



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Síntese, Purificação e Determinação Estrutural
de Peptídeos como Ferramenta Exploratória de
Atividades Biologicamente Relevantes**

Diego Arantes Teixeira Pires

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Dra. Claudia Jorge do Nascimento

Brasília
Junho de 2012



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química

**Síntese, Purificação e Determinação Estrutural
de Peptídeos como Ferramenta Exploratória de
Atividades Biologicamente Relevantes**

Diego Arantes Teixeira Pires

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Química

Orientadora: Dra. Claudia Jorge do Nascimento

Área de Concentração: Química Orgânica

Brasília, 29 de Junho de 2012

“Independente da classe social, cor e intelectualidade, quando o ser humano nasce, ele já pode ser considerado um guerreiro, pois, irá participar de uma aventura chamada vida, onde o minuto seguinte é incerto, onde seu pior inimigo pode ser ele mesmo. Terá dúvidas até o seu último respiro, não obterá todos os conhecimentos, será exaltado, humilhado, verá seus próximos partirem e, sucumbirá diante de inúmeras situações. Ainda assim, continua se arrastando na terra. Avante guerreiro.”

Autor Desconhecido

*Dedico este trabalho ao meus
pais pelo apoio incondicional e
por acreditaram em mim.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à Professora Claudia por todas as portas abertas, paciência, amizade e por toda a orientação, não só na parte científica, mas também na parte pessoal. Amizade, aprendizado e ensinamentos que levarei comigo por toda a vida.

Ao Carlos Bloch pela orientação, paciência, todo o aprendizado e por ter mudado meu olhar sobre a Ciência. Agradeço também por ter aberto as portas do seu laboratório, local onde foi realizado grande parte deste trabalho. Sem suas contribuições, o trabalho certamente não seria o mesmo.

Aos meus pais e familiares por todo o apoio durante esses anos.

À Luisa e Maura pela amizade, ajuda, sugestões, paciência, broncas, risadas, saídas, almoços, momentos de diversão, brancos e paçocas. Vocês ajudaram esse trabalho a ser bem mais divertido e prazeroso.

À galera do Laboratório de Espectrometria de Massa: Sophia, Nathy, Mari Quezado, Mari Brega, Lipe, Eder, Sifu, Ingrid, Karlinha, Carol Verde, Kelianne, Tati, Grazi, Cintia, Alice, Eduardo, Zé e Jorge por toda a ajuda direta ou indireta.

Aos professores Luciano Paulino e Marcelo Bemquerer pela ajuda e pelos ensinamentos. Ao Guilherme Brand por tudo a ajuda, principalmente na parte dos ensaios biológicos. Ao professor Fábio Almeida pelos ensinamentos, ajuda, dedicação e paciência.

Ao professor Rafael Rocha pela assistência na UnB na ausência da Claudia e à professora Patrícia Lootens pela paciência, ensinamentos, conselhos e amizade.

Aos colegas da UnB: Lud, Natasha, David, Fernanda, André, Grazi, Hécio, Moema e Viner. À Thaissa, Joyce e Jana por cada SBQ, saídas e PPP. Ao Geraldo, Saulo, Amanda, Marcela Farage, Thais, Flora e à Say por desde ajuda com Linux até conselhos, amizade, saídas, paciência e por sempre me ouvirem.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e ao Instituto de Química (UnB) pelas condições de trabalho. À rede Sarah de Hospitais de Reabilitação pelo assistência com os testes biológicos. Ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (CNRMN) pela aquisição dos espectros de RMN, à Capes e ao DPP/UnB pelo suporte financeiro.

Resumo

A pele de anfíbios é um órgão onde pode ser encontrados diversos compostos biologicamente ativos, desde reguladores de funções fisiológicas até compostos que agem contra predadores e microrganismos. Peptídeos são biomoléculas que podem estar presentes nesse órgão e apresentar diversas atividades como antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes e opioides ou mesmo se ligar a metais ou gases. Neste trabalho, foram estudados peptídeos encontrados nos anfíbios *Hypsiboas punctatus* e *Phyllomedusa centralis* com possíveis atividades antitrombóticas e afinidade por metais e gases, respectivamente. Estes peptídeos, juntamente com peptídeos análogos, foram quimicamente sintetizados em fase sólida, purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizados por Espectrometria de Massa. As estruturas tridimensionais dos peptídeos foram determinadas por Ressonância Magnética Nuclear e os estudos de interação com metais e gases foram realizados por RMN e Espectrometria de Massa.

Abstract

The skin of amphibians is an organ in which several compounds with biological activity can be found, such as regulators of physiological functions and compounds that act against predators and microorganisms. Peptides are biomolecules that may be present in this organ and provide various activities, for example antimicrobial, antithrombotic, antioxidant, and opioids or even bind to metals and gases. In this work, we studied peptides found in the amphibians *Hypsiboas punctatus* e *Phyllomedusa centralis* with potential antithrombotic activity and affinity for metal and gases, respectively. These peptides and analogs were chemically synthesized by solid phase, purified by high performance liquid chromatography and characterized by Mass Spectrometry. Their three-dimensional structures were determined by Nuclear Magnetic Resonance and the studies of interaction with metal and gases were performed by NMR and Mass Spectrometry.

Índice

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	XI
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XXII

Capítulo I

Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cálculos Estruturais no Estudo de Peptídeos

1.1 – Introdução	2
1.1.1 – Peptídeos	2
1.1.2 – Espectrometria de Massa no Estudo de Peptídeos	3
1.1.3 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Estudo de Peptídeos	8
1.1.4 – Cálculos Estruturais no Estudo de Peptídeos	12

Capítulo II

Análogos Antitrombóticos: Síntese, Purificação, Caracterização e Determinação Estrutural

2.1 – Introdução	16
2.1.1 – Integrinas e Desintegrinas	16
2.1.2 – Tripsina	18
2.2 – Objetivos	20
2.3 – Metodologia	21
2.3.1 – Extração do Tecido Granular e Identificação do Peptídeo	21
2.3.2 – Síntese do Peptídeo em Fase Sólida	22
2.3.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético	25
2.3.4 – Purificação do Peptídeo Sintético	26
2.3.5 – Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	27
2.3.6 – Cálculos de Estrutura e Análise por RMN	29
2.3.7 – Teste Biológico: Agregação Plaquetária	30
2.3.8 – Síntese, Caracterização e Purificação de Peptídeos	

Análogos	31
2.3.9 – Experimentos de RMN dos Peptídeos Análogos	31
2.3.10 – Calculo de Estrutura e Análise por RMN dos Peptídeos	
Análogos	32
2.3.11 – Teste Biológico dos Peptídeos Análogos: Agregação	
Plaquetária	32
2.3.12 – Teste Biológico: Inibição de Tripsina	32
2.4 – Resultados e Discussão	34
2.4.1 - Extração da Secreção Cutânea e Identificação do Peptídeo	34
2.4.2 - Síntese do Peptídeo em Fase Sólida	35
2.4.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético	46
2.4.4 – Purificação do Peptídeo Sintético	48
2.4.5 – Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	51
2.4.6 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN	53
2.4.7 – Teste Biológico: Agregação Plaquetária	58
2.4.8 – Síntese, Caracterização e Purificação de Peptídeos	
Análogos	59
2.4.9 – Experimentos de RMN dos Peptídeos Análogos	70
2.4.10 – Calculo de Estrutura e Análise por RMN dos Peptídeos	
Análogos	71
2.4.11 – Teste Biológico dos Peptídeos Análogos: Agregação	
Plaquetária	79
2.4.12 – Teste Biológico: Inibição de Tripsina	80
2.5 – Conclusão	82

Capítulo III

Influência de Zn(II), Cd(II) e CO₂ na Estrutura de um Hexapeptídeo em Solução

3.1 – Introdução	85
3.2 – Objetivos	88
3.3 – Metodologia	89
3.3.1 - Extração da Secreção Cutânea e Identificação	
do Peptídeo	89

3.3.2 – Síntese do Peptídeo em Fase Sólida	90
3.3.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético	91
3.3.4 – Purificação do Peptídeo Sintético	91
3.3.5 – Experimentos de Espectrometria de Massa	92
3.3.6 – Experimentos de RMN (1D)	93
3.3.7 – Experimentos de RMN (2D)	94
3.3.8 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN	96
3.3.9 – Experimentos de Mobilidade Iônica	97
3.4 – Resultados e Discussão	98
3.4.1- Extração da Secreção Cutânea e Identificação do Peptídeo	98
3.4.2 - Síntese do Peptídeo em Fase Sólida	98
3.4.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético	99
3.4.4 - Purificação do Peptídeo Sintético	100
3.4.5 – Experimentos de Espectrometria de Massa	102
3.4.6 – Experimentos de RMN (1D)	114
3.4.7 – Experimentos de RMN (2D)	119
3.4.8 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN	122
3.4.9 – Experimentos de Mobilidade Iônica	131
3.5 – Conclusão	136
3.6 – Referências	137
Anexos	145

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

- ACN** – Acetonitrila
- Boc** – terc-butiloxicarbonila
- COSY** – *Correlated Spectroscopy*
- CSI** – *Chemical Shift Index* (Índice de Deslocamento Químico)
- δ** – Deslocamento Químico
- DIPEA** – N,N-Diisopropiletilamina
- DMF** – N,N-Dimetilformamida
- ESI** – Eletrospray Ionization
- EDT** – 1,2-etanoditol
- FID** – *Free Induction Decay* (Decaimento livre de indução)
- Fmoc** – Fluorenilmetiloxicarbonil
- HBTU** – *[benzotriazol-1-yloxy(dimethylamino)methylidene]-dimethylazanium hexafluorophosphate*
- HMQC** – *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*
- HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
- HSQC** – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
- MALDI** – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
- MS** – Espectrometria de Massa
- MS/MS** – Espectro de Fragmentação
- NOE** – *Efeito Overhauser Nuclear*
- NOESY** – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
- Pbf** – 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonila
- RMN** - Ressonância Magnética Nuclear
- RMN 1D** – Ressonância Magnética Nuclear em uma dimensão
- RMN 2D** – Ressonância Magnética Nuclear em duas dimensões
- RMSD** – Root of Mean Square Deviation (Raiz Quadrada dos Desvios Médios Quadrados)
- ROE** – *Rotating Frame Overhauser Effect*
- ROESY** – *Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*
- SA** – *Simulated Annealing*

TFA – Ácido Trifluoroacético

TIS – Triisopropilsilano

TOCSY – *Total Correlated Spectroscopy*

TOF – *Time-of-flight*

Trt – tritil

IM – Mobilidade Iônica

Lista de Figuras

Figura 1: (1) Estrutura geral dos aminoácidos, em que R1 é a cadeia lateral, o que difere os aminoácidos. (2) Formação da ligação peptídica, mostrada em vermelho. R1 e R2 são cadeias laterais de aminoácidos.	2
Figura 2: Esquema para ionização do tipo MALDI.	4
Figura 3: Esquema para a ionização por ESI.	4
Figura 4: Analisador TOF: (A) método linear, (B) método refletido, em que “E” é a energia cinética, “s” a distância percorrida da placa de ionização até o tubo de voo, “D” é a distância percorrida no tubo de voo, “L ₁ ” distância percorrida do tubo de voo até as lentes de reflexão, “L ₂ ” é a distância percorrida das lentes de reflexão até o detector do modo refletido e “d” e a distância percorrida na reflexão.	5
Figura 5: Esquema para experimento de fragmentação – MS/MS.	6
Figura 6: (A) Ligações que são rompidas para a formação dos íons a, b, c, x, y e z; (B) Peptídeos com as séries y e b de fragmentação.	7
Figura 7: Esquema para um Espectrômetro de Massa acoplado a um Espectrômetro de Mobilidade Iônica. (A) Após a ionização, os íons de interesse podem ser selecionados no analisador de Quadrupolo; em seguida são separados segundo a mobilidade iônica e, por fim, analisados por TOF. (B) A seção de mobilidade iônica por ser dividida em três partes: no TRAP os íons são acumulados e periodicamente liberados para a segunda parte, no IMS os íons são separados de acordo com suas mobilidades e no TRANSFER os separados são transferidos para o analisador.	8
Figura 8: Ângulos diedros Φ e Ψ mostrados em um peptídeo.	10
Figura 9: Principais NOEs utilizados no assinalamento sequencial. Em vermelho é indicado o NOE do H α com o H _N do próximo resíduo e em azul o NOE do H _N com o H α do resíduo anterior. R ₁ , R ₂ e R ₃ são cadeias laterais de aminoácidos.	11
Figura 10: Gráfico de energia durante a simulação por “Simulated Annealing”.	14
Figura 11: Proteína (Salmosina) que apresenta um motivo de desintegrina. É possível observar a formação de um hairpin, com a sequência RGD (cadeia	

lateral em destaque) localizada no centro do loop.....	17
Figura 12: Foto do anfíbio <i>Hypsiboas punctatus</i>	21
Figura 13: Esquema simplificado para a síntese em fase sólida.	23
Figura 14: Esquema para as principais etapas da síntese em fase sólida, em que AA1, AA2 ... representam os aminoácidos 1, 2, ... respectivamente.	25
Figura 15: Sequência identificada do cDNA e a sequência de aminoácidos traduzida. Em verde a sequência de aminoácido referente à região do peptídeo sinal; em azul, a região acídica; em vermelho, a região do peptídeo maduro (peptídeo de interesse) e em vinho a região não traduzida.	34
Figura 16: Estrutura do grupo protetor temporário Fmoc.	36
Figura 17: Estruturas dos grupos <i>t</i> -butil, <i>O-t</i> -butil, Trt, Pbf e Boc, protetores permanentes das cadeias laterais dos aminoácidos.	36
Figura 18: Estrutura da resina utilizada ao longo da síntese. Em vermelho o grupo amino protegido pelo Fmoc e P é a cadeia polimérica da resina.	37
Figura 19: Remoção do grupo Fmoc pela piperidina para a formação do grupo -NH ₂ livre.	37
Figura 20: Reação/mecanismo da ninhidrina com um α-aminoácido para a formação do azul de <i>Ruhemann</i>	38
Figura 21: Estruturas do HBTU, DIPEA e DMF.	39
Figura 22: Reação de ativação do aminoácido com HBTU, em que R ₁ é a cadeia lateral do aminoácido.	40
Figura 23: Reação de acoplamento do aminoácido ativado à resina, em que R ₁ é a cadeia lateral de um aminoácido.	41
Figura 24: Esquema geral para o acoplamento dos aminoácidos, em que R ₁ e R ₂ são cadeias laterais de aminoácidos.	41
Figura 25: Estruturas do Tioanisol, EDT e TIS.	42
Figura 26: Remoção da resina da cadeia peptídica, em que R ₁ é a cadeia da resina, R ₂ é a cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho a estrutura a ser retirada pela clivagem para a formação do peptídeo amidado.	43
Figura 27: Retirada do grupo <i>t</i> -butil da serina, em que R ₁ e R ₂ são continuações da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.	43

