidos. Esta capacidade de amostrar simultaneamente, configurações comuns aos D- e L-aminoácidos já tinha sido observado para o caso da Alm e constitui uma característica importante revelada por estes aminoácidos.

O Pep e os análogos também foram investigados em etanol, de forma a aferir a capacidade desse meio em reproduzir as condições presentes num meio menos polar, como uma bicamada lipídica. Os contornos que os aminoácidos de interesse apresentam quando inseridos no Pep em etanol estão apresentados nos diagramas de Ramachandran da Figura 44.





**Figura 44.** Contornos da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os aminoácidos AIB, ALA e as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em etanol, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando a totalidade da simulação.

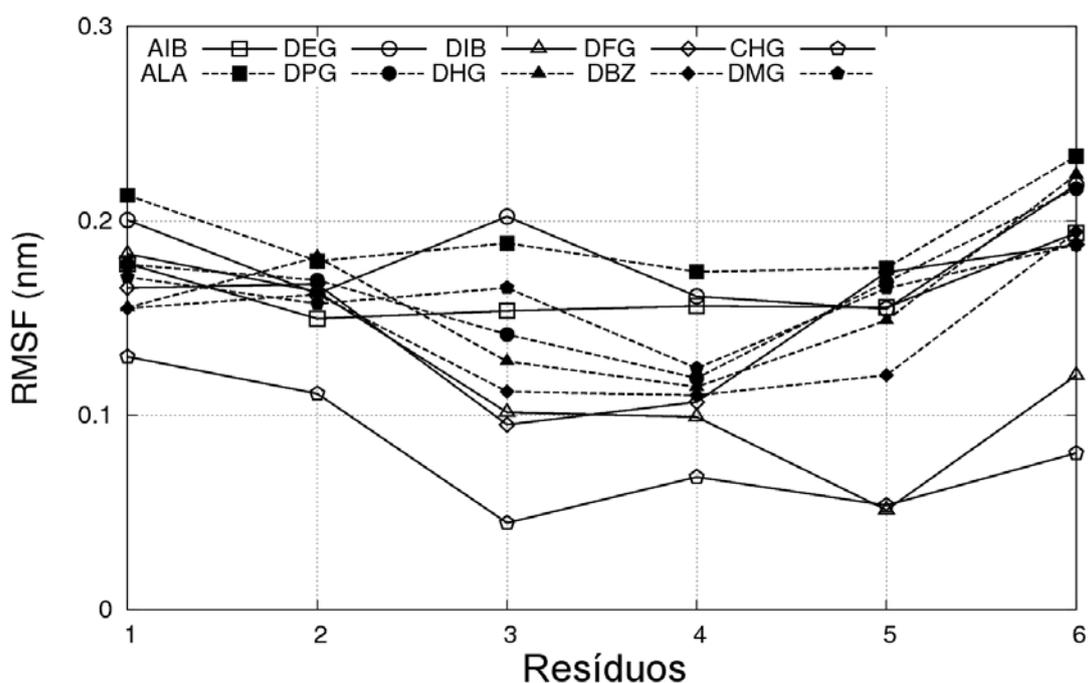
Na Figura 44 observa-se que o AIB concentra-se mais na região de  $\alpha$ -hélice direita do que quando é simulado em água. A ALA passa a apresentar os diedros  $\psi$  e  $\phi$  apenas na região de folhas  $\beta$ . As  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas DEG, DPG, DIB, DHG e DFG apresentam os diedros espalhados por várias regiões permitidas, mas nem sempre relacionadas a uma estrutura secundária bem definida. O aminoácido CHG, quando inserido no Pep em etanol, apresenta as curvas do diagrama de Ramachandran nas regiões de  $\alpha$ -hélice direita e de folhas  $\beta$  e isto pode ser um indicativo que o CHG é ideal para a pré-organização do péptido em água, alterando-se um pouco num meio menos polar. Apenas os aminoácidos não naturais DBZ e DMG apresentam as curvas exclusivamente na região de  $\alpha$ -hélice direita, tal como observado em água.

Os péptidos quando inseridos em etanol, deveriam apresentar estrutura mais estável e constrangida, uma vez que trata-se de um meio mais apolar e, portanto, compatível com os péptidos predominantemente apolares. Em outras palavras, na ausência do efeito hidrofóbico causado pela água, os resíduos da cadeia peptídica deveriam ser capazes de interagir mais eficientemente entre si para estabilizar sua estrutura secundária. No entanto, para os aminoácidos sob estudo não é observado um padrão de comportamento coerente quando os péptidos estão inseridos em etanol e isto pode indicar que este solvente não mimetiza devidamente um meio mais apolar, como uma membrana lipídica genérica.

## **4.2 Propriedades Dinâmicas**

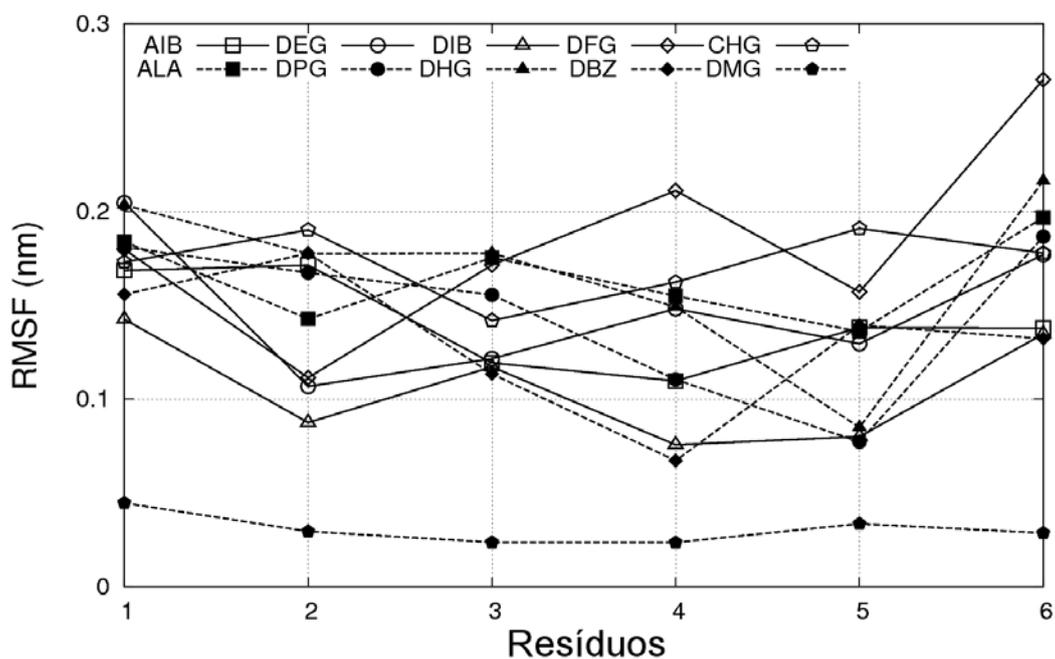
Os resultados obtidos das análises às propriedades dinâmicas dos sistemas têm o papel de complementar as análises estruturais para que se compreenda as mudanças conformacionais e a flexibilidade de cada região dos péptidos sob estudo. O RMSF é uma ferramenta complementar ao RMSD e a sua interpretação pode ser entendida como uma medida da flexibilidade do sistema simulado.

Neste sentido, as Figuras 45 e 46 seguintes apresentam o RMSF do Pep e dos análogos simulados durante 100ns em água e etanol.



**Figura 45.** RMSF do C $\alpha$  de cada resíduo do Pep e análogos simulados em água durante 100ns. A posição do AIB, da ALA e das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas corresponde aos resíduos 3 e 5, os restantes correspondem aos resíduos de Leucina e aos terminais ACE e PHOL do Pep (veja Figura 9).

Na Figura 45, as posições que contém o resíduo de AIB ou as novas glicinas dissustituídas correspondem às posições 3 e 5 do Pep e respectivos análogos. Em água, o análogo contendo CHG apresenta as menores flutuações em relação a estrutura de referência. O análogo contendo DIB, também apresenta baixos valores de RMSF. Estes resultados demonstram que um péptido pode apresentar baixos desvios estruturais (Figura 39) mas oscilar bastante em torno da posição de referência. Por outro lado, no caso do Pep com DIB, este apresenta elevado RMSD (Figura 39), mas oscilar pouco, demonstrando tratar-se de um péptido que afasta-se muito da estrutura de referência, mas equilibra-se em outro tipo de conformação.



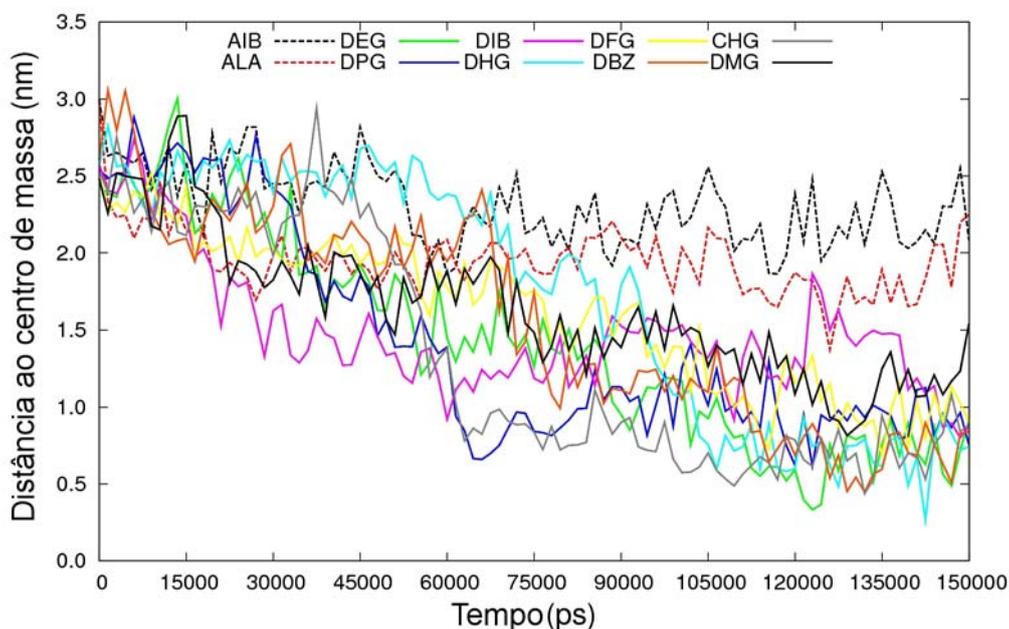
**Figura 46.** RMSF do C $\alpha$  de cada resíduo do Pep e análogos simulados em etanol durante 100ns. A posição do AIB, da ALA e das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas corresponde aos resíduos 3 e 5, os restantes correspondem aos resíduos de Leucina e aos terminais ACE e PHOL do Pep (veja Figura 9).

