

**ESTUDO ESTRUTURAL POR RMN DE  $^1\text{H}$  DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ISOLADOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE *HYSIBOAS ALBOPUNCTATUS* E *LEPTODACTYLUS LABYRINTHICUS***

**STRUCTURAL STUDY BY  $^1\text{H}$  NMR OF BIOACTIVE PEPTIDES ISOLATED FROM SKIN SECRETION OF *HYSIBOAS ALBOPUNCTATUS* AND *LEPTODACTYLUS LABYRINTHICUS***

**ELIANE SANTANA FERNANDES ALVES**

**Endereço atual/Current address:** Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74.001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Goiás, Brazil. E-mail: eliane\_ufg@yahoo.com.br

**Dissertação de Mestrado/Master Dissertation:** Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. Postgraduate Program in Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Brazil.

**Defendida/Defended:** 22.II.2012

**Orientador/Advisor:** Dr. Luciano Morais Lião, Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Goiânia, Goiás, Brasil. Postgraduate Program in Chemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Brazil.

**Co-orientador/Co-advisor:** Dra. Aline Lima de Oliveira, Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

**RESUMO:** Atualmente, o surgimento de fungos, bactérias e vírus resistentes a múltiplos fármacos tem estimulado o interesse pelo desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos com maior potencial terapêutico. Eles em geral possuem propriedades de extrema importância como toxicidade antimicrobiana seletiva, ação rápida, mecanismos de ação específicos e um amplo espectro de ação antimicrobiano. Muitas dessas características podem ser encontradas em peptídeos isolados da secreção cutânea de anuros. O principal fator que diferencia peptídeos antimicrobianos de antibióticos utilizados na terapia convencional está relacionado com o seu mecanismo de ação. A força motriz para a ação de peptídeos antimicrobianos é sua habilidade em provocar lise em membranas celulares, matando rapidamente um amplo espectro de microorganismos. Nesse sentido, a conformação do peptídeo tem uma grande importância em sua interação com a estrutura anfífilica das membranas biológicas. A determinação da estrutura tridimensional por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possibilita a identificação da posição espacial de cada resíduo e destaca aqueles que são importantes para a sua ação e que, portanto, poderiam ser modificados para aumentar a atividade antimicrobiana. O

estudo da estrutura 3D dos peptídeos em solução é uma vantagem da espectroscopia de RMN, pois se consegue simular o ambiente fisiológico por meio de surfactantes. Nesse contexto, determinou-se através da RMN a estrutura tridimensional de dois peptídeos sintéticos: ocellatina-P1G16 (GLLDTLKGAAKNVVGGGLASKVMEKL-NH<sub>2</sub>) isolado do anfíbio *Leptodactylus labyrinthicus*, e o peptídeo hilina a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH<sub>2</sub>), isolado do anfíbio *Hypsiboas albopunctatus*. A anfipaticidade da estrutura pode ser observada pela separação da estrutura em duas faces distintas, uma hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar). O peptídeo hilina a1, em presença de SDS-d<sub>25</sub>, apresentou estrutura helicoidal entre os resíduos Ile5-Ile17, O peptídeo ocellatina-P1G16, em presença de SDS-d<sub>25</sub>, apresentou estrutura em  $\alpha$ -hélice entre os resíduos Leu3-Lys24 ambos em  $\alpha$ -hélice anfipática. Por fim, as análises moleculares de anfipaticidade, interação eletrostática e troca H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, apontaram a mesma face de interação dos peptídeos com a membrana, propondo um modelo de orientação paralela para o peptídeo hilina a1 e para o peptídeo ocellatina uma orientação paralela. Porém com a porção c-terminal mergulhada na micela de SDS entre os resíduos Ser-19 e Leu-25, como observada pela análise de troca H/D. Tais características estruturais tornam esses peptídeos candidatos promissores para o desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Peptídeos, estrutura tridimensional, determinação estrutural.

**ABSTRACT:** Currently, the emergence of fungi, bacteria and viruses resistant to multiple drugs has stimulated interest in the development of antimicrobial peptides with increased therapeutic potential. They generally have properties of extreme importance as antimicrobial selective toxicity, rapid action, specific mechanisms of action and a broad spectrum of antimicrobial action. Many of these features can be found in peptides isolated from frog skin secretions. The main factor that differentiates antimicrobial peptides from other commonly antibiotics used in the conventional therapy is related to their mechanism of action. The driving force for much of the action of antimicrobial peptides is their ability to lysis cell membranes, rapidly killing a broad spectrum of microorganisms. Accordingly, the conformation of the peptide has a great importance in their interaction with the amphiphilic structure of biological membranes. The determination of the tridimensional structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique allows the identification of the spatial position of each amino acid residue and highlighting those that are important for its action and, therefore, could be modified to increase the antimicrobial activity. The study of the three-dimensional structure of peptides in solution is an advantage of the NMR spectroscopy, since it can simulate the physiological environment, by means of surfactants. In this context, the tridimensional structures of two synthetic peptides: ocellatin-P1G16 (GLLDTLKGAAKNVVGGGLASKVMEKL-NH<sub>2</sub>), isolated from the amphibians *Leptodactylus labyrinthicus*, and hilyn a1 (IFGAILPLALGALKNLIK-NH<sub>2</sub>), isolated from *Hypsiboas Albopunctatus*, by NMR. The amphipathic character can be visualized by separation of the helix into two distinct sides, one hydrophobic (nonpolar) and the other hydrophilic (polar). The peptide Hilyn a1 in presence of SDS-d<sub>25</sub> showed helical structure between residues Ile-5 to Ile-17 and the peptide ocellatin-P1G16 in SDS-d<sub>25</sub> micelles showed a  $\alpha$ -helical structure between residues Leu-3 to Lys-24, both are presented in amphipathic  $\alpha$ -helix. Finally, the molecular analyses of amphipathicity, electrostatic interaction, polarity and exchange hydrogen/deuterium, corroborate the proposed model, suggesting a model of parallel orientation to the peptide hilina a1 and the peptide ocellatina a parallel orientation, but with the c-terminal portion immersed in the micelle SDS between residues Ser-19 to Leu-25, as observed by analyzing exchange hydrogen/deuterium. These structural characteristics make these peptides promising candidates for the development of a new antimicrobial drug.

**KEY WORDS:** Peptides, three-dimensional structure, structural determination.