Figura 28: Retirada do grupo Boc do triptofano, em que R ₁ e R ₂ são continuações da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.	44
Figura 29: Retirada do grupo O- <i>t</i> -butil do ácido aspártico, em que R ₁ e R ₂ são continuações da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.	44
Figura 30: Retirada do grupo tritil (Trt) da cisteína, em que R ₁ e R ₂ são continuações da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.	45
Figura 31: Retirada do grupo Pbf da arginina, em que R ₁ e R ₂ são continuações da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.	46
Figura 32: Espectro de Massa do peptídeo KGD sintetizado (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ([M+H] ⁺ = 1669,57).	47
Figura 33: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor.	48
Figura 34: Cromatograma do peptídeo KGD. O * indica a fração referente ao peptídeo reduzido.	49
Figura 35: Cromatograma do peptídeo após oxidação.	49
Figura 36: Expansão do cromatograma do peptídeo após oxidação (mostrado na Figura 35), indicando (1) peptídeo oxidado e (2) peptídeo reduzido.	50
Figura 37: Espectro de massa do peptídeo oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ([M+H] ⁺ = 1667,68).	50
Figura 38: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo oxidado e também à presença de adutos de sódio e potássio.	51
Figura 39: Estrutura calculada para o peptídeo KGD. Sobreposição das 20 estruturas de menor energia.	54
Figura 40: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido.	55
Figura 41: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H _α do peptídeo KGD.	56
Figura 42: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C _α do peptídeo KGD.	56

Figura 43: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C _β do peptídeo KGD.	56
Figura 44: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo KGD.	57
Figura 45: Estruturas (A) região KGD do peptídeo KGD, (B) região KGD de uma desintegrina com motivo KGD (PDB_1Q7J).	59
Figura 46: Espectro de Massa (MS) do peptídeo RGD (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ([M+H] ⁺ = 1697,54).	61
Figura 47: Espectro de Massa do peptídeo HGD (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ([M+H] ⁺ = 1678,52).	61
Figura 48: Espectro de MS/MS do peptídeo RGD referente à fragmentação do íon precursor.	62
Figura 49: Espectro de MS/MS do peptídeo HGD referente à fragmentação do íon precursor.	63
Figura 50: Cromatograma do peptídeo RGD, com a fração referente ao peptídeo reduzido em destaque.	64
Figura 51: Cromatograma do peptídeo HGD, com a fração referente ao peptídeo reduzido em destaque.	64
Figura 52: Cromatograma do peptídeo RGD após ser submetido a oxidação.	65
Figura 53: Cromatograma do peptídeo HGD após ser submetido a oxidação.	66
Figura 54: Ampliação do cromatograma do peptídeo RGD após oxidação. (1) fração referente ao peptídeo oxidado e (2) fração referente ao peptídeo reduzido.	66
Figura 55: Ampliação do cromatograma do peptídeo HGD após oxidação. (1) fração referente ao peptídeo oxidado e (2) fração referente ao peptídeo reduzido.	66
Figura 56: Espectro de massa do peptídeo RGD oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ([M+H] ⁺ = 1695,68).	68

Figura 57: Espectro de massa do peptídeo HGD oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ($[M+H]^+ = 1676,49$).	68
Figura 58: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo RGD oxidado.	69
Figura 59: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo HGD oxidado.	69
Figura 60: Estruturas calculadas para os peptídeos KGD, RGD e HGD. Sobreposição das 20 estruturas de menor energia para cada peptídeo.	73
Figura 61: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido para o peptídeo RGD.	74
Figura 62: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido para o peptídeo HGD.	75
Figura 63: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H_α do peptídeo RGD.	75
Figura 64: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_α do peptídeo RGD.	76
Figura 65: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_β do peptídeo RGD.	76
Figura 66: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H_α do peptídeo HGD.	76
Figura 67: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_α do peptídeo HGD.	77
Figura 68: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_β do peptídeo HGD.	77
Figura 69: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo RGD.	78
Figura 70: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo HGD.	78
Figura 71: Comparação da região RGD de proteínas com ações antitrombóticas com o peptídeo RGD: (A) Proteína Flavoridina, (B) Proteína Echistatina, (C) Proteína Kistrina, (D) Proteína Salmosina, (E) Proteína Rhodostomina e (F) Peptídeo RGD.	80
Figura 72: Foto do anfíbio <i>Phyllomedusa centralis</i>	89

Figura 73: Espectro de Massa do hexapeptídeo (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ($[M+H]^+ = 864,51$).	99
Figura 74: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor.	100
Figura 75: Cromatograma do hexapeptídeo. Em destaque a fração de interesse referente ao peptídeo.	101
Figura 76: Espectro de Massa do peptídeo puro – presença do peptídeo com dupla carga ($[M+2H]^{2+} = 432,76$ Da) e carga simples ($[M+H]^+ = 864,50$ Da).	102
Figura 77: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + $^{113}\text{Cd(II)}$, onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[M+2H]^{2+} = 432,7567$ Da.	103
Figura 78: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo + $^{113}\text{Cd(II)}$ onde é possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7567$ Da) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do cádmio ($[M+\text{Cd}]^{2+} = 488,1989$ Da). O total da massa é $976,3978$ Da, sendo $863,50$ Da referente à massa do peptídeo e $112,89$ Da referente à massa do Cd. É possível observar no espectro a diferença de massa de $55,4422$ ($55,4422 \times 2$ pois é duplamente carregado) mais duas unidade de massa referente a dois “H” pois o peptídeo não é mais ionizado pela protonação e sim pelo Cd^{2+} , totalizando a diferença de $112,89$ Da, massa referente ao cádmio.	104
Figura 79: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7567$ Da).	105
Figura 80: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + $^{113}\text{Cd(II)}$ duplamente carregado ($[M+\text{Cd}]^{2+} = 488,1989$ Da).	106
Figura 81: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + Zn(II) , onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da.	107
Figura 82: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo + Zn(II) onde é possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do Zinco ($[M+\text{Zn}]^{2+} = 463,7054$). O total da massa é de $927,4108$ Da, sendo $863,50$ Da referente à massa do peptídeo e $63,91$ Da referente à massa do zinco. É possível observar no espectro a diferença de massa de $30,9568$ (este valor $\times 2$	

pois é duplamente carregado) mais duas unidade de massa referente a dois “H” pois o peptídeo não é mais ionizado pela protonação e sim pelo Zn^{2+} , totalizando a diferença de 63,91 Da, massa referente ao zinco.108

Figura 83: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da).109

Figura 84: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + Zn(II) duplamente carregado ($[M+Zn]^{2+} = 463,7054$ Da).110

Figura 85: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + CO₂, onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[M+2H]^{2+} = 432,7546$ Da.111

Figura 86: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo em contato com CO₂, onde é possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do CO₂ ou duas moléculas de sódio ($[M+2Na]^{2+} = [M+2H+CO_2]^{2+} = 454,7344$ Da). O total da massa é de 909,4688 Da, podendo ser 863,50 Da referente à massa do peptídeo, dois prótons pois a massa é referente ao peptídeo duplamente carregado e 44,010 Da referente à massa do CO₂. Outra possibilidade é 863,50 Da referente ao peptídeo, e 45,98 Da referente massa de dois átomos de sódio (aduto de sódio).112

Figura 87: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7543$ Da).113

Figura 88: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + CO₂ ou peptídeo + 2Na, duplamente carregado ($[M+2H+CO_2]^{2+}$ ou $[M+2Na]^{2+} = 454,7344$ Da).114

Figura 89: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Cd(II) e do peptídeo em pH 4,3.116

Figura 90: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Zn(II) e do peptídeo em pH 4,2.116

Figura 91: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Cd(II) e do peptídeo + Zn(II).117

Figura 92: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + CO₂ e do peptídeo em pH 4,5.118

Figura 93: RMN- ¹ H do peptídeo livre, do peptídeo + O ₂ e do peptídeo em pH 5,9.	119
Figura 94: RMN- ¹ H do peptídeo livre, do peptídeo + CO ₂ e do peptídeo + O ₂ .	119
Figura 95: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da histidina-1 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ para a Histidina-1.	120
Figura 96: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da arginina-2 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ .	121
Figura 97: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da fenilalanina-3 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ .	121
Figura 98: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da leucina-4 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ .	121
Figura 99: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da arginina-5 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ .	122
Figura 100: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da histidina-6 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO ₂ .	122
Figura 101: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo em solução.	124
Figura 102: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + Cd(II) em solução.	125
Figura 103: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + Zn(II) em solução.	126
Figura 104: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + CO ₂ em solução.	127
Figura 105: Modelo para a interação do CO ₂ com peptídeo pelas argininas 2 e 5, proposto com base na estrutura calculada de menor energia para o peptídeo quando em contato com o gás.	128

Figura 106: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis para o peptídeo, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO ₂	128
Figura 107: Espectros de RMN- ¹ H para o hexapeptídeo em diferentes concentrações de Cd(II).	129
Figura 108: Espectros de RMN- ¹ H para o hexapeptídeo em diferentes concentrações de Zn(II).	129
Figura 109: Gráfico Deslocamento Químico do H _N do anel imidazólico da histidina-6 <i>versus</i> Concentração de Cd(II).	130
Figura 110: Gráfico Deslocamento Químico do H _N do anel imidazólico da histidina-6 <i>versus</i> Concentração de Zn(II).	131
Figura 111: Espectro de MS/MS referente ao íon precursor [M+Cd] ²⁺ = 488,7191 Da e os íons fragmentos gerados [M+2H] ²⁺ = 432,7714 Da e [M+3H] ³⁺ = 288,8480 Da.	133
Figura 112: Espectro de MS/MS referente ao íon precursor [M+Zn] ²⁺ = 463,7235 Da e o íon fragmento gerado [M+3H] ³⁺ = 288,8406 Da.	132
Figura 113: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo livre, mostrando um <i>Drif Time</i> de 3.55 ms.	133
Figura 114: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo + cádmio, mostrando um <i>Drif Time</i> de 3.85 ms.	133
Figura 115: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo + zinco, mostrando um <i>Drif Time</i> de 3.82 ms.	134
Figura 116: Espectro de Mobilidade Iônica para a fragmentação do íon [M+Cd] ²⁺ = 488,7191 Da (próximo a 3,8 ms) em que é possível observar a mobilidade do íon [M+3H] ³⁺ = 288,8480 Da (próximo a 2,7 ms).	135
Figura 117: Espectro de Mobilidade Iônica para a fragmentação do íon [M+Zn] ²⁺ = 463,7235 Da (próximo a 3,8 ms) em que é possível observar a mobilidade do íon [M+3H] ³⁺ = 288,8480 Da (próximo a 2,7 ms).	135

Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação da constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$ com o ângulo de diedro Φ e a estrutura secundária do peptídeo.	10
Tabela 2: Relação entre a intensidade do NOE com a distância entre os átomos.	13
Tabela 3: Massa molecular dos aminoácidos utilizados com seus respectivos grupos protetores temporários (Fmoc) e permanentes (OtButil, Trt, Boc, Pbf e tButil) e massa, em miligramas, para 0,4 mmol.	24
Tabela 4: Gradiente de eluição para a purificação por HPLC.	26
Tabela 5: Parâmetros de aquisição para os experimentos de RMN 2D. TD = <i>time domain</i> ; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = <i>dummy scans</i>	28
Tabela 6: Dados de aquisição para os experimentos de TOCSY para determinação de ligações de hidrogênio. TD = <i>time domain</i> ; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = <i>dummy scans</i>	30
Tabela 7: Sequências de aminoácidos para os peptídeos RGD e HGD.	31
Tabela 8: Comparação entre a sequência de aminoácidos do peptídeo KGD com outros peptídeos também com a sequência KGD com atividade antitrombótica.	35
Tabela 9: Constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$ para cada aminoácido.	52
Tabela 10: Ângulos diedros Φ e Ψ calculados pelo programa TALOS.	53
Tabela 11: Sequência de aminoácidos do peptídeo RGD e outros peptídeos antitrombóticos contendo o domínio RGD.	59
Tabela 12: Massa monoisotópica para os peptídeos RGD e HGD.	60
Tabela 13: Constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$ para cada aminoácido dos peptídeos análogos.	69
Tabela 14: Ângulos diedros Φ e Ψ calculados pelo programa TALOS para os peptídeos RGD e HGD.	71
Tabela 15: Sequência de aminoácidos para os peptídeos KGD, RGD e HGD, e outros peptídeos inibidores de tripsina.	79

Tabela 16: Massa molecular dos aminoácidos utilizados com seus respectivos grupos protetores temporários (Fmoc) e permanentes (Trt e Pbf) e massa, em gramas, para 0,4 mmol.	89
Tabela 17: Gradiente de eluição para a purificação por HPLC.	91
Tabela 18: Parâmetros de aquisição dos experimentos de RMN- ¹ H. TD = <i>time domain</i> ; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = <i>dummy scans</i> ; SW = janela espectral e o1 = centro da janela espectral.	92
Tabela 19: Dados de aquisição para os experimentos de RMN 2D.	94
Tabela 20: Parâmetros de aquisição dos experimentos de ¹ H-RMN.	96
Tabela 21: Valores de pH para a solução de peptídeo em diferentes condições.	114
Tabela 22: Ângulos de diedros Φ e Ψ calculados para o peptídeo, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO ₂	122

Capítulo I

Espectrometria de Massa, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cálculos Estruturais no Estudo de Peptídeos

1.1 – Introdução

1.1.1 – Peptídeos

Peptídeos são biomoléculas que podem ser encontradas naturalmente em eucariotos e procariotos.¹ São constituídos pela união de dois ou mais aminoácidos através de ligações peptídicas (ligações amídicas), como mostrado na Figura 1.²

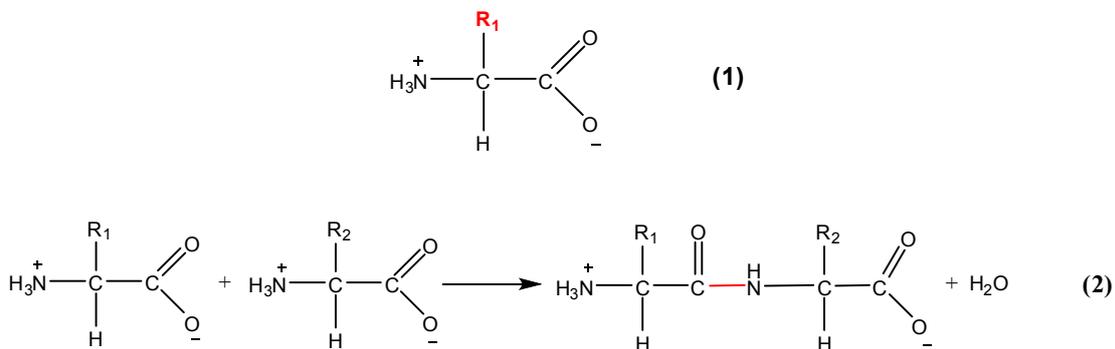


Figura 1: (1) Estrutura geral dos aminoácidos, em que R_1 é a cadeia lateral, o que difere os aminoácidos. (2) Formação da ligação peptídica, mostrada em vermelho. R_1 e R_2 são cadeias laterais de aminoácidos.