Em etanol, o análogo contendo DMG apresenta as menores flutuações em relação a estrutura de referência. Este resultado é curioso na medida em que o péptido com DMG é o mais polar dos sistemas sob estudo e está sendo simulado num meio menos polar que a água. As características menos polares do meio poderiam tornar mais difícil a solvatação dos grupos polares do DMG esperando-se um comportamento mais flexível.

### 4.3 Inserção em Membrana

O estudo da inserção em membrana do Pep e dos análogos modelados permite avaliar capacidade de formar canais transmembranares e discutir o mecanismo de ação antibiótica deste péptido. O Pep e demais péptidos foram colocados na fase aquosa, junto à membrana de POPC, em três posições distintas (terminal-N próximo à membrana, terminal-C próximo à membrana e uma terceira posição aleatória), de forma a avaliar a inserção espontânea do péptido na membrana, ou seja, nenhuma força foi aplicada para iniciar o processo de inserção. Estas experiências foram realizadas durante 150ns. e para cada péptido houve, aparentemente, uma orientação preferencial de entrada na membrana. Na Figura 47 é mostrada a distância

entre o centro de massa da cada um dos péptidos e o plano paralelo à membrana que passa pelo centro de massa da membrana, medido durante os 150ns de simulação em água + POPC.



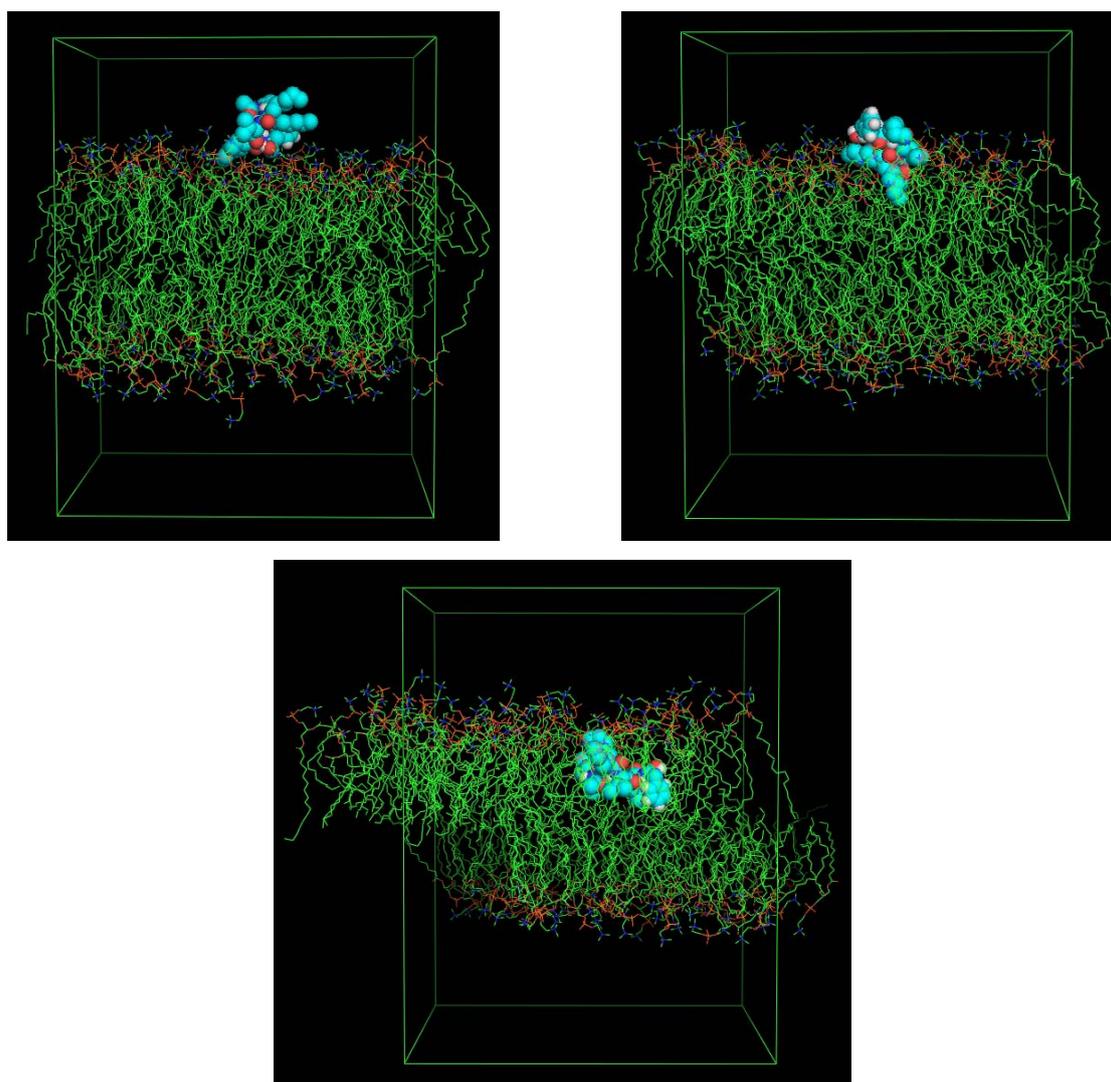
**Figura 47.** Distância ao centro de massa da membrana que o Pep os análogos percorreram ao longo dos 150ns de simulação no sistema água + POPC.

A Figura 47 mostra claramente que o Pep substituído pela maior parte dos novos aminoácidos não naturais insere-se espontaneamente dentro da membrana. Este fenómeno é bastante favorecido uma vez que ocorre relativamente depressa durante um tempo relativamente curto de simulação para este tipo de sistema e processo.

Nas condições simuladas, o péptido contendo DHG foi aquele que mais se inseriu na membrana. Outros aminoácidos que promovem boas inserções são o CHG, DEG, DPG, DBZ e DFG. Entretanto, ressalta-se que a distância percorrida pelos péptidos contendo estes aminoácidos não naturais é bastante semelhante. A inserção em membrana revela a eficiência dos aminoácidos na interação com o meio, mesmo que haja desvio estrutural do péptido em relação a estrutura inicial em água. Os péptidos de referência, o Pep e o Pep com ALA, foram os que menos se inseriram, o que indica que qualquer nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina demonstrou ser mais apropriada para promover a inserção dos péptidos na membrana. Das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo, a DMG, promoveu a inserção menos efetiva e isto é coerente com o fato deste aminoácido formar o péptido mais polar dentre os sistemas investigados. Logo,

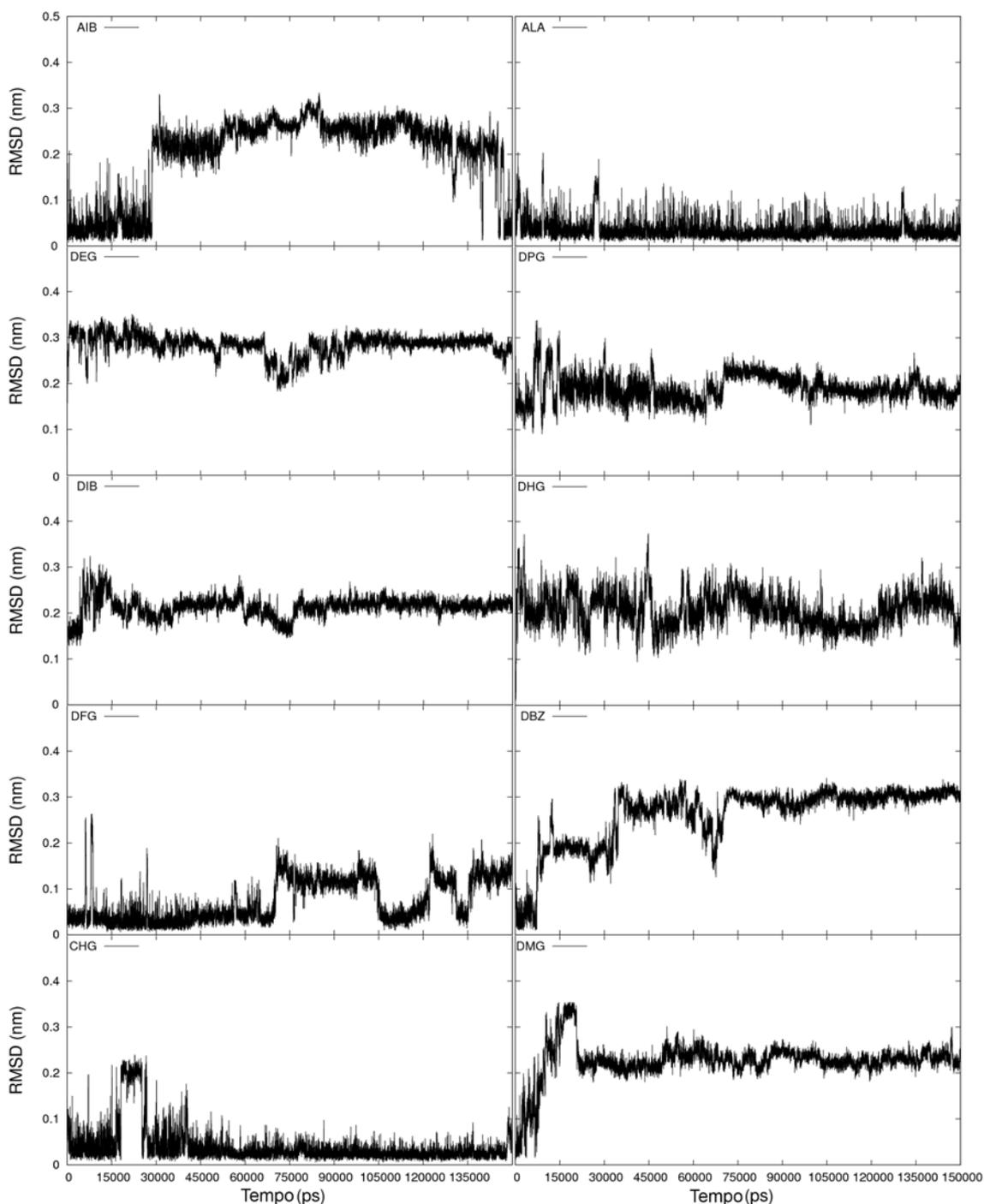
o péptido constituído por este aminoácido deve preferir a interação com as cabeças polares dos fosfolípidos, não sendo, portanto, energeticamente favorável a entrada na membrana.

A Figura 48, seguinte, ilustra a inserção do Pep com DHG na membrana POPC, em três momentos diferentes (início, meio e fim da simulação). As moléculas de água foram omitidas para melhor visualização e o péptido está representado em esferas também para melhor entendimento das imagens.