Existem basicamente 20 diferentes aminoácidos, que podem, em diferentes combinações, constituir os peptídeos.³ Um aminoácido é diferenciado de outro pelo grupo da cadeia lateral (R) e um exemplo para uma estrutura geral dos aminoácidos pode ser observado na Figura 1. Um quadro com os 20 diferentes aminoácidos é encontrado no Anexo 1.

Peptídeos podem apresentar diversas atividades biológicas, o que os tornam bastante importantes ao meio no qual se inserem e também objeto de estudos no planejamento de novos fármacos.⁴ Podem apresentar diversas funções, como antimicrobianos,⁵ antitrombóticos,⁶ opioides,⁷ antioxidantes,⁸ dentre outras.

Um fator de extrema importância no estudo de peptídeos é o conhecimento da estrutura, uma vez que a estrutura da molécula está diretamente relacionada com a sua função e também com o seu mecanismo de ação. Para tal, as técnicas de Espectrometria de Massa e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) associadas a cálculos estruturais são fundamentais

para proceder estudos estruturais,⁹ tornando possível assim estabelecer a relação estrutura/atividade.

1.1.2 – Espectrometria de Massa no Estudo de Peptídeos

A Espectrometria de Massa é uma técnica capaz de determinar a relação massa/carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa,¹⁰ sendo de extrema importância para estudo de peptídeos, pois torna possível identificar, quantificar e detectar possíveis modificações.¹¹

Por ser uma técnica que trabalha com íons em fase gasosa e devido à dificuldade de se produzir íons estáveis em fase gasosa com moléculas de peptídeos, as fontes de ionização mais utilizadas para estudos de proteínas e peptídeos são MALDI e Eletrospray (ESI). Essas fontes tornam possíveis a ionização em fase gasosa de moléculas com alto peso molecular, possibilitando grandes avanços no estudos de biomoléculas.¹²

Na ionização do tipo MALDI, a amostra a ser analisada é misturada com um excesso de uma solução de matriz (geralmente um ácido ou uma base orgânica) e a mistura é depositada em uma placa metálica. O solvente é então evaporado, formando um precipitado com a amostra e a matriz. Este precipitado é irradiado com pulsos de laser, desolvando as moléculas em questão da placa metálica e, após transferência de próton com a matriz, o analito é ionizado.¹³ Um esquema simplificado representando a ionização do tipo MALDI pode ser observado na Figura 2.

A matriz utilizada deve ser capaz de absorver uma grande quantidade de energia no comprimento de onda do laser a ser irradiado.¹⁴ Algumas matrizes utilizadas na técnica de MALDI são: ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico, ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB), ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 3-aminoquinolina, dentre outros. A técnica de MALDI gera, principalmente, íons monocarregados.¹⁵

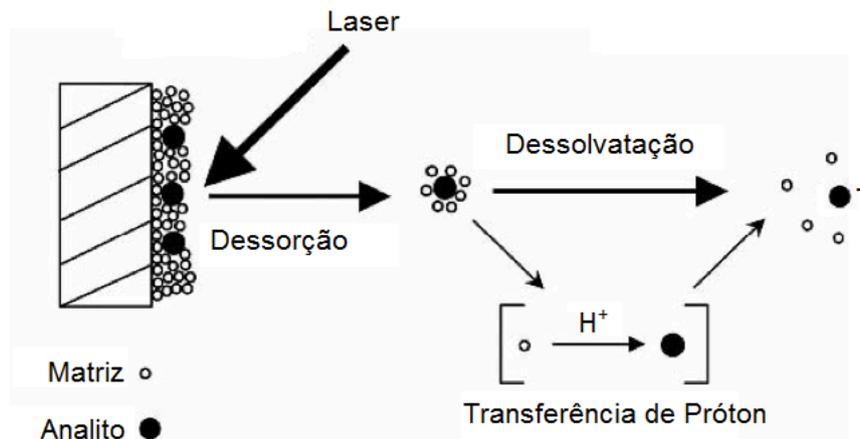


Figura 2: Esquema para ionização do tipo MALDI.¹⁶

Na ionização por ESI uma solução contendo o analito é bombeada para um tubo capilar com alta voltagem, provocando a dispersão do líquido (formação de um spray) e a formação de gotículas com múltiplas cargas. Estas gotículas são submetidas a um gás secante, onde ocorre a dessorvatação e a diminuição de seu volume, com a permanência das cargas.¹¹ Essa diminuição do volume gera instabilidade nas gotículas devido à proximidade das cargas, ocasionando uma grande repulsão em que a gotícula é rompida. Como consequência, ocorre a formação do analito com múltiplas cargas.¹⁷ Um esquema para a ionização por ESI pode ser visto na Figura 3.

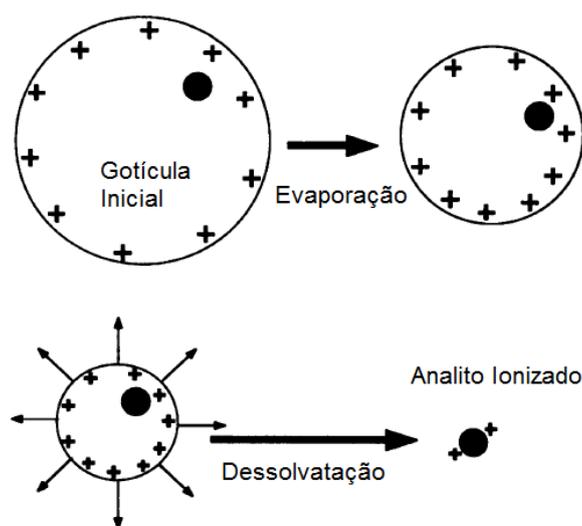


Figura 3: Esquema para a ionização por ESI.¹⁷

Um dos analisadores bastante utilizado nos estudos de peptídeos e proteínas é o analisador por tempo de voo (TOF). Neste analisador, os íons gerados na fonte de ionização são acelerados com um valor fixo de energia cinética e então encaminhados para um tubo de voo.¹⁶ Os íons atravessam esse tubo, que apresenta uma distância pré-estabelecida. Baseado no tempo em que os íons percorrem o tubo de voo, a relação m/z de cada íon pode ser determinada.¹² Íons com menor peso molecular irão apresentar maior velocidade e serão detectados primeiro do que os íons de maior peso molecular.¹² Um esquema do analisador TOF pode ser observado na Figura 4.

Os analisadores do tipo TOF podem apresentar um método refletido de análise, em que as lentes refletoras são encontradas ao final do tubo de voo. Esse método é utilizado para corrigir a diferença inicial de energia entre os íons; com isso, íons de mesma massa mas com energias cinéticas diferentes apresentam o mesmo tempo de voo.^{14,16} Um esquema do analisador do tipo TOF com o método refletido pode ser visto na Figura 4.

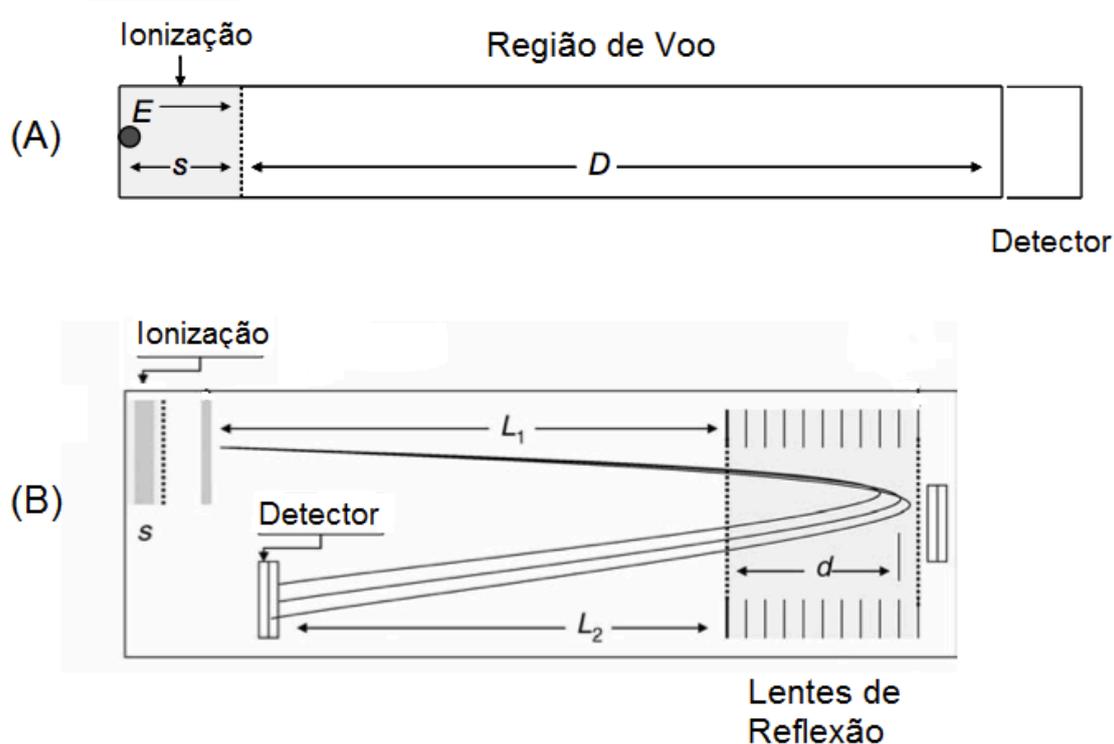


Figura 4: Analisador TOF: (A) método linear, (B) método refletido,¹⁸ em que “E” é a energia cinética, “s” a distância percorrida da placa de ionização até o tubo de voo, “D” é a distância percorrida no tubo de voo, “L₁” distância percorrida do tubo de voo até as lentes de reflexão, “L₂” é a distância percorrida das lentes de reflexão até o detector do modo refletido e “d” é a distância percorrida na reflexão.

A Espectrometria de Massa também possibilita a obtenção de espectros de fragmentação (chamados MS/MS), bastante utilizados para determinar a sequência de aminoácidos em proteínas e peptídeos. Nesse experimento, são utilizados dois analisadores. O primeiro é responsável por selecionar o íon de interesse gerado pela fonte de ionização. Este íon precursor é então submetido a uma câmara de colisão com gás inerte (como por exemplo N_2 ou Ar) para que ocorra a fragmentação. O segundo analisador analisa as massas dos íons gerados pela fragmentação do íon precursor.¹⁶ Um esquema para um experimento de fragmentação pode ser observado na Figura 5.

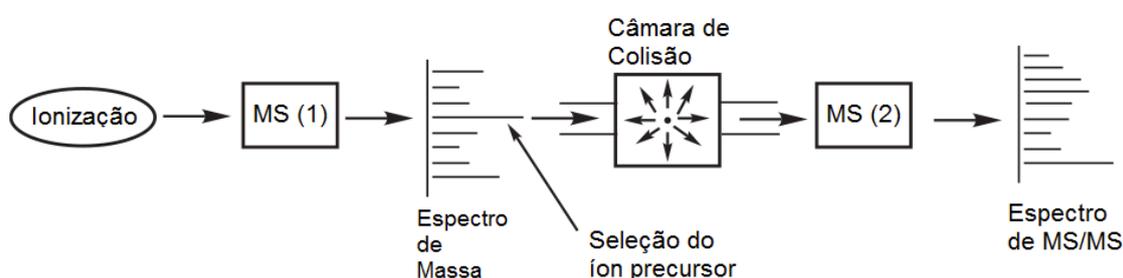


Figura 5: Esquema para experimento de fragmentação – MS/MS.¹⁰

Na câmara de colisão, a energia do choque entre o gás inerte e o peptídeo possibilita a desestabilização e o rompimento de algumas ligações, induzindo, basicamente, a formação de dois íons fragmentos.¹⁹ Tais fragmentos iônicos são classificados de acordo com o lado do fragmento que o íon se encontra: lado N-terminal ou C-terminal. Íons chamados de “a”, “b” e “c” são referentes ao lado N-terminal e os íons “x”, “y” e “z” são referentes ao lado C-terminal.¹⁹ As ligações que são rompidas para gerar tais íons podem ser observadas na Figura 6.

Existem pares de fragmentos iônicos que correspondem a fragmentos opostos entre si e que por isso são complementares como a/x, b/y e c/z. Os íons y e b são mais facilmente gerados do que os demais íons, pois estes são originados pelo rompimento das ligação peptídicas, que são menos energéticas.²⁰ Por esse motivo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo pode ser determinada utilizando as séries dos íons y e b pelo cálculo da diferença de massa entre picos vizinhos em uma mesma série.²⁰ Um exemplo

para a determinação da sequência de aminoácidos de um peptídeo pode ser visto na Figura 6.

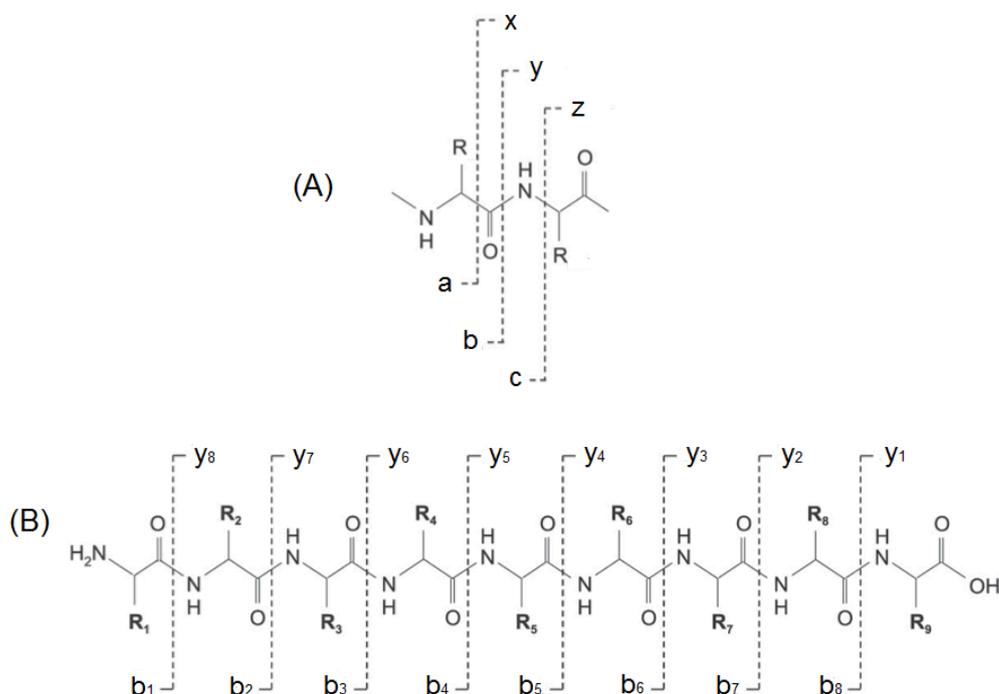


Figura 6: (A) Ligações que são rompidas para a formação dos íons a, b, c, x, y e z; (B) Peptídeos com as séries y e b de fragmentação.²⁰

A Espectrometria de Massa também pode ser acoplada a um método de separação, como a separação por Mobilidade Iônica (IM), e se tornar uma ferramenta ainda mais poderosa no estudo de peptídeos. Quando tais técnicas são acopladas é possível obter relações entre massa, carga e área de contato (área de colisão), fornecendo informações sobre as conformações de íons (como peptídeos formando ou não pontes dissulfeto) além da própria relação m/z obtida em um espectro de massa.²¹ Com isso, torna-se possível analisar tamanhos físicos e conformações de íons em fase gasosa.²¹

No separador por mobilidade iônica um conjunto de íons pode ser separado quando submetido a passar por um gás inerte (semelhante à fase estacionária em uma cromatografia), como por exemplo N_2 ou He, e sobre a influência de um campo elétrico baixo (como por exemplo, de 15 a 30 $V \cdot cm^{-1}$).²² Os íons são então separados pela diferença de mobilidade para atravessar tal gás.²³ Um esquema para um Espectrômetro de Massa acoplado a um Espectrômetro de Mobilidade Iônica pode ser observado na Figura 7.

A mobilidade do íon é proporcional à sua carga: quanto mais carga, maior será a sua mobilidade pelo gás.²⁴ A massa é outro fator que influencia na mobilidade: quanto menor a massa, maior a mobilidade.²⁵ Com a mesma massa, íons com uma conformação compactada apresentarão maior mobilidade do que íons com conformações estendidas, tornando possível, por exemplo, distinguir peptídeos cíclicos de peptídeos lineares.²⁶

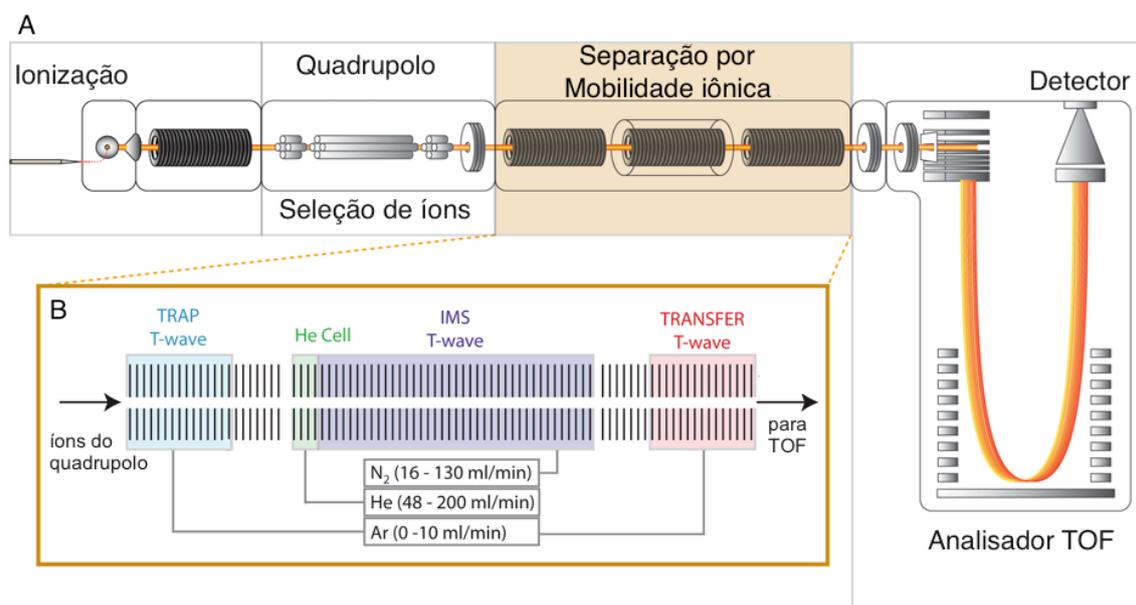


Figura 7: Esquema para um Espectrômetro de Massa acoplado a um Espectrômetro de Mobilidade Iônica. (A) Após a ionização, os íons de interesse podem ser selecionados no analisador de Quadrupolo; em seguida são separados segundo a mobilidade iônica e, por fim, analisados por TOF. (B) A seção de mobilidade iônica por ser dividida em três partes: no TRAP os íons são acumulados e periodicamente liberados para a segunda parte, no IMS os íons são separados de acordo com suas mobilidades e no TRANSFER os separados são transferidos para o analisador.²⁷

1.1.3 – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Estudo de Peptídeos

No estudo de biomoléculas é cada vez mais importante ter o conhecimento da estrutura da molécula a ser estudada para melhor compreender sua atividade e poder obter a relação estrutura/atividade. Esta relação, além de possibilitar melhor entendimento da biomolécula, permite também realizar desenhos de novas moléculas, objetivando otimizar sua atividade. Nesse sentido, a RMN vem se tornando uma técnica fundamental, com vários recursos e de extrema importância para a determinação estrutural e estudos estruturais de proteínas e peptídeos.²⁸

Para determinar a estrutura de peptídeos em solução, são realizados cálculos de estruturas utilizando parâmetros obtidos em experimentos de RMN em duas dimensões (RMN 2D). Para tal, utilizam-se experimentos como TOCSY, HSQC, COSY e NOESY.²⁹

O experimento TOCSY (**T**Otal **C**orrelated **S**pectroscop**Y**)³⁰ é utilizado para assinalar os hidrogênios da molécula. Esse experimento apresenta uma sequência spin-lock ao longo de sua sequência de pulsos, e por isso, a magnetização resultante permanece no plano xy, tornando possível assim a transferência de magnetização entre os átomos.³¹ Essa transferência de magnetização ocorre de um átomo a outro até passar por todos os átomos dentro de um mesmo sistema de spins em acoplamento. Multipletos que acoplam entre si, mas não acoplam fora do sistema caracterizam um sistema de spins; um sistema de spins é isolado de outro por heteroátomos ou carbono tetrasubstituído.³²

Por apresentar correlação entre todos os átomos de hidrogênio de um mesmo sistema de spins, o experimento TOCSY se torna importante no estudo de peptídeos, pois cada aminoácido do peptídeo constitui um sistema de spins diferente, isolado pela ligação peptídica.³³ Com isso, haverá correlação total apenas entre os átomos de hidrogênio intrarresiduais, o que facilita a identificação de cada resíduo e também o assinalamento dos hidrogênios.

O experimento HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence)³⁴ é utilizado para assinalar os átomos de carbono e nitrogênio da molécula. O espectro resultante mostra correlação de acoplamento heteronuclear ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ou $^1\text{H}-^{15}\text{N}$) a uma ligação (^1J).³⁵ Esse experimento utiliza a técnica de detecção inversa em que a detecção é feita no núcleo mais sensível, no caso o hidrogênio. Os espectros de HSQC apresentam melhor resolução quando comparados aos de HMQC, e que por isso, são mais apropriados para biomoléculas.³⁵

O experimento COSY (**C**orrelated **S**pectroscop**Y**)^{36,37} é utilizado para auxiliar nos assinalamentos dos átomos de hidrogênio e também para a determinação da constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$. O espectro resultante mostra correlação homonuclear ($^1\text{H}-^1\text{H}$) entre pares de átomos vizinhos por meio de acoplamento spin-spin a duas e três ligações (^2J e ^3J).^{35,38}

O valor da constante $J_{\text{HN-H}\alpha}$ pode ser utilizado para auxiliar a determinação da estrutura secundária do peptídeo, visto que esse valor irá ser característico para a estrutura adotada e pode ser relacionado com o valor do ângulo de diedro Φ (Figura 8).³³ A Tabela 1 mostra a relação dos valores dessa constante com a estrutura secundária do peptídeo.

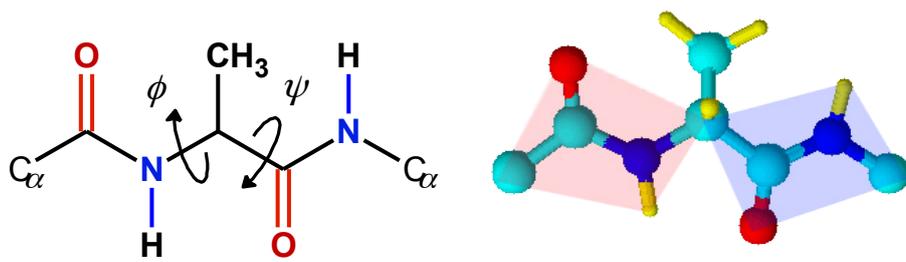


Figura 8: Ângulos diedros Φ e Ψ mostrados em um peptídeo.³

Tabela 1: Relação da constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$ com o ângulo de diedro Φ e a estrutura secundária do peptídeo.³³

Estrutura Secundária	Angulo Φ	Valor da constante $J_{\text{HN-H}\alpha}$ (Hz)
α -hélice	-57°	3,9
Folha β Antiparalela	-139°	8,9
Folha β Paralela	-119°	9,7

O experimento de RMN mais importante para a determinação da estrutura tridimensional de peptídeos e proteínas é o NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).³⁹ Quando um núcleo é perturbado por uma irradiação e a intensidade do sinal de outro núcleo espacialmente próximo é alterada, seja aumentada ou diminuída, esse efeito é chamado de efeito de Overhauser Nuclear (NOE).³⁵ O NOE depende da distância espacial entre os átomos, não sendo dependente da existência de acoplamento escalar entre eles,⁴⁰ mas sim do acoplamento dipolar existente entre os átomos espacialmente próximos.

O efeito NOE observado está relacionado ao processo de relaxação dipolar. Quando dois núcleos estão espacialmente próximos, a relaxação de um irá interferir na relaxação de outro, o que pode gerar uma mudança na intensidade do sinal de até 50%.⁴¹ O efeito de NOE é muito utilizado para

análise estrutural de moléculas grandes (biomoléculas) e é observado somente se os núcleos estiverem separados a uma distância máxima de 5 Å.⁴⁰

No experimento NOESY são observados NOEs em duas dimensões. O espectro é constituído por uma diagonal, semelhante ao espectro COSY, referente ao espectro convencional de hidrogênio, e por sinais fora da diagonal,³⁵ que constituem evidências de existir interação através do espaço (acoplamento dipolar, NOE), entre os átomos. As intensidades dos sinais cruzados irão depender da distância espacial entre os átomos: quanto maior for a proximidade entre os átomos, maior será a intensidade do sinal no espectro de NOESY.³⁵ Esses dados são importantes quando da realização de proceder cálculos estruturais para determinar a estrutura do peptídeo, uma vez que as intensidades dos NOEs são convertidas em restrições de distância.⁴²

Os espectros NOESY e TOCSY são utilizados simultaneamente para realizar um assinalamento sequencial dos aminoácidos, identificando/confirmando a estrutura primária do peptídeo ou proteína. Ao identificar um sistema de spins pelo espectro de TOCSY e realizar o assinalamento desse aminoácido, é possível identificar os outros aminoácidos vizinhos pelo espectro de NOESY. No espectro de NOESY, o H_α de um aminoácido irá apresentar NOE com o H_N do mesmo resíduo e também com o H_N do próximo resíduo de aminoácido, tornando possível, com isso, localizar o próximo aminoácido da sequência.^{33,43} Do mesmo modo, o H_N de um resíduo irá apresentar NOE com o H_α do mesmo resíduo e também com o H_α do resíduo anterior.^{33,43} Com isso, utilizando-se assinalamento sequencial, é possível identificar os aminoácidos tanto pelo lado do C-terminal, quanto pelo lado do N-terminal. Um exemplo com os NOEs utilizados no assinalamento sequencial pode ser observado na Figura 9.

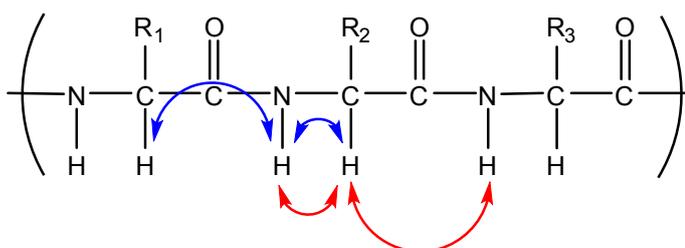


Figura 9: Principais NOEs utilizados no assinalamento sequencial. Em vermelho é indicado o NOE do H_α com o H_N do próximo resíduo e em azul o NOE do H_N com o H_α do resíduo anterior. R₁, R₂ e R₃ são cadeias laterais de aminoácidos.