**Figura 48.** Imagens ilustrativas da inserção do Pep com DHG em membrana POPC. Esquema de cores segundo a convenção definida na Figura 5. O péptido em questão contendo o resíduo DHG está destacado com os carbonos em azul-ciano.

A Figura 48 ilustra a inserção do Pep com DHG na membrana POPC. Nesta Figura, a célula está em destaque para que fique evidente a camada de água presente no sistema. Fica claro que a inserção é efetiva, no entanto, é necessário compreender como se comportam as propriedades estruturais e dinâmicas deste e dos demais péptidos quando inseridos, total ou parcialmente, neste meio. Para tal, foram avaliadas propriedades como o RMSD, o RMSF e o n° de pontes de hidrogénio ao longo de tempo, e as distribuições de diedros no diagrama de Ramachandran para cada um dos sistemas sob estudo. Note que, o processo de inserção é distinto para cada péptido, portanto, essas análises nada dizem sobre o momento em que o péptido começa a entrar na membrana ou o momento em que está completamente ou quase completamente inserido.



**Figura 49.** RMSD dos C $\alpha$  do Pep e análogos sob estudo em água + POPC. A amostragem considerou a totalidade da simulação. *Fitting* dos C $\alpha$  em relação à estrutura de partida do Pep modelada em  $\alpha$ -hélice.

Nos gráficos da Figura 49, os valores de RMSD apresentados avaliam o desvio dos péptidos em relação a uma estrutura de referência em  $\alpha$ -hélice. Nestes gráficos observam-se os RMSDs dos C $\alpha$  dos péptidos ao longo do tempo de simulação. As alterações nesta medida refletem a passagem do péptido da água para a membrana. Acredita-se que a proximidade dos

péptidos com a membrana promova reestruturação e estabilidade à estrutura de alguns péptidos e, por isso, os péptidos contendo ALA, DEG, DPG, DIB, DHG e CHG apresentam valores de RMSD semelhantes do início ao fim dos 150ns de simulação.

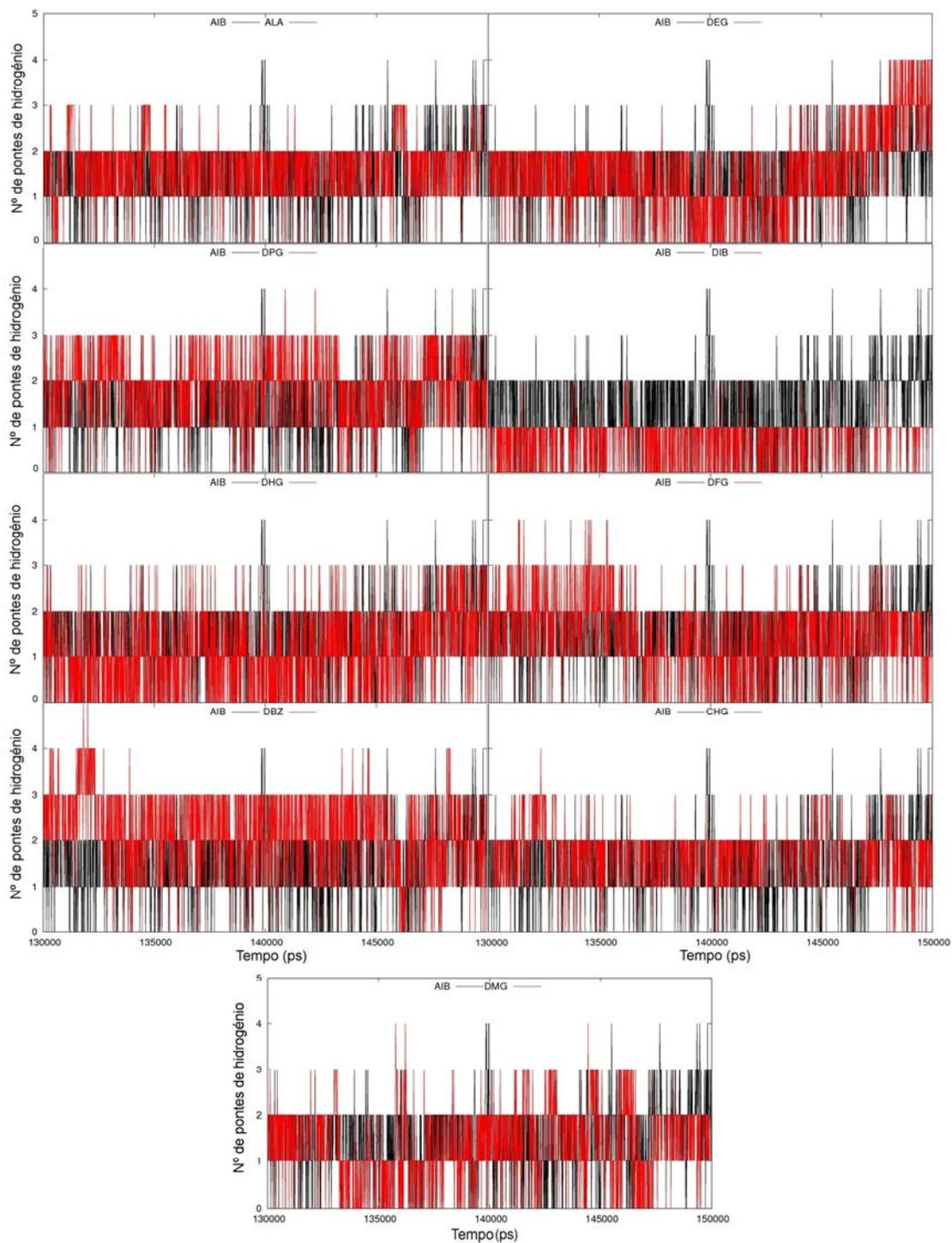
Os péptidos contendo DFG e DBZ aparentam sofrer maiores desvios ao entrar na membrana, provavelmente por este meio ser significativamente apolar. Os resíduos DFG e DBZ são bastante volumosos e devem causar alguma perturbação à membrana, que por sua vez, impõe aos péptidos que contêm estes aminoácidos reorganização estrutural e, portanto, maiores desvios em relação à estrutura de partida.

O péptido contendo DMG apresenta comportamento mais coerente durante a tentativa de inserção em POPC, os valores de RMSD são menores em água e mais elevados próximos do POPC. Este facto é coerente com a ancoragem e estabilização do péptido junto às cabeças polares dos fosfolípidos da membrana.

Destacam-se os péptidos contendo ALA e CHG que apresentam os menores desvios estruturais entre os péptidos sob estudo, durante a inserção em POPC. O pequeno volume destes aminoácidos pode ser a causa deste efeito ou este tipo de membrana pode estabilizar mais eficientemente péptidos contendo esses dois aminoácidos.

O Pep com AIB demonstrou sofrer desestabilização ao inserir-se na membrana, mas no final da simulação volta a apresentar baixos valores de RMSD, o que pode ser um indicativo de nova reequilibração do sistema e de que o processo de inserção não está completamente terminado.

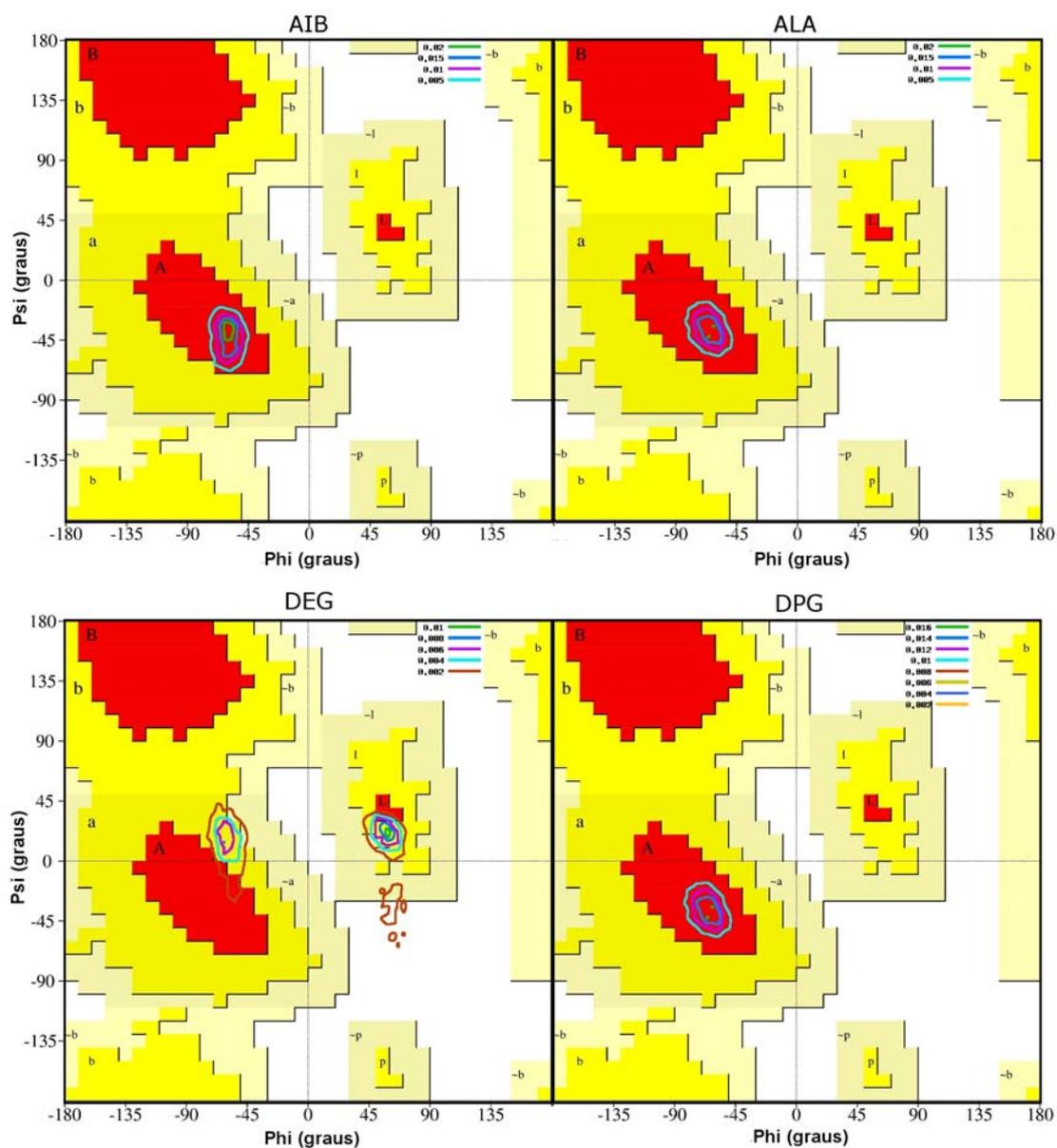
As análises do número de pontes de hidrogénio e dos diagramas de Ramachandran foram implementadas apenas para os últimos 20ns de simulação, de forma a garantir que as propriedades de interesse seriam investigadas com os péptidos total ou parcialmente inseridos na membrana.