Os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono, em especial H_{α} , C_{α} e C_{β} , podem fornecer informações importantes sobre a estrutura secundária de peptídeos e proteínas.⁴⁴ Para tal, é preciso calcular o índice de deslocamento químico (CSI), em que o valor do deslocamento químico dos átomos de interesse é subtraído do valor do deslocamento químico do mesmo átomo do mesmo resíduo de aminoácido quando em uma estrutura randômica.^{44,45} Quando um grupo de átomos de H_{α} ou C_{β} apresentam CSI maior do que zero (isto é, valores de deslocamento maiores do que os mesmos átomos quando comparados a uma estrutura randômica), a estrutura tende a apresentar uma folha β e quando o CSI apresentar um valor negativo, a estrutura tende a apresentar uma α -hélice.^{46,47} O contrário pode ser observado para o C_{α} , em que um grupo de átomos com CSI positivo irá dar indícios da presença de uma α -hélice, enquanto que o CSI negativo dará indícios da presença de uma folha β .^{46,47}

1.1.4 – Cálculos Estruturais no Estudo de Peptídeos

Os parâmetros obtidos por RMN por meio de experimentos como TOCSY, COSY, HSQC e NOESY podem fornecer informações importantes para realizar cálculos estruturais e com isso determinar a estrutura trimimensional de peptídeos e proteínas.

Experimentos como TOCSY, COSY e HSQC possibilitam o assinalamento completo dos átomos de hidrogênio, carbono e nitrogênio do peptídeo ou da proteína. Os valores de deslocamento químico de C_{α} , C_{β} e N_H , juntamente com os valores de H_{α} e H_{β} podem ser utilizados para cálculos teóricos dos ângulos de diedro Φ e Ψ (Figura 8),⁴⁸ que são essenciais para a estrutura secundária do peptídeo. O espectro de NOESY possibilita assinalar os NOEs existentes entre os átomos de hidrogênio na molécula. As intensidades dos NOEs podem ser convertidas em restrições de distância para o cálculo de estrutura.⁴⁹ Assim, será possível estabelecer um valor aproximado de distância entre dois átomos, relacionando a intensidade do NOE com essa distância, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Relação entre a intensidade do NOE com a distância entre os átomos.³³

Intensidade do NOE	Distância entre os átomos (Å)
Forte	2,8
Média	3,4
Fraca	5,0

As restrições de distâncias e os ângulos de diedro podem ser utilizados como parâmetros para proceder cálculos estruturais, o que torna possível a determinação da estrutura tridimensional de peptídeos e proteínas.

As estruturas calculadas utilizando tais parâmetros podem ser otimizadas e refinadas por dinâmica molecular com o método de “simulated annealing”(SA).⁵⁰ Proteínas e peptídeos podem adotar inúmeras conformações estáveis que são separadas por grande barreiras de energia e o método de SA pode dar evidências das estruturas mais estáveis e de menor energia.⁵¹

O SA realiza simulações com as moléculas a altas temperaturas para superar essas barreiras de energia e, em seguida, realiza um esfriamento gradual para obter as conformações de mais baixa energia (mais estáveis) para a molécula.⁵¹ A simulação se inicia com altas temperaturas e com uma estrutura com a conformação estendida (Φ e $\Psi = 180^\circ$). Em seguida, a temperatura é diminuída e a energia minimizada para identificar a conformação mais estável de acordo com as restrições inicialmente impostas.⁵² Um gráfico mostrando as energias ao longo da simulação pode ser observado na Figura 10.

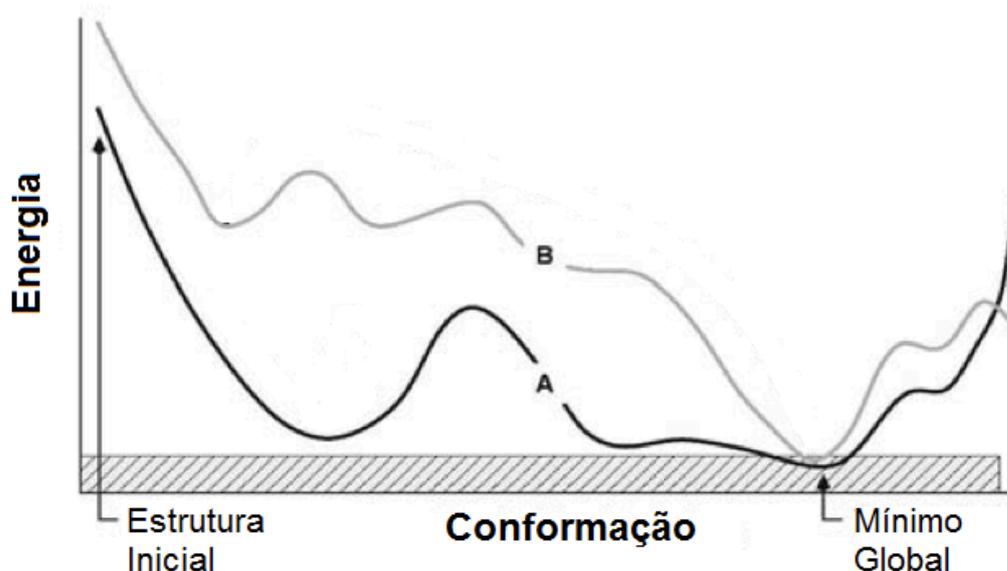


Figura 10: Gráfico de energia durante a simulação por “Simulated Annealing”.⁴⁹ Em que “A” e “B” são diferentes simulações para atingir o mesmo mínimo global.

O parâmetro mais importante obtido por RMN para determinar a estrutura de um peptídeo são as restrições de distância relacionadas com o NOE, em que centenas de NOEs podem fornecer informações suficientes para obter uma estrutura confiável e de boa qualidade.⁴³ Estruturas de baixa qualidade podem ser obtidas com uma média de 5 NOEs por resíduo de aminoácido, enquanto que estruturas de boa qualidade e confiabilidade devem apresentar mais do que 15 NOEs por resíduo de aminoácidos.⁴³

Outra maneira de avaliar estruturas calculadas é pela raiz quadrada dos desvios médios quadrados (RMSD). O RMSD é capaz de medir a similaridade entre diferentes estruturas.⁵³ Estruturas calculadas de boa qualidade devem apresentar um RMSD menor do que 0,5 Å.⁴³

Capítulo II

Análogos Antitrombóticos: Síntese, Purificação, Caracterização e Determinação Estrutural

2.1 – Introdução

2.1.1 – Integrinas e Desintegrinas

As integrinas são proteínas que constituem uma classe de receptores heterodiméricos que estão presentes nas membranas plaquetárias. São elas as responsáveis por mediar as interações e adesão entre as células.⁵⁴ A adesão celular é um processo importante para os sistemas biológicos, pois é responsável por distribuir as células nos lugares apropriados ao longo do corpo, controlar a proliferação celular e também a apoptose.⁵⁵

As integrinas podem regular diversas funções fisiológicas como a migração celular, crescimento celular e apoptose,⁵⁵ além de poderem estar diretamente relacionadas a certas doenças, como a metástase de tumores, imuno-disfunções, osteoporose e problemas de coagulação.⁵⁶ As integrinas são as principais responsáveis para a ocorrência da agregação plaquetária.

Desintegrinas são peptídeos ou proteínas extraídas de veneno de cobras que se ligam às integrinas, modificando sua funcionalidade, especialmente a de agregação plaquetária,⁵⁴⁻⁵⁷ tornando possível a prevenção de tal agregação. São, portanto, efetivas na inibição da coagulação sanguínea, podendo ser um aliado de extrema importância no combate à trombose.

As desintegrinas são conhecidas por apresentar o tripeptídeo RGD (arginina – glicina – ácido aspártico) ao longo de sua sequência.^{55,57} Essa sequência de três aminoácidos apresenta extrema importância na função das desintegrinas, pois é responsável pela interação ao receptor das integrinas nas plaquetas.^{54,58} As desintegrinas agem de um modo competitivo, bloqueando a interação da integrina com uma proteína RGD.⁵⁹

Modificações na sequência RGD podem mudar a afinidade e a especificidade do peptídeo pelas integrinas, sendo possível que este até perca a sua atividade.⁵⁷ Entretanto, mudança da arginina (R) pela lisina (K), deixando a sequência como KGD, pode manter a atividade de desintegrina do peptídeo ou proteína.^{55,57,60}

A conformação e a estereoquímica são fatores essenciais para a atividade dos peptídeos RGD. A mudança da estereoquímica da arginina de L

para D não gera perda de atividade; entretanto, a mesma mudança para o ácido aspártico pode gerar a completa inatividade do peptídeo.^{55,61} O ácido aspártico também exerce um papel fundamental nos peptídeos RGD, enquanto que o mesmo não é observado para a arginina. Mudança do ácido aspártico (D) para outro aminoácido com estrutura semelhante, como o ácido glutâmico (E), gera a inatividade da biomolécula, enquanto que a mudança da arginina por outro aminoácido com estrutura semelhante, como a lisina (K), pode manter a atividade biológica da mesma em questão.⁵⁷

Nem todas as proteínas ou peptídeos que apresentam a sequência RGD ao longo de sua estrutura possuem a habilidade de se ligar às integrinas e, conseqüentemente, regular a agregação plaquetária. Peptídeos com a sequência RGD e ricos em cisteínas, formando pontes dissulfetos, ou seja, peptídeos cíclicos, apresentam maior seletividade pelas integrinas, mostrando assim uma maior atividade para inibir a coagulação plaquetária.^{55,62} Peptídeos cíclicos apresentam restrições conformacionais, aumentando assim a afinidade e a seletividade pelas integrinas.^{55,58,61}

Peptídeos com motivo de desintegrina tendem a formar um *hairpin* ao longo de sua estrutura (devido à formação de pontes dissulfeto), com a sequência RGD no *loop*. Quando o tripeptídeo RGD se encontra no *loop* da estrutura, ocorre uma maior exposição desses aminoácidos, que são os responsáveis pela interação com as integrinas, facilitando assim tal interação.^{54,57} Um exemplo de uma proteína com motivo de desintegrina é apresentado na Figura 11, onde é possível observar a sequência RGD no *loop* do *hairpin*.

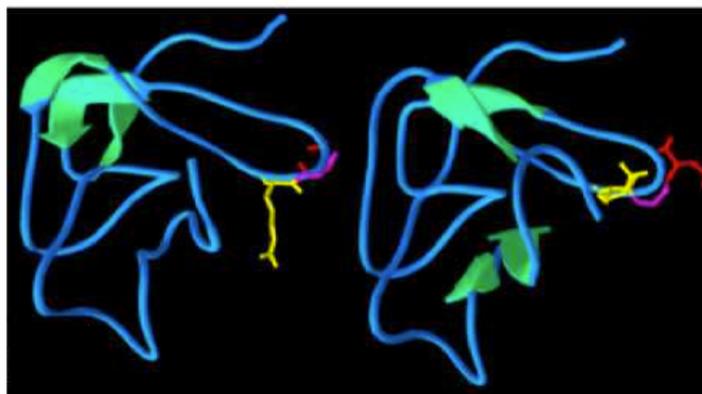


Figura 11: Proteína (Salmosina) que apresenta um motivo de desintegrina. É possível observar a formação de um *hairpin*, com a sequência RGD (cadeia lateral em destaque) localizada no centro do *loop*.⁵⁴

As interações com as integrinas para regular a adesão celular podem ser reproduzidas por pequenos peptídeos sintéticos que contenham a sequência RGD.^{55,62} O desenho de novos peptídeos sintéticos pode ser realizado com o objetivo de melhorar a atividade,⁵⁸ e também para o planejamento de novos fármacos contra diversas doenças como a trombose, osteoporose e câncer.⁵⁵

Peptídeos antitrombóticos apresentam uma importância especial quanto ao seu estudo, pois a trombose pode estar relacionada e/ou causar diversas doenças graves como a isquemia cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC).⁶³ Quando um vaso sanguíneo é rompido, agentes biológicos ativam as plaquetas, estimulando a agregação plaquetária, podendo com isso evitar hemorragias,⁶⁰ o que torna a agregação plaquetária um processo essencial para a manutenção do sistema biológico. Entretanto, essa agregação também pode ser o evento chave para a formação da trombose.

Doenças relacionadas à trombose são líderes de mortalidade no mundo⁶⁴ e a principal causa de mortes no mundo ocidental.⁶⁵ Por esses motivos, as pesquisas de novos medicamentos anticoagulantes ganharam grande importância⁶³ e peptídeos antitrombóticos representam uma alternativa promissora.

2.1.2 – Tripsina

São chamadas de proteinases, proteases ou peptidases as enzimas capazes de catalisar a quebra, por hidrólise, da ligação peptídica,^{2,3} e inibidores de proteases são as proteínas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica destas determinadas enzimas.^{66,67}

Os inibidores de proteases são, geralmente, específicos quanto ao mecanismo de ação, e podem ser classificados, como por exemplo, em serino-proteases os inibidores cujo mecanismo se constitui em um ataque nucleofílico das ligações peptídicas por um aminoácido serina.⁶⁷ As serino-proteases são as proteases mais comuns, mais estudadas e melhor caracterizadas.⁶⁷

Os inibidores de serino-proteases tendem a se ligar às enzimas por um *loop* rígido, comumente presente em suas estruturas.⁶⁸ Esse *loop* é estabilizado por ligações de hidrogênio e por pontes dissulfeto, e a

conservação da rigidez no *loop* pode se tornar essencial para manter a atividade da serino-protease.⁶⁸

A tripsina, juntamente com a quimotripsina, são os tipos de serino-proteases mais estudadas. A tripsina tem atuação específica para catalisar a quebra da ligação peptídica entre resíduos de aminoácidos com cargas positivas nas cadeias laterais, como a arginina e a lisina.^{2,3} Já a quimotripsina catalisa esta quebra entre resíduos de aminoácidos com cadeia laterais hidrofóbicas, tirosina, triptofano.^{2,3}

Os inibidores de proteinases são comumente encontrados em plantas, entretanto, podem também ser encontrados em animais e micro-organismos.⁶⁹ Os inibidores de proteinases podem desempenhar papel fundamental nos mecanismos de defesa no meio em se inserem, podendo agir contra insetos, fungos e outros micro-organismos.^{66,67,69}

Os inibidores de tripsina podem inibir a atividade de algumas enzimas digestivas.⁷⁰ Podem também diminuir os níveis de colesterol, amenizar efeitos de obesidade, ajudar no tratamento para diabetes e auxiliar em problemas digestivos.⁷¹ Podem ainda ajudar na inibição de enzimas envolvidas no processo de metástase de células cancerígenas⁶⁸ e também induzir a apoptose de células cancerígenas *in vitro*.⁷²

2.2 – Objetivos

- Sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo extraído do anfíbio *Hypsiboas punctatus*.
- Determinar a estrutura do peptídeo extraído do anfíbio *Hypsiboas punctatus* utilizando RMN e cálculos de mecânica molecular.
- Realizar ensaios biológicos de agregação plaquetária e inibição de tripsina.
- Desenhar novos peptídeos análogos ao peptídeo encontrado no anfíbio com possíveis atividades antitrombóticas e inibição de tripsina.
- Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos análogos.
- Determinar as estruturas dos peptídeos análogos utilizando RMN e cálculos de mecânica molecular.
- Realizar ensaios biológicos de agregação plaquetária e inibição de tripsina para os peptídeos análogos.
- Comparar as estruturas tridimensionais obtidas entre si e também com outras biomoléculas com atividade biológica.