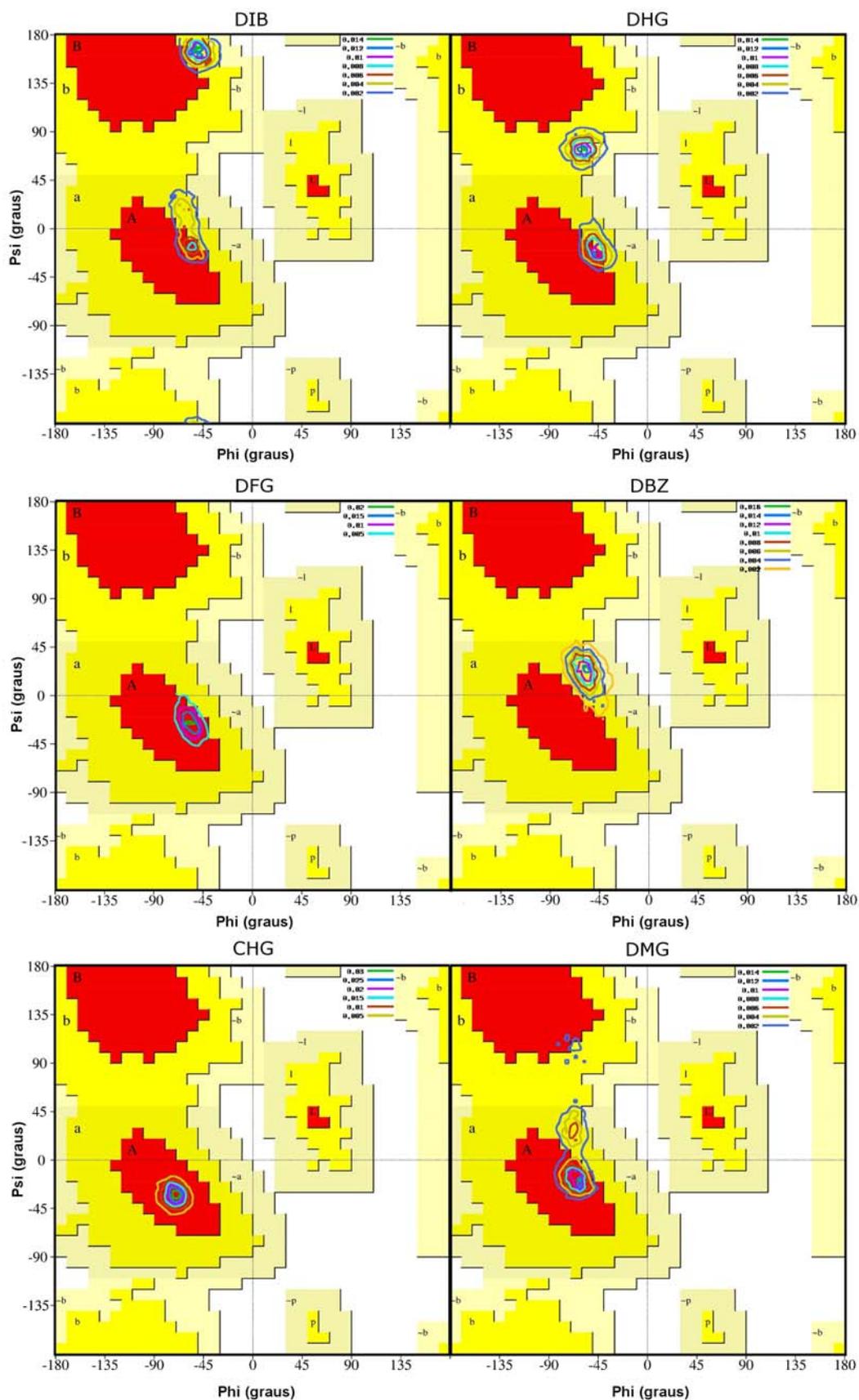


**Figura 50.** Gráficos do número de pontes de hidrogénio que ocorrem para o Pep e análogos durante a simulação em POPC (últimos 20ns da simulação).

Na Figura 50, o Pep é comparado aos demais péptidos sob estudo no número de pontes de hidrogénio que se formam nos últimos 20ns de simulação em POPC. Neste meio, é observado um maior número de péptidos a apresentarem entre duas a quatro pontes de hidrogénio de quatro possíveis, em contraste ao verificado em água. Estes resultados indicam que os péptidos contendo DPG, DEG, DHG e CHG, por exemplo, apresentam maior estruturação intramolecular e estabilidade durante a maior parte desses 20ns finais.

A figura 51 apresenta os Diagramas de Ramachandran para o aminoácido de interesse inserido no Pep e nos análogos simulados em POPC.

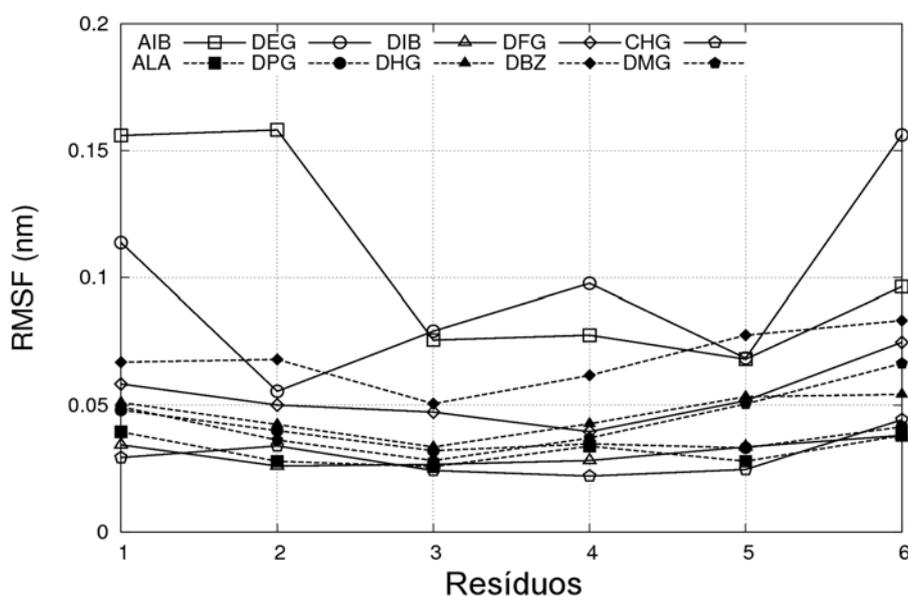




**Figura 51.** Distribuição da densidade de probabilidade dos pares de diedros  $\phi$  e  $\psi$  para os aminoácidos AIB, ALA e as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas inseridas no Pep em POPC, sobrepostos ao diagrama de Ramachandran. A amostragem foi feita usando os últimos 20ns da simulação.

Na Figura 51 observa-se que os péptidos apresentam ângulos  $\varphi$  e  $\psi$  diferentes daqueles observados em etanol (Figura 44), onde estes ângulos estão dispersos em várias regiões diferentes do diagrama de Ramachandran. Os péptidos contendo AIB, ALA, DPG, DFG e CHG apresentam configurações exclusivamente na região de  $\alpha$ -hélice direita, quando inseridos em POPC. O péptido análogo contendo DEG, apresenta um pequeno conjunto de pares  $\varphi$  e  $\psi$  numa região que não é populada pelos aminoácidos naturais. Os péptidos contendo DHG, DIB e DMG, apresentam diedros nas regiões de  $\alpha$ -hélice direita e folhas  $\beta$  e, o péptido contendo CHG é aquele que apresenta uma maior densidade de configurações na região de  $\alpha$ -hélice direita. Parece claro que este resíduo é aquele que tem maior tendência em adotar uma configuração em  $\alpha$ -hélice, independentemente do meio em que se encontre.

No que diz respeito às propriedades dinâmicas dos péptidos sob estudo em POPC, a Figura 52 seguinte apresenta os resultados de RMSF, para os últimos 20ns de simulação em membrana. As posições correspondentes ao AIB, a ALA ou a uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina na sequência peptídica, são as posições 3 e 5.



**Figura 52.** RMSF dos C $\alpha$  do Pep e análogos modelados, em POPC, durante os últimos 20ns de simulação.

Na Figura 52 fica evidenciado que os péptidos contendo AIB e DEG são aqueles que sofrem as maiores flutuações durante a simulação em POPC. Os péptidos contendo CHG, DIB e ALA são aqueles com menores valores de RMSF. Mas, de uma maneira geral, sob as condições de simulação, todos os péptidos apresentam flutuações significativamente inferiores às observadas em água, pois nenhum deles ultrapassa os 0.17nm.

#### 4.4 Conclusões

O primeiro ponto a destacar a respeito do Pep e análogos estudados, diz respeito ao facto de que alguns aminoácidos não naturais incorporados no Pep comportam-se de maneira distinta ao observado quando estão inseridos na Alm. Isto significa que o contexto onde estes aminoácidos estão inseridos determina as suas preferências estruturais. Ressalta-se que a Alm contém 21 resíduos, enquanto o Pep apenas 6, e as interações que os resíduos estabelecem uns com os outros é fundamental para o arranjo estrutural dos péptidos. Parece existir uma maior liberdade conformacional no Pep e análogos, pois trata-se de peptaibols simples, baseados em leucinas, com apenas dois resíduos de uma nova  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicina.

Em água, o aminoácido não natural CHG é o que impõe uma estrutura mais próxima da forma em  $\alpha$ -hélice quando incorporado no Pep. Neste péptido, outras  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas também constroem melhor a estrutura dos péptidos em água do que o AIB, é o caso do DFG, DHG e DMG. Em termos estruturais e de pré-organização, observou-se que há péptidos capazes de manterem-se em  $\alpha$ -hélice mais eficientemente que o Pep nativo. Mais ainda, no Pep e na Alm, algumas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas demonstram preferir impor outro tipo de conformação, nomeadamente, uma forma distendida para o caso do DPG, DIB e DHG.

Em etanol, apenas os análogos do Pep contendo DBZ e DMG apresentam maior constrangimento estrutural em  $\alpha$ -hélice que o Pep nativo.