2.3 – Metodologia

2.3.1 – Extração do Tecido Granular e Identificação do Peptídeo

Da pele do anfíbio *Hypsiboas punctatus* (Figura 12) foi realizado a extração do RNA com o objetivo de montar bibliotecas de cDNAs codificadores de peptídeos antimicrobianos.



Figura 12: Foto do anfíbio *Hypsiboas punctatus* (foto cedida pelo Dr. Carlos Bloch Jr – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Para montar tal biblioteca realizou-se a extração do RNA total, a síntese do cDNA, a amplificação dos cDNAs por PCR, a clonagem dos produtos de PCR, a transformação dos clones, a purificação dos plasmídios e por fim, a análise e o alinhamento das sequências nucleotídicas e peptídicas. Este procedimento foi realizado pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Carlos Bloch Jr (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e o procedimento detalhado encontra-se no Anexo 2.

Por este procedimento, foi possível identificar alguns peptídeos presentes na pele do anfíbio.

2.3.2 – Síntese do Peptídeo em Fase Sólida

Realizou-se a síntese em fase sólida do peptídeo, denominado peptídeo KGD, utilizando a estratégia Fmoc/*t*-butila.⁷³⁻⁷⁵

A síntese foi realizada dentro de uma seringa com auxílio de um filtro, ambos de polipropileno. Utilizou-se a resina Rink Amide (MDHA) como suporte. A escala de síntese escolhida foi para a produção de 0,1 mmol de peptídeo, e para isso, foram utilizados 192,3 mg de resina (grau de substituição de 0,52 mmol.g⁻¹).

Lavou-se a resina com 2-propanol e N,N-dimetilformamida (DMF) (três vezes cada, alternadamente), para a retirada de eventuais impurezas. Tanto o 2-propanol como o DMF foram retirados da seringa com o auxílio de filtração a vácuo. Foram adicionados de 2,5 a 3,0 mL de 4-metilpiperidina/DMF (1:4, v/v) e agitou-se por 15 minutos para a retirada do grupo protetor Fmoc da resina.⁷⁶ Esse procedimento foi realizado duas vezes para a desproteção total da resina. Em seguida, realizou-se novamente a lavagem com 2-propanol e DMF (três vezes cada, alternadamente). Por fim, lavou-se com diclorometano para secar os grãos da resina.

Para verificar se houve a desproteção da resina, realizou-se o teste da ninhidrina,^{77,78} utilizado para a detecção de grupo amino livre. Para isso, adicionou-se em um tubo de ensaio alguns grãos da amostra, uma gota de uma solução feita com 2 mL de KCN (1 mmol.L⁻¹) e 98 mL de piridina, duas gotas de uma solução de fenol a 80% (em massa) em etanol, e uma gota de solução de ninhidrina a 5% em etanol. A mistura foi aquecida a 110 °C por três minutos. A mudança de coloração dos grãos da amostra para marrom (ou azul) indica a presença do grupo –NH₂ livre e, conseqüentemente, a desproteção da resina.

Em continuidade, como a síntese é realizada no sentido do C-terminal para o N-terminal, adicionou-se o último derivado de aminoácido, a serina (Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH), na seringa de síntese para acoplá-lo à resina. Foi utilizado 0,4 mmol de derivado de aminoácido (o que equivale a um excesso molar de 4 vezes). Adicionou-se também 0,4 mmol de HBTU, 0,8 mmol de DIPEA e 1,5 mL de DMF. Deixou-se reagir por 1h30 sob agitação moderada e constante.

Após esse período, o produto foi filtrado a vácuo e novamente lavado com 2-propanol, DMF e diclorometano (mesmo procedimento de lavagem citado anteriormente). Realizou-se novamente o teste da ninhidrina para verificar se houve o acoplamento do derivado de aminoácido à resina. A ausência de mudança na coloração da amostra sugere o acoplamento, visto que houve a formação de uma ligação peptídica (ligação amídica), não havendo mais um grupo -NH_2 livre.^{77,78} Um esquema simplificado da síntese em fase sólida é mostrado na Figura 13.

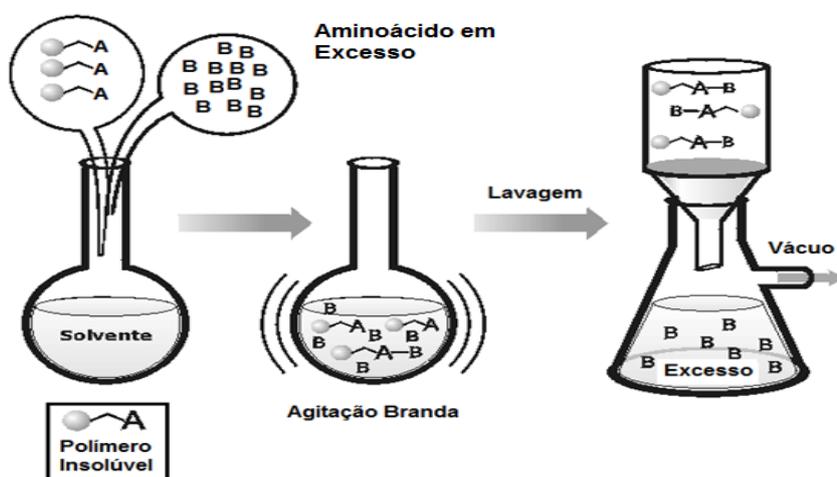


Figura 13: Esquema simplificado para a síntese em fase sólida.⁷⁹

Como o resíduo de aminoácido acoplado à resina possui o grupo Fmoc como protetor temporário, foi necessário realizar a desproteção. Para tal, utilizou-se uma solução de 4-metilpiperidina:DMF (1:4, v:v) (adição de 2,5 a 3,0 mL), sob agitação, por 15 min, procedimento realizado duas vezes para a remoção desse grupo, possibilitando dar continuidade ao acoplamento do próximo derivado de aminoácido. Para verificar se houve a desproteção do resíduo de aminoácido ligado à resina, havendo a formação do grupo amino livre, realizou-se novamente o teste da ninhidrina.

Com o primeiro resíduo de aminoácido desprotegido, realizou-se o acoplamento do segundo derivado aminoácido, a cisteína. O procedimento realizado para acoplar esse segundo derivado de aminoácido foi o mesmo utilizado para a ligação do primeiro derivado de aminoácido à resina. Uma tabela com os derivados de aminoácidos utilizados na síntese, mostrando o grupo protetor permanente (i.e., da cadeia lateral) e o temporário (Fmoc), a

massa utilizada de cada aminoácido e também a massa molecular estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Massa molecular dos aminoácidos utilizados com seus respectivos grupos protetores temporários (Fmoc) e permanentes (OtButil, Trt, Boc, Pbf e tButil) e massa, em miligramas, para 0,4 mmol.

Fmoc-aminoácidos	MM (g/mol)	Massa para 0,4 mmol (mg)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	259,5
Fmoc-Asp(OtButil)-OH	411,5	164,6
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,7	234,2
Fmoc-Gly-OH	297,3	118,9
Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	247,8
Fmoc-Ile-OH	353,4	141,3
Fmoc-Leu-OH	353,4	141,3
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	187,4
Fmoc-Ser(tButil)-OH	383,4	153,3
Fmoc-Thr(tButil)OH	397,5	159
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6	210,6
Fmoc-Tyr(tButil)-OH	459,6	183,8

Também para os acoplamentos dos derivados de aminoácidos seguintes foi realizado o mesmo procedimento: primeiramente desprotegendo o resíduo de aminoácido já acoplado e, em seguida, adicionando-se 0,4 mmol do Fmoc-aminoácido a ser acoplado, 0,4 mmol de HBTU (156 mg), uma quantidade menor do que 0,8 mmol de DIPEA (132 μ L) e 1,5 mL de DMF, sempre com 1h30 de reação. Esse procedimento foi empregado até o acoplamento do último derivado de aminoácido, a histidina.

Após realizar o acoplamento de todos os Fmoc-aminoácidos da sequência, iniciou-se o processo de clivagem da resina dos peptídeos sintéticos, processo que também visa remover os grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.⁷³⁻⁷⁵ Adicionou-se em um tubo tipo *falcon* de 50 mL o peptídeo sintetizado e 10 mL de uma solução contendo 81,5% de TFA, 5% de tioanisol, 5% de fenol, 5% de água, 2,5% de EDT e 1% de TIS (em volume). Tampou-se o tubo e a mistura foi deixada para reagir por

1h30min sob agitação. Após reação, borbulhou-se nitrogênio gasoso na solução para evaporar o TFA e os demais solventes.

Com o auxílio de uma filtração a vácuo, lavou-se o peptídeo clivado com éter diisopropílico gelado. Em seguida, o peptídeo foi extraído com 50 mL de água e depois com 50 mL de uma solução água:acetonitrila 1:1. As soluções contendo o peptídeo sintético foram recolhidas em tubos de 50 mL, congeladas e, por fim, liofilizadas. Um esquema para as principais etapas da síntese é mostrado na Figura 14.

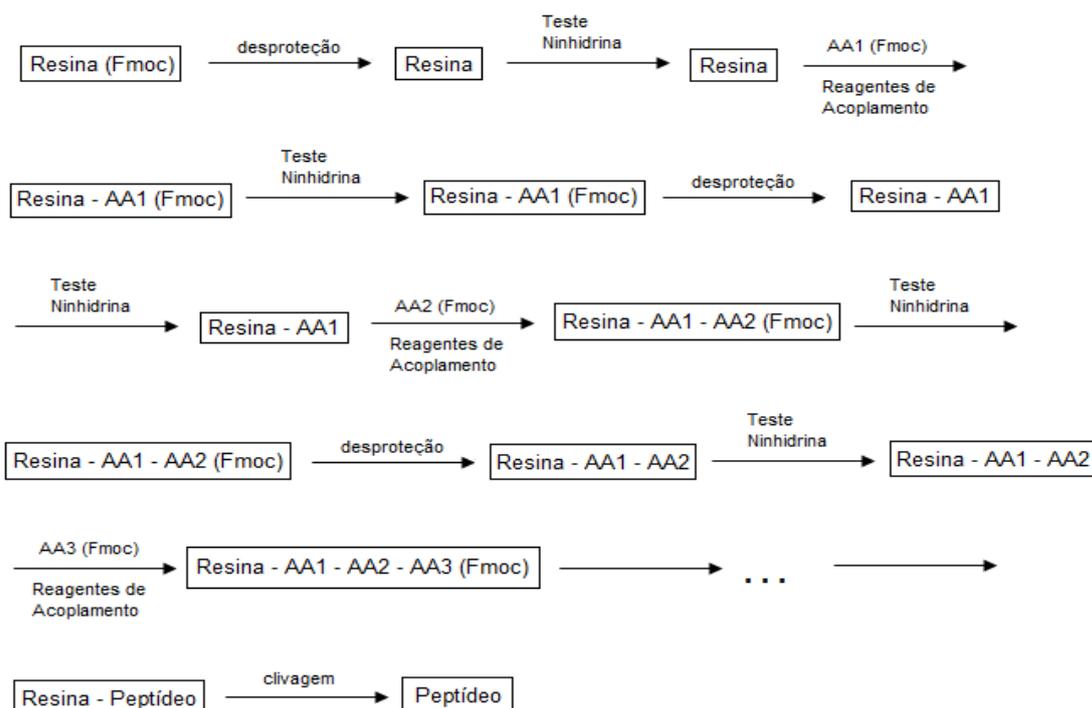


Figura 14: Esquema para as principais etapas da síntese em fase sólida, em que AA1, AA2 ... representam os aminoácidos 1, 2, ... respectivamente.

2.3.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético

O peptídeo sintetizado foi caracterizado por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker). Espectros de MS e MS/MS foram obtidos.

O equipamento foi calibrado com um calibrante externo próprio para peptídeos (Peptide Calibration Standard – Starter Kit, Tubo 4, Bruker). As análises foram feitas depositando-se em uma placa própria para o equipamento uma mistura do peptídeo com uma solução saturada da matriz (5 mg de matriz,

200 µL de H₂O, 500 µL de ACN e 50 µL de TFA 3%) constituída pelo ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico. A proporção utilizada de peptídeo para matriz foi de 1:3.⁸⁰

Os espectros de massa foram adquiridos no método refletido/positivo para tentar observar a massa esperada do peptídeo. Adquiriram-se também espectros de MS/MS pela fragmentação dos íons precursores utilizando argônio como gás de colisão para caracterizar a sequência de aminoácidos do peptídeo sintetizado.⁸¹

2.3.4 – Purificação do Peptídeo Sintético

Devido à presença de compostos não desejáveis no produto da síntese observados pelo espectro de massa, e com o objetivo de obter o peptídeo sintético puro, realizou-se a purificação da amostra por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Shimadzu) com um espectrofotômetro como detector. As análises foram feitas com monitoramento em 216 e 280 nm.⁸²

Utilizou-se primeiramente uma coluna semi-preparativa C18 (Vydac 218TP510) com um fluxo de 2,5 mL/min e um gradiente de eluição com água Milli-Q e acetonitrila como solventes, ambos com 0,1 % de TFA.^{83,84} O gradiente de eluição está descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Gradiente de eluição para a purificação por HPLC.

Tempo (min)	Porcentagem de Acetonitrila (%)
0	5
5	5
25	35
45	60
50	95
60	95

As frações observadas no cromatograma foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker) para descobrir a fração de interesse, referente ao peptídeo sintético. Em cada análise por HPLC a fração de interesse era coletada, congelada e liofilizada.

Por apresentar dois aminoácidos, do tipo cisteína, ao longo da sequência de aminoácidos, o peptídeo pode ser encontrado na forma estendida (forma reduzida, não apresentando ponte dissulfeto entre as cisteínas) ou cíclica (forma oxidada, apresentando ponte dissulfeto entre as cisteínas). A fração mais abundante do cromatograma era referente ao peptídeo na forma reduzida e o interesse do trabalho era estudar o peptídeo na forma oxidada. Com isso, a fração referente ao peptídeo reduzido, depois de coletada e seca, foi ressuspensa em água Milli-Q e deixada em solução em contato com o ar por 48h para oxidar o peptídeo.

Após esse tempo, a solução foi novamente fracionada por HPLC utilizando uma coluna analítica C18 (Vydac 218TP54) e um fluxo de 1,0 mL/min. Utilizou-se novamente água Milli-Q e acetonitrila com 0,1% de TFA como solventes do gradiente de eluição. O gradiente de eluição foi o mesmo utilizado na etapa anterior e já descrito na Tabela 4. As frações obtidas nessa etapa final foram recolhidas, congeladas, liofilizadas e caracterizadas por espectrometria de massa, tornando possível descobrir qual seria a fração de interesse, referente ao peptídeo na forma oxidada. Os estudos realizados por RMN e testes biológicos foram realizados apenas com o peptídeo na forma oxidada.

2.3.5 – Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) com uma sonda de tripla ressonância de detecção inversa a temperatura ambiente (Bruker TXI 1H/15N/13C) com gradiente de campo e 5 mm de diâmetro, a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (60%/40%) como solvente, e se trabalhou com a amostra a uma concentração de 1 mmol/L em um volume de 0,6 mL.

Foram adquiridos os espectros TOCSY, HSQC (^1H - ^{13}C), NOESY e DQF-COSY. Utilizou-se o sinal da H_2O a 298 K em 4,773 ppm para referenciar o espectros. Os parâmetros de aquisição destes experimentos podem ser observados na Tabela 5. O experimento HSQC foi dividido em região aromática e região alifática. No HSQC alifático utilizou-se uma janela espectral de 80 ppm, com o centro da janela em 39 ppm; no HSQC aromático utilizou-se uma janela espectral de 40 ppm, com o centro da janela em 124 ppm. O experimento HSQC adquirido foi HSQC editado, em que $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_3$ são sinais positivos e $-\text{CH}_2$ é negativo. O experimento TOCSY foi adquirido utilizando a sequência MLEV para spin-lock⁸⁵ e a técnica *excitation sculpting* para eliminação do sinal da água.⁸⁶ Todos os experimentos foram adquiridos no modo sensível à fase.

Tabela 5: Parâmetros de aquisição para os experimentos de RMN 2D. TD = *time domain*; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = *dummy scans*.

Experimentos	Parâmetros	F1	F2
TOCSY	TD	4096	512
	NS	96	
	DS	512	
HSQC alifático	TD	1024	200
	NS	216	
	DS	256	
HSQC aromático	TD	1024	200
	NS	128	
	DS	256	
NOESY	TD	4096	512
	NS	128	
	DS	256	
COSY	TD	4096	512
	NS	64	
	DS	256	

Foram utilizados os valores de 60 ms e 130 ms para os experimentos de TOCSY e NOESY, respectivamente.

Os FIDs obtidos foram processados utilizando os programas NMRPipe e NMRDraw.⁸⁷ Utilizou-se o programa NMRView 5.0⁸⁸ para assinalamento dos espectros. Para o processamento, aplicou-se a função “cosine-bells” em cada dimensão e também uma função polinomial para correção da linha base. Os ajustes de fase foram realizados manualmente utilizando o programa NMRDraw.

2.3.6 – Cálculos de Estrutura e Análise por RMN

Os cálculos estruturais utilizando parâmetros obtidos por experimentos de RMN foram realizados utilizando o programa CNS_Solve^{89,90} (método de simulated annealing). Os volumes dos NOEs assinalados pelo espectro de NOESY foram integrados e convertidos em restrições de distância: 2,8, 3,5 e 5,0 Å para intensidades fortes, médias e fracas, respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos átomos H_α, H_β, C_α, C_β e H_N foram utilizados para calcular os ângulos de diedros pelo programa TALOS.⁹¹

As estruturas calculadas foram visualizadas pelo programa MOLMOL⁹² e as 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) foram sobrepostas. O valor do RMSD para estas 20 estruturas sobrepostas também foi calculado pelo programa MOLMOL.

Para observar possíveis ligações de hidrogênio do H_N, foram realizados experimentos de TOCSY com baixo número de scans e incrementos a diferentes temperaturas (278, 298 e 308 K).⁹³ Tais experimentos também foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio). Utilizou-se H₂O/D₂O (60%/40%) como solvente, a uma concentração de 1 mmol/L em um volume de 0,6 mL. Foi utilizado o valor de 60 ms como mixing time e os espectros foram referenciados pelo sinal da H₂O: 4,964 ppm a 278 K, 4,773 ppm a 298 K e 4,676 a 308 K. Os dados de aquisição podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6: Dados de aquisição para os experimentos de TOCSY para determinação de ligações de hidrogênio. TD = *time domain*; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = *dummy scans*.

Dados	F1	F2
TD	4096	60
NI	60	
NS	8	
DS	32	

Os FIDs obtidos foram processados como descrito anteriormente.

Foram realizados os cálculos de CSI (Chemical Shift Index) em que o valor do deslocamento químico dos átomos de C_{α} e C_{β} foi subtraído do valor do deslocamento químico dos mesmos átomos dos mesmos resíduos de aminoácido quando em uma estrutura randômica.^{44,45} Segundo essa metodologia, quando o valor da subtração for negativo, atribui-se valor “-1” para o CSI, o valor “+1” quando o valor da subtração for positivo, e “0” quando o resultado da subtração também for zero.^{44,45}

2.3.7 – Teste Biológico: Agregação Plaquetária

Foram realizados ensaios de agregação plaquetária⁹⁴ para o peptídeo. Este procedimento foi realizado pelo Dr. Guilherme Dotto Brand (Bioquímico Analítico da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação).

O teste foi realizado utilizando um Agregômetro (Crono-log) e ADP para estimular a agregação plaquetária como metodologia.⁹⁴ O teste foi realizado com sangue humano, em que, inicialmente, realizou-se um teste de hemograma para obter a quantidade de plaquetas por volume de sangue. O teste de agregação foi realizado com menos de 3 horas depois da extração do sangue. Para o controle positivo, utilizou-se um peptídeo descrito na literatura⁹⁴ com a seguinte sequência de aminoácidos: **CARGDDC-NH₂**. Esse peptídeo controle também foi sintetizado, caracterizado e purificado com os mesmos procedimentos descritos nas seções 2.3.2, 2.3.3 e 2.3.4, respectivamente.

2.3.8 – Síntese, Caracterização e Purificação de Peptídeos Análogos

Realizou-se a síntese de dois novos peptídeos, análogos ao peptídeo KGD. As sequências de aminoácidos para esses novos peptídeos, denominados peptídeos RGD e HGD podem ser vistas na Tabela 7. Os peptídeos análogos também foram sintetizados utilizando a estratégia Fmoc/t-butila e o procedimento utilizado para esta síntese foi a mesma empregada na seção 2.3.2.

Tabela 7: Sequências de aminoácidos para os peptídeos RGD e HGD.

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
RGD	HTGCWYTS RGD LICS-NH ₂
KGD	HTGCWYTS HGD LICS-NH ₂

Os peptídeos RGD e HGD sintéticos também foram caracterizados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker) por espectros de MS e MS/MS. O procedimento para caracterizar estes novos peptídeos foi o mesmo empregado na caracterização do peptídeo KGD (seção 2.3.3.).

Os peptídeos análogos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) utilizando H₂O e acetonitrila, ambas com 0,1 % de TFA, como solventes em um gradiente de eluição. O método e os procedimentos utilizados para purificar esses peptídeos foram os mesmos descritos anteriormente (seção 2.3.4.).

2.3.9 – Experimentos de RMN dos Peptídeos Análogos

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (60%/40%) como solvente, e se trabalhou com as amostras a uma concentração de 1 mmol/L em um volume de 0,6 mL.

Adquiriu-se os espectros de TOCSY, HSQC (¹H-¹³C), NOESY e COSY. Os parâmetros de aquisição e processamento foram os mesmos utilizados para o peptídeo KGD, descrito na seção 2.3.5. Os programas utilizados para

processar os espectros, proceder aos ajustes de fase e assinalamentos também foram os mesmos descritos para o peptídeo KGD (seção 2.3.5).

2.3.10 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN dos Peptídeos Análogos

O procedimento para a realização dos cálculos estruturais foi o mesmo utilizado para os cálculos do peptídeo KGD, descrito na seção 2.3.6.

Para estes novos peptídeos também foram adquiridos espectros de TOCSY a diferentes temperaturas (278, 298, 308 K) com menor número de scans e incrementos para observar possíveis ligações de hidrogênio envolvendo o H_N. Os parâmetros de aquisição, processamento e os programas utilizados foram os mesmo descritos na seção 2.3.6. Também foram realizados os cálculos de CSI para os dois novos peptídeos.

Para observar possíveis variações nos deslocamentos químicos entre os peptídeos análogos e o peptídeo KGD – o que poderia evidenciar variações estruturais para os peptídeos RGD e HGD quando comparados os peptídeo KGD – foram realizados cálculos da diferença de deslocamento químico dos H_α e H_β entre os peptídeos KGD/RGD e KGD/HGD.

2.3.11 – Teste Biológico dos Peptídeos Análogos: Agregação Plaquetária

Este procedimento foi também realizado pelo Dr. Guilherme Dotto Brand (Bioquímico Analítico da Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação) seguindo a mesma metodologia e procedimento descritos na seção 2.3.8.⁹⁴

2.3.12 – Teste Biológico: Inibição de Tripsina

Devido à similaridade dos peptídeos KGD, RGD e HGD com peptídeos inibidores de tripsina, foram realizados ensaios de inibição da tripsina. Este procedimento foi realizado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Bloch Jr (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

Neste teste empregou-se a metodologia de degradação do BApNA como substrato:^{66,72} Utilizou-se soluções de tripsina (Sigma-Aldrich T8003, Tipo I) 0,2 mg/mL, BapNA 1,25 mM em DMSO e 200 µg de peptídeo. A reação de

degradação foi monitorada em um espectrofotômetro (410 nm), permitindo medir a atividade da tripsina.⁶⁶⁻⁷² Utilizou-se SBTI (Sigma – Aldrich) para o controle positivo.

2.4 – Resultados e Discussão

2.4.1 - Extração da Secreção Cutânea e Identificação do Peptídeo

Pela biblioteca de cDNA foi possível identificar uma sequência de nucleotídeos, que após traduzida, originou a seguinte sequência de aminoácidos: HTGCWYTSKGD LICS. A sequência do cDNA e a sequência de aminoácidos identificados podem ser vistos na Figura 15.

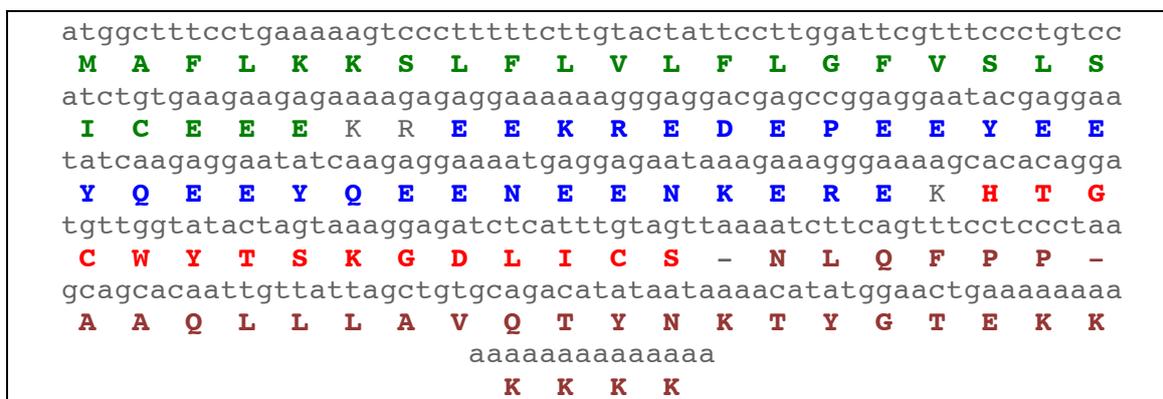


Figura 15: Sequência identificada do cDNA e a sequência de aminoácidos traduzida. Em verde a sequência de aminoácido referente à região do peptídeo sinal; em azul, a região acídica; em vermelho, a região do peptídeo maduro (peptídeo de interesse) e em vinho a região não traduzida.

O peptídeo identificado (HTGCWYTSKGD LICS), doravante denominado peptídeo KGD, poderia apresentar uma possível atividade antitrombótica devido à similaridade deste peptídeo com outros peptídeos com motivo de desintegrina (Tabela 8), como a presença de cisteínas (peptídeos cíclicos), formação de um possível *loop* e a presença da sequência KGD no *loop*, sequência semelhante à RGD comumente observada nos peptídeos com motivo de desintegrinas.⁹⁵ Além disso, é possível encontrar na literatura peptídeos com a sequência KGD que também possuem atividade antitrombótica.^{96,97} Uma tabela com a comparação da sequência de aminoácidos do peptídeo KGD identificado do anfíbio *Hypsiboas punctatus* com outros peptídeos também com a sequência KGD com atividade é mostrada na Tabela 8.