Nos sistemas água + POPC, o Pep contendo DHG foi aquele em que o processo de inserção na membrana foi mais espontâneo, durante o intervalo de tempo simulado. Relembra-se que o DHG é uma das escolhas preferidas para a construção de uma Alm com maior estabilidade termodinâmica em membrana. Outros aminoácidos que facilitam a inserção do Pep são o CHG, DEG, DPG, DBZ e DFG. Das novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo, a DMG, promoveu a inserção menos efetiva do Pep e desestabilização da Alm. Esta evidência é coerente com o facto deste aminoácido formar o péptido mais polar dentre os sistemas investigados.

A incorporação de aminoácidos naturais, como por exemplo a ALA, na estrutura dos péptidos sob estudo acarreta maior liberdade conformacional e origina os análogos menos estruturados em água. Esta observação reforça as vantagens do uso de aminoácidos não naturais, como as  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas, na modelação de péptidos constrangidos estruturalmente e este facto, confere a estes novos aminoácidos o potencial de serem usados como *foldamers* estruturais.

Reforça-se que os novos aminoácidos DHG e CHG são aqueles que mais capazes de induzir conformações em  $\alpha$ -hélice na Alm e no Pep, para além de facilitarem o processo de inserção/estabilização termodinâmica dos péptidos em membrana.

Fica claro, agora, que o uso desta nova coleção de aminoácidos não naturais na construção de péptidos/proteínas com atividade terapêutica é vantajoso, sendo que as  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas DHG e CHG demonstraram ser duas das melhores opções para o constrangimento estrutural e a estabilidade dinâmica e termodinâmica.

Perspectivas futuras que surgem após a conclusão deste trabalho dizem respeito à síntese de alguns dos péptidos por grupos experimentalistas parceiros a este laboratório, bem como futuros ensaios biológicos em membranas ricas em POPC.

## 5 Referências Bibliográficas

1. Bailey, P. D., *An Introduction to Peptide Chemistry*. John Wiley & Sons: 2001.
2. Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M., Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 781-789.
3. Chen, T., Formulation concerns of protein drugs. *Drug Dev Ind Pharm* **1992**, *18*, 1311-1354.
4. Silva, C.; Ribeiro, A.; Ferreira, D.; Veiga, F., Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. *Rev. Bras. Cienc. Farm* **2002**, *38*, 125-140.
5. Emmons, T. K.; Murali, R.; Greene, M. I., Therapeutic peptides and peptidomimetics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 435-441.
6. Giannis, A.; Kolter, T., Peptidomimetics for receptor ligands - discovery, development, and medical perspectives. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **1993**, *32*, 1244-1267.
7. Grauer, A.; König, B., Peptidomimetics - a versatile route to biologically active compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5099-5111.
8. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J., Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *12*, 292-296.
9. Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Squassabia, F., Peptides and peptidomimetics in medicine, surgery and biotechnology. *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 2449-2466.
10. Brange, J., The new era of biotech insulin analogues. *Diabetologia* **1997**, *40*, S48-S53.
11. Yamashita, A.; Norton, E. B.; Kaplan, J. A.; Niu, C.; Loganzo, F.; Hernandez, R.; Beyer, C. F.; Annable, T.; Musto, S.; Discafani, C.; Zask, A.; Ayrál-Kaloustian, S., Synthesis and activity of novel analogs of hemiasterlin as inhibitors of tubulin polymerization: modification of the A segment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5317-5322.
12. Hancock, R. E. W.; Brown, K. L.; Mookherjee, N., Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* **2006**, *211*, 315-322.
13. Bulet, P.; Stocklin, R.; Menin, L., Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 169-184.
14. Shai, Y., Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **2002**, *66*, 236-248.

15. Zasloff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **2002**, *415*, 389-395.
16. Marr, A. K.; Gooderham, W. J.; Hancock, R. E. W., Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 468-472.
17. Lohner, K.; Staudegger, E., *Development of novel antimicrobial agents: emergin strategies*. Garland Publishing: 2001.
18. Whitmore, L.; Wallace, B. A., The peptaibol database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D593-D594.
19. Chugh, J. K.; Wallace, B. A., Peptaibols: models for ion channels. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 565-570.
20. Whitmore, L.; Wallace, B. A. Peptaibol Database. <http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/home.shtml>.
21. Bechinger, B., The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **1999**, *1462*, 157-183.
22. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y., Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27-55.
23. Baumann, G.; Mueller, P., A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* **1974**, *2*, 538-557.
24. He, K.; Ludtke, S. J.; Worcester, D. L.; Huang, H. W., Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2659-2666.
25. Hancock, R. E. W.; Chapple, D. S., Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317-1323.
26. Brogden, K. A., Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238-250.
27. Fu, Y.; Hammarström, L. G. J.; Miller, T. J.; Fronczek, F. R.; McLaughlin, M. L.; Hammer, R. P., Sterically hindered  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids: synthesis from  $\alpha$ -nitroacetate and incorporation into peptides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7118-7124.
28. Meyer, C. E.; Reusser, F., A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. *Experientia* **1967**, *23*, 85-86.

29. Santagada, V.; Fiorino, F.; Perissutti, E.; Severino, B.; Filippis, V. D.; Vivenzio, B.; Caliendo, G., Microwave-enhanced solution coupling of the  $\alpha,\alpha$ -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5171-5173.
30. Ellis, T. K.; Martin, C. H.; Ueki, H.; Soloshonok, V. A., Efficient, practical synthesis of symmetrically  $\alpha,\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1063-1066.
31. Kaul, R.; Balam, P., Stereochemical control of peptide folding. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 105-117.
32. Valle, G.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Toniolo, C., Structural versatility of peptides from  $C^{\alpha,\alpha}$ -disubstituted glycines. Preferred conformation of the  $C^{\alpha,\alpha}$ -dibenzylglycine residue. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 1481-1487.
33. Schrodinger, L., The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. 2010.
34. Fox, R. O.; Richards, F. M., A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of Alamethicin at 1.5-A resolution. *Nature* **1982**, *300*, 325-330.
35. Pandey, R. C.; Cook, J. C.; Rinehart, K. L., High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of Alamethicins I and II. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *70*, 8469-8483.
36. Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C.; Sansom, M. S. P., Surface binding of Alamethicin stabilizes its helical structure: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 3186-3191.
37. Dempsey, C. E.; Handcock, L. J., Hydrogen-bond stabilities in membrane-reconstituted Alamethicin from amide-resolved hydrogen-exchange measurements. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1777-1788.
38. North, C. L.; Barranger-Mathys, M.; Cafiso, D. S., Membrane orientation of the N-terminal segment of Alamethicin determined by solid-state  $^{15}\text{N}$  NMR. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2392-2397.
39. He, K.; Ludtke, S. J.; Heller, W. T.; Huang, H. W., Mechanism of Alamethicin insertion into lipid bilayers. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2669-2679.
40. Huang, H. W.; Wu, Y., Lipid-alamethicin interactions influence alamethicin orientation. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1079-1087.
41. Vogel, H., Comparison of the conformation and orientation of Alamethicin and Melittin in lipid membranes. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4562-4572.

42. Franklin, J. C.; Ellena, J. F.; Jayasinghe, S.; Kelsh, L. P.; Cafiso, D. S., Structure of micelle-associated Alamethicin from  $^1\text{H}$  NMR. Evidence for conformational heterogeneity in a voltage-gated peptide. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4036-4045.
43. Okazaki, T.; Sakoh, M.; Nagaoka, Y.; Asami, K., Ion channels of Alamethicin dimer N-terminally linked by disulfide bond. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 267-273.
44. Thogersen, L.; Schiott, B.; Vosegaard, T.; Nielsen, N. C.; Tajkhorshid, E., Peptide aggregation and pore formation in a lipid bilayer: a combined coarse-grained and all atom molecular dynamics study. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4337-4347.
45. Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C.; Sansom, M. S. P., An Alamethicin channel in a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1757-1769.
46. Tieleman, D. P.; Hess, B.; Sansom, M. S. P., Analysis and evaluation of channel models: simulations of Alamethicin. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 2393-2407.
47. Dathe, M.; Kaduk, C.; Tachikawa, E.; Melzig, M. F.; Wenschuh, H.; Bienert, M., Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1370*, 175-183.
48. Fonteriz, R. I.; López, M. G.; Garcia-Sancho, J.; Garcia, A. G., Alamethicin channel permeation by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  in bovine chromaffin cells. *FEBS Letters* **1991**, *283*, 89-92.
49. Artalejo, A. R.; Montiel, C.; Sanchez-Garcia, P.; Uceda, G.; Guantes, J. M.; Garcia, A. G., Alamethicin-evoked catecholamine release from cat adrenal glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *169*, 1204-1210.
50. Bruckner, H.; Graf, H.; Bokel, M., Paracelsin - Characterization by NMR-spectroscopy and circular-dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma-Reesei*. *B. Experientia* **1984**, *40*, 1189-1197.
51. Okuda, M.; Iida, A.; Uesato, S.; Nagaoka, Y.; Fujita, T.; Takaishi, Y.; Terada, H., Fungal metabolites .10. The effect of peptide antibiotics, Trichosporin-Bs, on the respiratory activity of mitochondria. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 482-485.
52. Hülsmann, H.; Heinze, S.; Ritzau, M.; Schlegel, B.; Gräfe, U., Isolation and structure of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1055-1058.
53. Crisma, M.; Barazza, A.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Kamphuis, J.; Toniolo, C., Peptaibolin: synthesis, 3D-structure, and membrane modifying properties of the natural antibiotic and selected analogues. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2813-2825.

54. Karplus, M.; McCammon, J. A., Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 646-652.
55. van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glattli, A.; Hunenberger, P. H.; Kastenholtz, M. A.; Ostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F. A.; Yu, H. B., Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2006**, *45*, 4064-4092.
56. Huang, W.; Lin, Z.; van Gunsteren, W. F., Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to  $\beta$ -Peptide Folding. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 1237-1243.
57. Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E., GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.
58. Steinbach, P. J. Introduction to macromolecular simulations. [http://cmm.cit.nih.gov/intro\\_simulation/intro\\_simulation.pdf](http://cmm.cit.nih.gov/intro_simulation/intro_simulation.pdf) (accessed 27/06/2011).
59. Tironi, I. G.; Sperb, R.; Smith, P. E.; Vangunsteren, W. F., A generalized reaction field method for molecular dynamics simulations *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 5451-5459.
60. Spoel, D. v. d.; Lindahl, E.; Hess, B.; Buuren, A. v.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Feenstra, K. A.; Drunen, R. v.; Berendsen, H. J. C., *Gromacs User Manual version 4.5*. 2010.
61. Leach, A. R., *Molecular Modelling - Principles and Applications*. second ed.; Prentice Hall: 2001.
62. Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Vangunsteren, W. F.; Dinola, A.; Haak, J. R., Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.
63. Hess, B., P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 116-122.
64. Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J., LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1463-1472.
65. Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P., The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269-6271.
66. Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F., A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1656-1676.

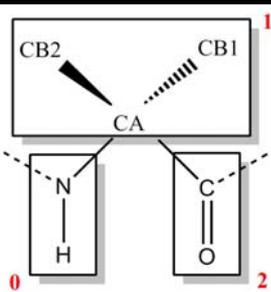
67. Smith, P. E.; Vangunsteren, W. F., Consistent dielectric-properties of the simple point-charge and extended simple point-charge water models at 227 and 300K *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 3169-3174.
68. Lide, D. R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 84th ed.; CRC Press: London, 2003.
69. Tieleman, P. Palmitoyl-linoleylphosphatidylcholine bilayer with 128 lipids. [http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures\\_and\\_Topologies](http://moose.bio.ucalgary.ca/index.php?page=Structures_and_Topologies).
70. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95-99.
71. Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A. C.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R.; Thornton, J. M., AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 477-486.
72. Laskowski, R. A.; Macarthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M., PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283-291.
73. Jolliffe, I. T., *Principal Component Analysis*. 2nd ed.; Springer: New York, 2002.

# **Anexos**

## Anexo I

Nesta secção estão apresentadas as topologias para as novas  $\alpha,\alpha$ -dialquilglicinas sob estudo. Estas topologias foram construídas por homologia aos aminoácidos codificados por ADN e correspondem aos parâmetros do FF GROMOS 54a7.<sup>[56]</sup>

<b>AIB</b>				
<b>Parâmetros não-ligantes</b>				
Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)		
N	N	-0,31		
H	H	0,31		
CA	C	0,00		
CB1	CH <sub>3</sub>	0,00		
CB2	CH <sub>3</sub>	0,00		
C	C	0,45		
O	O	-0,45		



<b>Parâmetros Ligantes</b>				
Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação	
	N	H	gb_2	
	N	CA	gb_21	
	CA	CB1	gb_27	
	CA	CB2	gb_27	
	CA	C	gb_27	
	C	O	gb_5	
	C	+N	gb_10	

Ângulos	ai	aj	ak	Tipo de ângulo
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18
	N	CA	CB1	ga_13
	N	CA	C	ga_19
	CB1	CA	C	ga_13
	N	CA	CB2	ga_13
	CB1	CA	CB2	ga_13
	CB2	CA	C	ga_13
	CA	C	O	ga_30
	CA	C	+N	ga_19
	O	C	+N	ga_33

Diedros próprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
	-CA	-C	N	CA	gd_14
	-C	N	CA	C	gd_42
	-C	N	CA	C	gd_43
	N	CA	C	+N	gd_44
	N	CA	C	+N	gd_45

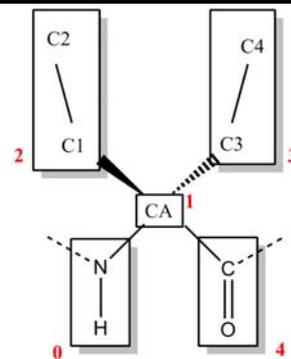
Diedros impróprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
	N	-C	CA	H	gi_1

CA	N	C	CB1	gi_2
C	CA	+N	O	gi_1
CA	N	CB2	C	gi_2
CA	N	CB1	CB2	gi_2

## DEG

### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31
H	H	0,31
CA	C	0,00
C1	CH <sub>2</sub>	0,00
C2	CH <sub>3</sub>	0,00
C3	CH <sub>2</sub>	0,00
C4	CH <sub>3</sub>	0,00
C	C	0,45
O	O	-0,45



### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C3	gb_27
	C1	C2	gb_27
	C3	C4	gb_27
	CA	C	gb_27
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10

Ângulos	ai	aj	ak	Tipo de ângulo
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18
	N	CA	C1	ga_13
	N	CA	C	ga_19
	N	CA	C3	ga_13
	C1	CA	C	ga_13
	C	CA	C3	ga_13
	CA	C1	C2	ga_13
	CA	C3	C4	ga_13
	C1	CA	C3	ga_13
	CA	C	O	ga_30
	CA	C	+N	ga_19
	O	C	+N	ga_33

Diedros próprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
	-CA	-C	N	CA	gd_14
	-C	N	CA	C	gd_42

-C	N	CA	C	gd_43
C	CA	C1	C2	gd_34
C	CA	C3	C4	gd_34
N	CA	C	+N	gd_44
N	CA	C	+N	gd_45
<b>Diedros impróprios</b>				
<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
N	-C	CA	H	gi_1
CA	N	C	C1	gi_2
C	CA	+N	O	gi_1
CA	N	C3	C	gi_2
CA	N	C1	C3	gi_2

### DPG

#### Parâmetros não-ligantes

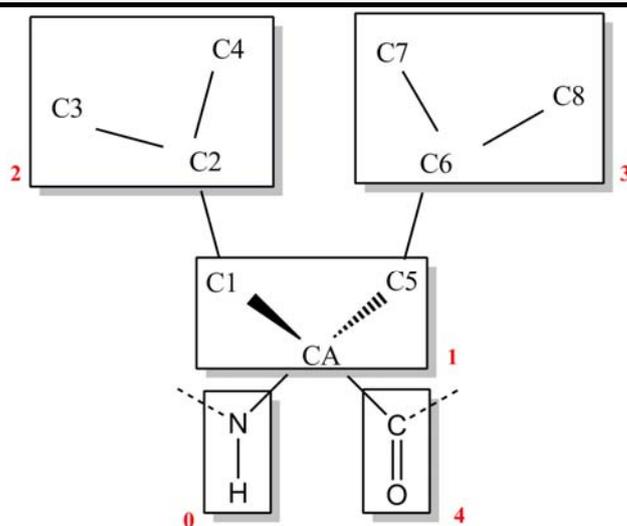
Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31
H	H	0,31
CA	C	0,00
C1	CH <sub>2</sub>	0,00
C2	CH <sub>2</sub>	0,00
C3	CH <sub>3</sub>	0,00
C4	CH <sub>2</sub>	0,00
C5	CH <sub>2</sub>	0,00
C6	CH <sub>3</sub>	0,00
C	C	0,45
O	O	-0,45

#### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C4	gb_27
	C1	C2	gb_27
	C2	C3	gb_27
	C4	C5	gb_27
	C5	C6	gb_27
	CA	C	gb_27
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10
<b>Ângulos</b>			
<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>Tipo de ângulo</b>
-C	N	H	ga_32
-C	N	CA	ga_31
H	N	CA	ga_18
C	CA	C4	ga_13
C	CA	C1	ga_13

C1	CA	C4	ga_13	
N	CA	C1	ga_13	
N	CA	C4	ga_13	
N	CA	C	ga_19	
CA	C1	C2	ga_13	
CA	C4	C5	ga_13	
C1	C2	C3	ga_13	
C4	C5	C6	ga_13	
CA	C	O	ga_30	
CA	C	+N	ga_19	
O	C	+N	ga_33	
<b>Diedros próprios</b>				
<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
-CA	-C	N	CA	gd_14
-C	N	CA	C	gd_42
-C	N	CA	C	gd_43
N	CA	C	+N	gd_44
N	CA	C	+N	gd_45
C	CA	C1	C2	gd_34
C	CA	C4	C5	gd_34
CA	C4	C5	C6	gd_34
CA	C1	C2	C3	gd_34
<b>Diedros impróprios</b>				
<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
N	-C	CA	H	gi_1
CA	N	C	C4	gi_2
C	CA	+N	O	gi_1
CA	N	C1	C	gi_2
CA	N	C4	C1	gi_2

### DIB



### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31

H	H	0,31
CA	C	0,00
C1	CH <sub>2</sub>	0,00
C2	CH	0,00
C3	CH <sub>3</sub>	0,00
C4	CH <sub>3</sub>	0,00
C5	CH <sub>2</sub>	0,00
C6	CH	0,00
C7	CH <sub>3</sub>	0,00
C8	CH <sub>3</sub>	0,00
C	C	0,45
O	O	-0,45

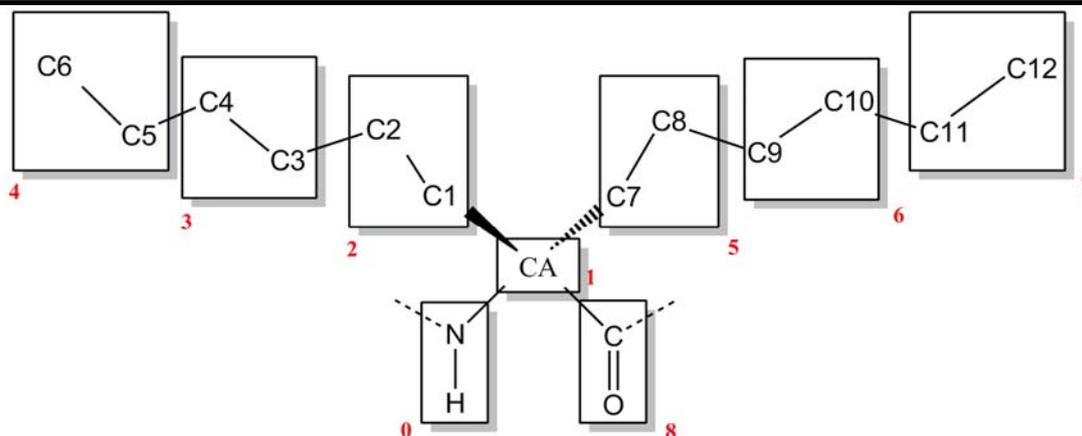
### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C5	gb_27
	C1	C2	gb_27
	C2	C3	gb_27
	C2	C4	gb_27
	C5	C6	gb_27
	C6	C7	gb_27
	C6	C8	gb_27
	CA	C	gb_27
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10

Ângulos	ai	aj	ak	Tipo de ângulo
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18
	N	CA	C1	ga_13
	C	CA	C1	ga_13
	CA	C1	C2	ga_13
	CA	C5	C6	ga_13
	C1	C2	C3	ga_15
	C1	C2	C4	ga_15
	C3	C2	C4	ga_15
	C5	C6	C7	ga_15
	C5	C6	C8	ga_15
	C7	C6	C8	ga_15
	C5	CA	C	ga_13
	C1	CA	C5	ga_13
	N	CA	C5	ga_13
	N	CA	C	ga_19
	CA	C	O	ga_30
	CA	C	+N	ga_19

	0	C	+N	ga_33	
<b>Diedros próprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	-CA	-C	N	CA	gd_14
	-C	N	CA	C	gd_42
	-C	N	CA	C	gd_43
	N	CA	C	+N	gd_44
	N	CA	C	+N	gd_45
	N	CA	C1	C2	gd_34
	N	CA	C5	C6	gd_34
	CA	C5	C6	C7	gd_34
	CA	C1	C2	C3	gd_34
<b>Diedros impróprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	N	-C	CA	H	gi_1
	CA	N	C5	C1	gi_2
	CA	N	C1	C	gi_2
	CA	N	C	C5	gi_2
	C6	C7	C5	C8	gi_2
	C2	C4	C3	C1	gi_2
	C	CA	+N	0	gi_1

### DHG



### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31
H	H	0,31
CA	C	0,00
C1	CH <sub>2</sub>	0,00
C2	CH <sub>2</sub>	0,00
C3	CH <sub>2</sub>	0,00
C4	CH <sub>2</sub>	0,00
C5	CH <sub>2</sub>	0,00
C6	CH <sub>3</sub>	0,00
C7	CH <sub>2</sub>	0,00
C8	CH <sub>2</sub>	0,00
C9	CH <sub>2</sub>	0,00

C10	CH <sub>2</sub>	0,00
C11	CH <sub>2</sub>	0,00
C12	CH <sub>3</sub>	0,00
C	C	0,45
O	O	-0,45

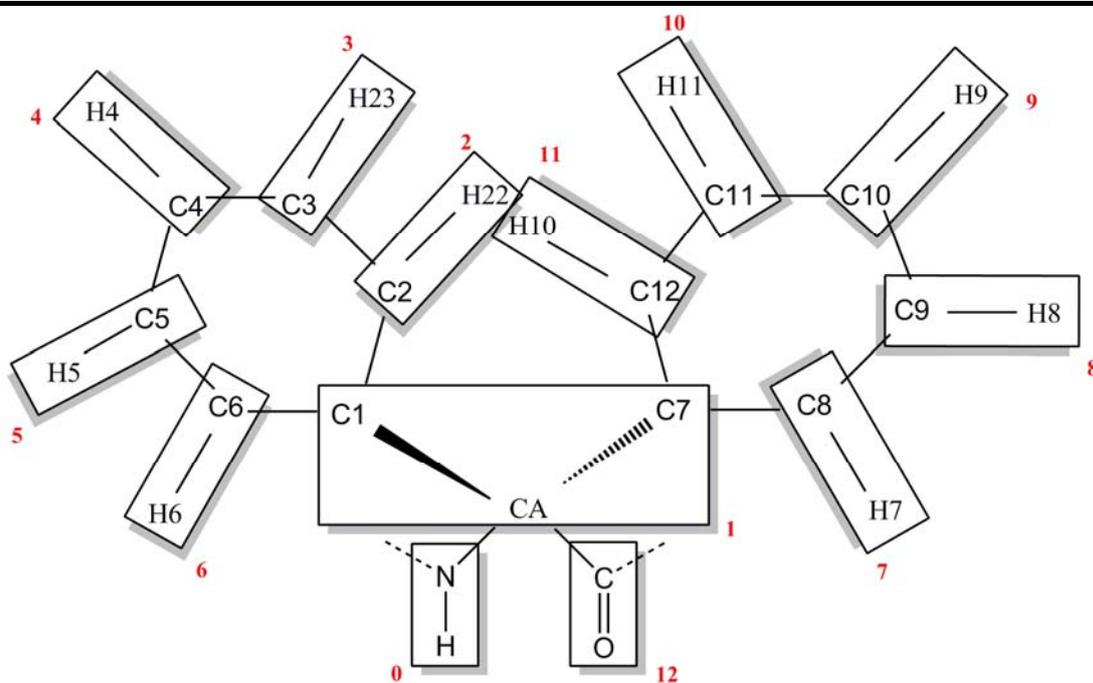
### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C7	gb_27
	C1	C2	gb_27
	C2	C3	gb_27
	C3	C4	gb_27
	C4	C5	gb_27
	C5	C6	gb_27
	C7	C8	gb_27
	C8	C9	gb_27
	C9	C10	gb_27
	C10	C11	gb_27
	C11	C12	gb_27
	CA	C	gb_27
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10

Ângulos	ai	aj	ak	Tipo de ângulo
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18
	C	CA	C1	ga_13
	C	CA	C7	ga_13
	C1	CA	C7	ga_13
	CA	C1	C2	ga_13
	CA	C7	C8	ga_13
	C1	C2	C3	ga_13
	C2	C3	C4	ga_13
	C3	C4	C5	ga_13
	C4	C5	C6	ga_13
	C7	C8	C9	ga_13
	C8	C9	C10	ga_13
	C9	C10	C11	ga_13
	C10	C11	C12	ga_13
	N	CA	C1	ga_13
	N	CA	C7	ga_13
	N	CA	C	ga_19
	CA	C	O	ga_30
	CA	C	+N	ga_19
	O	C	+N	ga_33

Diedros próprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
-CA	-C	N	CA	CA	gd_14
-C	N	CA	C	C	gd_42
-C	N	CA	C	C	gd_43
N	CA	C	+N	+N	gd_44
N	CA	C	+N	+N	gd_45
C	CA	C1	C2	C2	gd_34
C	CA	C7	C8	C8	gd_34
CA	C1	C2	C3	C3	gd_34
C1	C2	C3	C4	C4	gd_34
C2	C3	C4	C5	C5	gd_34
C3	C4	C5	C6	C6	gd_34
CA	C7	C8	C9	C9	gd_34
C7	C8	C9	C10	C10	gd_34
C8	C9	C10	C11	C11	gd_34
C9	C10	C11	C12	C12	gd_34
Diedros impróprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
N	-C	CA	H	H	gi_1
CA	N	C	C7	C7	gi_2
CA	N	C7	C1	C1	gi_2
CA	N	C1	C	C	gi_2
C	CA	+N	O	O	gi_1

### DFG



### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31
H	H	0,31

CA	C	0,00
C1	C	0,00
C7	C	0,00
C2	C	-0,14
H22	HC	0,14
C3	C	-0,14
H23	HC	0,14
C4	C	-0,14
H4	HC	0,14
C5	C	-0,14
H5	HC	0,14
C6	C	-0,14
H6	HC	0,14
C8	C	-0,14
H7	HC	0,14
C9	C	-0,14
H8	HC	0,14
C10	C	-0,14
H9	HC	0,14
C11	C	-0,14
H11	HC	0,14
C12	C	-0,14
H10	HC	0,14
C	C	0,45
O	O	-0,45

### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C7	gb_27
	CA	C	gb_27
	C1	C2	gb_16
	C2	C3	gb_16
	C2	H22	gb_3
	C3	C4	gb_16
	C3	H23	gb_3
	C4	C5	gb_16
	C4	H4	gb_3
	C5	C6	gb_16
	C5	H5	gb_3
	C6	C1	gb_16
	C6	H6	gb_3
	C7	C8	gb_16
	C8	C9	gb_16
	C8	H7	gb_3
	C9	C10	gb_16
	C9	H8	gb_3

C10	C11	gb_16		
C10	H9	gb_3		
C11	C12	gb_16		
C11	H11	gb_3		
C12	C7	gb_16		
C12	H10	gb_3		
C	0	gb_5		
C	+N	gb_10		
<b>Exclusões</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>		
	C1	H23		
	C1	H5		
	C1	C4		
	C2	C5		
	C2	H4		
	C2	H6		
	C3	C6		
	C3	H5		
	C4	H22		
	C4	H6		
	C5	H23		
	C6	H22		
	C6	H4		
	H22	H23		
	H23	H4		
	H4	H5		
	H5	H6		
	C7	H8		
	C7	H11		
	C7	C10		
	C8	H10		
	C8	H9		
	C8	C11		
	C9	C12		
	C9	H11		
	C10	H10		
	C10	H7		
	C11	H8		
	C12	H9		
	C12	H7		
	H7	H8		
	H8	H9		
	H9	H11		
	H10	H11		
<b>Ângulos</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>Tipo de ângulo</b>
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18

N	CA	C1	ga_13
N	CA	C7	ga_13
N	CA	C	ga_19
C7	CA	C	ga_13
C1	CA	C	ga_13
C1	CA	C7	ga_13
CA	C7	C8	ga_15
CA	C7	C12	ga_15
CA	C1	C2	ga_15
CA	C1	C6	ga_15
C1	C2	H22	ga_25
C1	C6	H6	ga_25
C1	C2	C3	ga_27
C1	C6	C5	ga_27
C2	C1	C6	ga_27
H22	C2	C3	ga_25
H6	C6	C5	ga_25
C2	C3	C4	ga_27
C2	C3	H23	ga_25
C6	C5	C4	ga_27
C6	C5	H5	ga_25
C3	C4	C5	ga_27
H23	C3	C4	ga_25
H5	C5	C4	ga_25
H4	C4	C5	ga_25
H4	C4	C3	ga_25
C7	C8	H7	ga_25
C7	C12	H10	ga_25
C7	C6	C9	ga_27
C7	C12	C11	ga_27
C7	C8	C9	ga_27
C8	C7	C12	ga_27
H7	C8	C9	ga_25
H10	C12	C11	ga_25
C8	C9	C10	ga_27
C8	C9	H8	ga_25
C12	C11	C10	ga_27
C12	C11	H11	ga_25
C9	C10	C11	ga_27
H8	C9	C10	ga_25
H11	C11	C10	ga_25
H9	C10	C9	ga_25
H9	C10	C11	ga_25
CA	C	O	ga_30
CA	C	+N	ga_19
O	C	+N	ga_33

<b>Diedros próprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	-CA	-C	N	CA	gd_14
	-C	N	CA	C	gd_42
	-C	N	CA	C	gd_43
	N	CA	C	+N	gd_44
	N	CA	C	+N	gd_45
	C	CA	C1	C6	gd_34
	C	CA	C7	C8	gd_34
	CA	C1	C2	C3	gd_34
	CA	C7	C8	C9	gd_34
	C3	C4	C5	C6	gd_34
	C9	C10	C11	C12	gd_34
<b>Diedros impróprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	N	-C	CA	H	gj_1
	CA	N	C	C7	gj_2
	CA	N	C7	C1	gj_2
	CA	N	C1	C	gj_2
	C1	C2	C6	CA	gj_1
	C7	C8	C12	CA	gj_1
	C1	C2	C3	C4	gj_1
	C1	C6	C5	C4	gj_1
	C7	C8	C9	C10	gj_1
	C7	C12	C11	C10	gj_1
	C2	C1	C6	C5	gj_1
	C2	C3	C4	C5	gj_1
	C8	C7	C12	C11	gj_1
	C8	C9	C10	C11	gj_1
	H22	C1	C3	C2	gj_1
	H23	C2	C4	C3	gj_1
	H4	C3	C5	C4	gj_1
	H5	C4	C6	C5	gj_1
	H6	C1	C5	C6	gj_1
	H7	C7	C9	C8	gj_1
	H8	C8	C10	C9	gj_1
	H9	C9	C11	C10	gj_1
	H11	C10	C12	C11	gj_1
	H10	C11	C7	C12	gj_1
	C	CA	+N	O	gj_1



H9	HC	0,14
C14	C	-0,14
H11	HC	0,14
C	C	0,45
O	O	-0,45

**Parâmetros ligantes**

<b>Ligações químicas</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>Tipo de ligação</b>
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	C1	gb_27
	CA	C2	gb_27
	CA	C	gb_27
	C1	C3	gb_27
	C3	C4	gb_16
	C3	C5	gb_16
	C4	H22	gb_3
	C4	C6	gb_16
	C5	H23	gb_3
	C5	C7	gb_16
	C6	H4	gb_3
	C6	C8	gb_16
	C7	H5	gb_3
	C7	C8	gb_16
	C8	H6	gb_3
	C2	C9	gb_27
	C9	C10	gb_16
	C9	C11	gb_16
	C10	H8	gb_3
	C10	C12	gb_16
	C11	H7	gb_3
	C11	C13	gb_16
	C12	H10	gb_3
	C12	C14	gb_16
	C13	H9	gb_3
	C13	C14	gb_16
	C14	H11	gb_3
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10

<b>Exclusões</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>
	C1	H22
	C1	H23
	C1	C6
	C1	C7
	C3	C8
	C3	H4
	C3	H5
	C4	C7

C4	H6
C4	H23
C5	C6
C5	H6
C5	H22
C6	H5
C8	H22
C8	H23
C7	H4
H6	H4
H6	H5
H5	H23
C2	H7
C2	H8
C2	C13
C2	C12
C9	C14
C9	H10
C9	H9
C10	C13
C10	H11
C10	H7
C11	C12
C11	H11
C11	H8
C12	H9
C13	H10
H10	H8
H9	H7
C14	H7
C14	H8
H11	H9
H11	H10

<b>Ângulos</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>Tipo de ângulo</b>
-C	N	H		ga_32
-C	N	CA		ga_31
H	N	CA		ga_18
N	CA	C1		ga_13
N	CA	C2		ga_13
N	CA	C		ga_19
C2	CA	C		ga_13
C1	CA	C		ga_13
C1	CA	C2		ga_13
CA	C2	C9		ga_15
CA	C1	C3		ga_15
C2	C9	C11		ga_27
C2	C9	C10		ga_27

C1	C3	C4	ga_27
C1	C3	C5	ga_27
C11	C9	C10	ga_27
C4	C3	C5	ga_27
C3	C5	H23	ga_25
C9	C11	H7	ga_25
C3	C5	C7	ga_27
C9	C11	C13	ga_27
H23	C5	C7	ga_25
H7	C11	C13	ga_25
C3	C4	H22	ga_25
C9	C10	H8	ga_25
C3	C4	C6	ga_27
C9	C10	C12	ga_27
H22	C4	C6	ga_25
H8	C10	C12	ga_25
C5	C7	H5	ga_25
C11	C13	H9	ga_25
C5	C7	C8	ga_27
C11	C13	C14	ga_27
H5	C7	C8	ga_25
H9	C13	C14	ga_25
C4	C6	H4	ga_25
C10	C12	H10	ga_25
C4	C6	C8	ga_27
C10	C12	C14	ga_27
H4	C6	C8	ga_25
H10	C12	C14	ga_25
C7	C8	C6	ga_27
C13	C14	C12	ga_27
C7	C8	H6	ga_25
C13	C14	H11	ga_25
C6	C8	H6	ga_25
C12	C14	H11	ga_25
CA	C	O	ga_30
CA	C	+N	ga_19
O	C	+N	ga_33

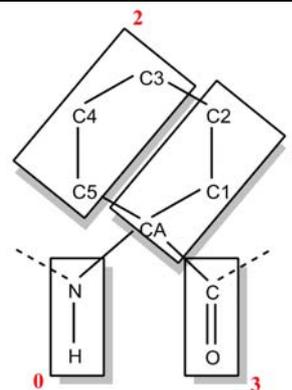
<b>Diedros próprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
-CA	-C	N	CA	CA	gd_14
-C	N	CA	C	C	gd_42
-C	N	CA	C	C	gd_43
N	CA	C	+N	+N	gd_44
N	CA	C	+N	+N	gd_45
C	CA	C1	C3	C3	gd_34
C	CA	C2	C9	C9	gd_34
CA	C1	C3	C5	C5	gd_40

	CA	C2	C9	C11	gd_40
<b>Diedros impróprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	N	-C	CA	H	gj_1
	CA	N	C	C2	gj_2
	CA	N	C2	C1	gj_2
	CA	N	C1	C	gj_2
	C3	C4	C5	C1	gj_1
	C9	C11	C10	C2	gj_1
	C3	C5	C7	C8	gj_1
	C9	C11	C13	C14	gj_1
	C3	C5	C6	C8	gj_1
	C9	C11	C12	C14	gj_1
	C5	C3	C4	C6	gj_1
	C11	C9	C10	C12	gj_1
	C5	C3	C7	H23	gj_1
	C11	C9	C13	H7	gj_1
	C5	C7	C8	C6	gj_1
	C11	C13	C14	C12	gj_1
	C4	C3	C5	C7	gj_1
	C10	C9	C11	C13	gj_1
	C4	C3	C6	H22	gj_1
	C10	C9	C12	H8	gj_1
	C4	C6	C8	C7	gj_1
	C10	C12	C14	C13	gj_1
	H5	C5	C8	C7	gj_1
	H9	C11	C14	C13	gj_1
	H4	C4	C8	C6	gj_1
	H10	C10	C14	C12	gj_1
	C8	C7	C6	H6	gj_1
	C14	C13	C12	H11	gj_1
	C	CA	+N	O	gj_1

### CHG

#### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,31
H	H	0,31
CA	C	0,00
C1	CH2R	0,00
C2	CH2R	0,00
C3	CH2R	0,00
C4	CH2R	0,00
C5	CH2R	0,00
C	C	0,45



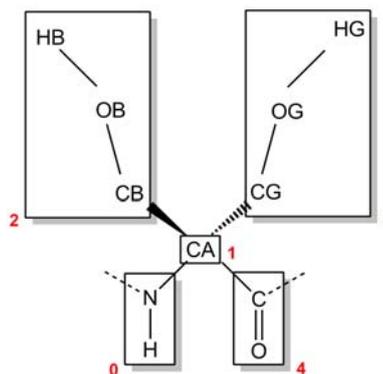
		0	0	-0,45		
<b>Parâmetros ligantes</b>						
<b>Ligações químicas</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>Tipo de ligação</b>			
	N	H	gb_2			
	N	CA	gb_21			
	CA	C1	gb_27			
	CA	C5	gb_27			
	C1	C2	gb_27			
	C2	C3	gb_27			
	C3	C4	gb_27			
	C4	C5	gb_27			
	CA	C	gb_27			
	C	O	gb_5			
	C	+N	gb_10			
<b>Ângulos</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>Tipo de ângulo</b>		
	-C	N	H	ga_32		
	-C	N	CA	ga_31		
	H	N	CA	ga_18		
	N	CA	C1	ga_13		
	N	CA	C5	ga_13		
	N	CA	C	ga_13		
	C1	CA	C	ga_13		
	C5	CA	C	ga_13		
	C1	CA	C5	ga_13		
	CA	C1	C2	ga_13		
	CA	C5	C4	ga_13		
	C1	C2	C3	ga_13		
	C2	C3	C4	ga_13		
	C3	C4	C5	ga_13		
	CA	C	O	ga_30		
	CA	C	+N	ga_19		
	O	C	+N	ga_33		
<b>Diedros próprios</b>	<b>Ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>	
	-CA	-C	N	CA	gd_14	
	-C	N	CA	C	gd_42	
	-C	N	CA	C	gd_43	
	N	CA	C	+N	gd_44	
	N	CA	C	+N	gd_45	
	N	CA	C5	C4	gd_34	
	N	CA	C1	C2	gd_34	
	H	N	CA	C1	gd_34	
	CA	C1	C2	C3	gd_34	
	CA	C5	C4	C3	gd_34	
	C1	C2	C3	C4	gd_34	
	C2	C3	C4	C5	gd_34	
	CA	C1	C2	C3	gd_34	

Diedros impróprios	ai	aj	ak	al	Tipo de diedro
	N	-C	CA	H	gi_1
	CA	N	C	C1	gi_2
	C	CA	+N	O	gi_1
	CA	N	C	C5	gi_2

### DMG

#### Parâmetros não-ligantes

Nome do átomo	Tipo de átomo	Carga (q)
N	N	-0,310
H	H	0,310
CA	C	0,000
CB	CH2	0,266
OB	OA	-0,674
HB	H	0,408
CG	CH2	0,266
OG	OA	-0,674
HG	H	0,408
C	C	0,45
O	O	-0,45



#### Parâmetros ligantes

Ligações químicas	ai	aj	Tipo de ligação
	N	H	gb_2
	N	CA	gb_21
	CA	CB	gb_27
	CA	CG	gb_27
	CA	C	gb_27
	CB	OB	gb_18
	CG	OG	gb_18
	OB	HB	gb_1
	OG	HG	gb_1
	C	O	gb_5
	C	+N	gb_10

Ângulos	ai	aj	ak	Tipo de ângulo
	-C	N	H	ga_32
	-C	N	CA	ga_31
	H	N	CA	ga_18
	N	CA	CB	ga_13
	N	CA	CG	ga_13
	N	CA	C	ga_13
	CG	CA	C	ga_13
	CB	CA	C	ga_13
	CA	CB	OB	ga_13
	CB	OB	HB	ga_12
	CA	CG	OG	ga_13

	CG	OG	HG	ga_12	
	CB	CA	CG	ga_13	
	CA	C	O	ga_30	
	CA	C	+N	ga_19	
	O	C	+N	ga_33	
<b>Diedros próprios</b>	<b>Ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	-CA	-C	N	CA	gd_14
	-C	N	CA	C	gd_42
	-C	N	CA	C	gd_43
	N	CA	C	+N	gd_44
	N	CA	C	+N	gd_45
	N	CA	CB	OB	gd_34
	N	CA	CG	OG	gd_34
	CA	CB	OB	HB	gd_23
	CA	CG	OG	HG	gd_23
<b>Diedros impróprios</b>	<b>ai</b>	<b>aj</b>	<b>ak</b>	<b>al</b>	<b>Tipo de diedro</b>
	N	-C	CA	H	gi_1
	CA	N	C	CB	gi_2
	C	CA	+N	O	gi_1
	CA	N	C	CG	gi_2