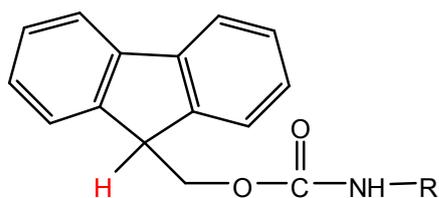
Tabela 8: Comparação entre a sequência de aminoácidos do peptídeo KGD com outros peptídeos também com a sequência KGD com atividade antitrombótica.⁹⁷

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
Peptídeo KGD	HTGCWYTSKGD <u>L</u> ICS-NH ₂
Peptídeo 1	G <u>C</u> GKGDWPC <u>A</u> -NH ₂
Peptídeo 2	G <u>C</u> KGDWPC <u>A</u> -NH ₂
Peptídeo 3	G <u>C</u> GKGDW <u>C</u> A-NH ₂
Peptídeo 4	<u>C</u> GKGDWPC <u>C</u> -NH ₂
Peptídeo 5	<u>C</u> KGDWPC <u>C</u> -NH ₂

2.4.2 - Síntese do Peptídeo em Fase Sólida

Um das principais vantagens de se utilizar a síntese em fase sólida é que, ao final de cada etapa, é realizada uma lavagem e uma filtração. Com isso, o excesso dos reagentes, os solventes e qualquer outro composto que não esteja ligado à resina são eliminados. Esse procedimento pode evitar que reações indesejadas (reações paralelas ou reações de degradação) ocorram, o que possibilita maior rendimento e facilidade na etapa de purificação do produto final obtido.⁷⁹

A síntese foi realizada em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc/*t*-butila,⁷³⁻⁷⁵ em que o Fmoc (estrutura mostrada na Figura 16) é um grupo protetor temporário do grupamento amino, removido a cada etapa da síntese, sendo um grupo base-lábil.⁹⁸ A labilidade é devida ao fato de que a retirada do hidrogênio ácido do Fmoc (destacado em vermelho na Figura 16) gera uma base conjugada estabilizada por ressonância.⁹⁹ Os grupos *t*-butila, *O-t*-butila, Tritil (Trt), 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonila (Pbf) e *terc*-butiloxicarbonila, Boc (estruturas representadas na Figura 17) são os grupos protetores permanentes das cadeias laterais dos aminoácidos, que permanecem ao longo de todas as etapas da síntese, sendo retirados apenas na última etapa, a da clivagem.

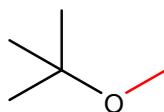


Fmoc

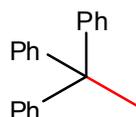
Figura 16: Estrutura do grupo protetor temporário Fmoc.



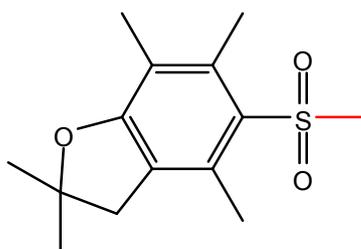
t-butil



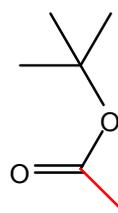
O-*t*-butil



Tritil (Trt)



Pbf



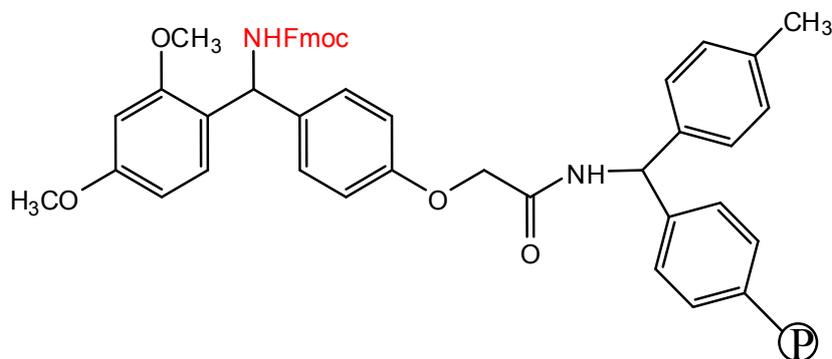
Boc

Figura 17: Estruturas dos grupos *t*-butil, O-*t*-butil, Trt, Pbf e Boc, protetores permanentes das cadeias laterais dos aminoácidos.

Tantos os protetores permanentes como os protetores temporários irão garantir a reação dos derivados de aminoácidos apenas no local de interesse. Eles ajudam a evitar reações secundárias, tal como a incorporação de um dipeptídeo em vez de um aminoácido. Além disso, essa medida ajuda no processo final de purificação do produto obtido.

Realizou-se a síntese utilizando a resina *Rink Amide* (MDHA), cuja estrutura do grupo ligante é mostrada na Figura 18. Esta resina apresenta uma cadeia polimérica insolúvel nas condições da síntese, um copolímero de poliestireno com divinilbenzeno, que serve de suporte para que a síntese seja realizada em fase sólida.¹⁰⁰ Escolheu-se uma resina com o grupo $-NH_2$, pois os peptídeos sintetizados eram amidados no C-terminal. Com isso, o acoplamento

do primeiro aminoácido irá ocorrer no grupo amino da resina, formando-se uma ligação amídica.



Rink Amide MDHA Resin

Figura 18: Estrutura da resina utilizada ao longo da síntese. Em vermelho o grupo amino protegido pelo Fmoc e **P** é a cadeia polimérica da resina.

Para a remoção do grupo protetor temporário (Fmoc) é utilizada a piperidina ou um análogo estrutural desta, a 4-metilpiperidina. Esse processo de desproteção é realizado a cada nova etapa da síntese, para que haja a formação do grupo -NH_2 livre onde irá ocorrer o acoplamento para a formação da ligação peptídica. O mecanismo proposto para a reação de remoção do grupo Fmoc pela piperidina é mostrado na Figura 19.

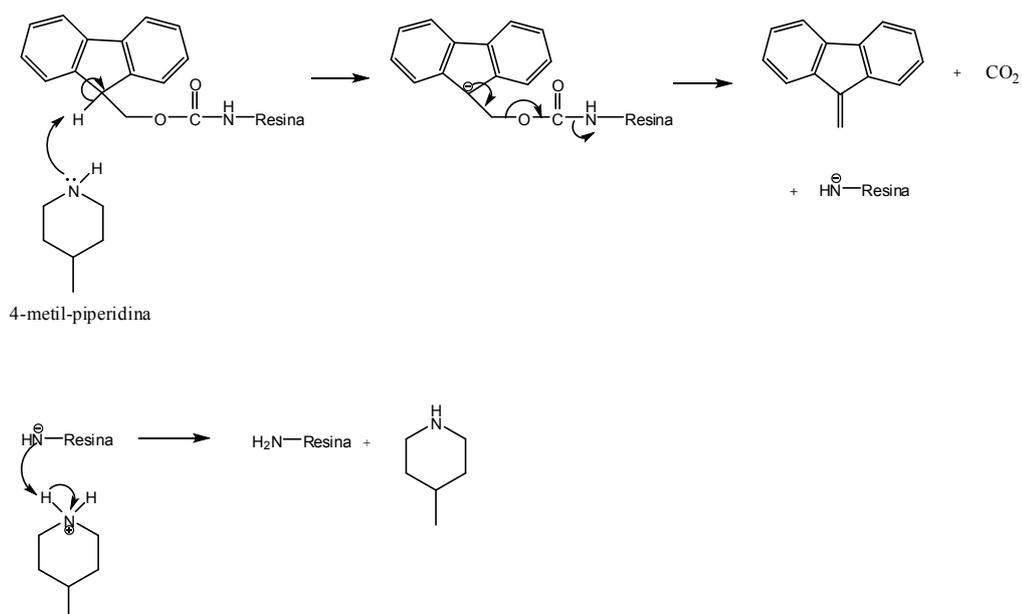


Figura 19: Remoção do grupo Fmoc pela piperidina para a formação do grupo -NH_2 livre.⁷³

Para verificar a desproteção e o acoplamento de cada resíduo de aminoácido ao longo de todas as etapas da síntese, realizou-se o teste da ninhidrina. Esse teste consiste na reação de uma amina primária ou secundária com a ninhidrina, gerando um composto de cor azul escuro ou marrom, conhecido como azul de *Ruhemann*.

A utilização de solventes orgânicos no teste de Kaiser, como alcoóis, piridina e fenol, ajudam a acelerar o aparecimento da cor.⁷⁸ O aquecimento da mistura próximo a 100 °C por 3 a 5 minutos fornece um rendimento quantitativo para o aparecimento da cor quando reagido com a resina ou aminoácidos.⁷⁸ O mecanismo para a reação entre um α -aminoácido e a ninhidrina para a formação do azul de *Ruhemann* é mostrado na Figuras 20.

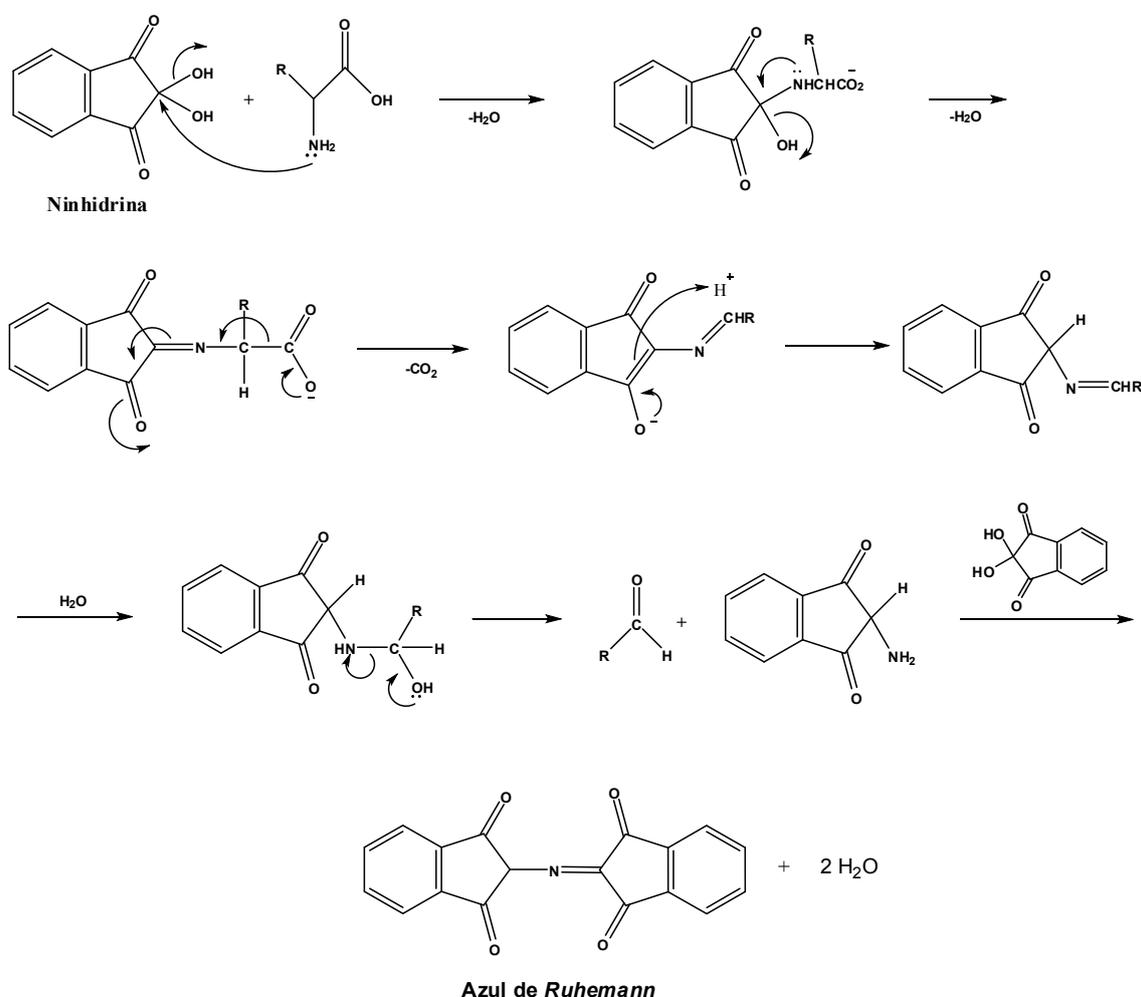


Figura 20: Reação/mecanismo da ninhidrina com um α -aminoácido para a formação do azul de *Ruhemann*.^{101,102}

Para realizar os acoplamentos dos aminoácidos, são adicionados ao meio reacional HBTU, DIPEA, DMF (cujas estruturas são mostradas na Figura 21), além do próprio derivado de aminoácido a ser acoplado. O DIPEA é adicionado para desprotonar o grupo ácido do aminoácido a ser acoplado, o DMF é utilizado para solubilizar os reagentes e o HBTU para ativar o aminoácido.¹⁰³

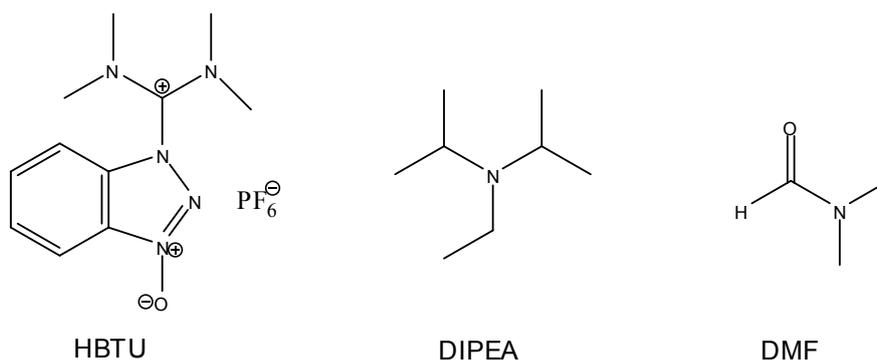


Figura 21: Estruturas do HBTU, DIPEA e DMF.

É necessário colocar um grupo ativador (HBTU) no aminoácido a ser acoplado para diminuir a diferença de energia livre entre os reagentes e o complexo ativado (formação de um éster ativo).¹⁰⁴ Os reagentes ganharão energia livre e ficarão com uma energia mais próxima ao complexo ativado, havendo assim um favorecimento cinético da reação de formação da ligação amídica. O grupo ativador adicionado é também um bom grupo de saída, o que também favorece a reação.¹⁰³ O mecanismo para a reação de ativação do aminoácido com HBTU é mostrado na Figura 22.

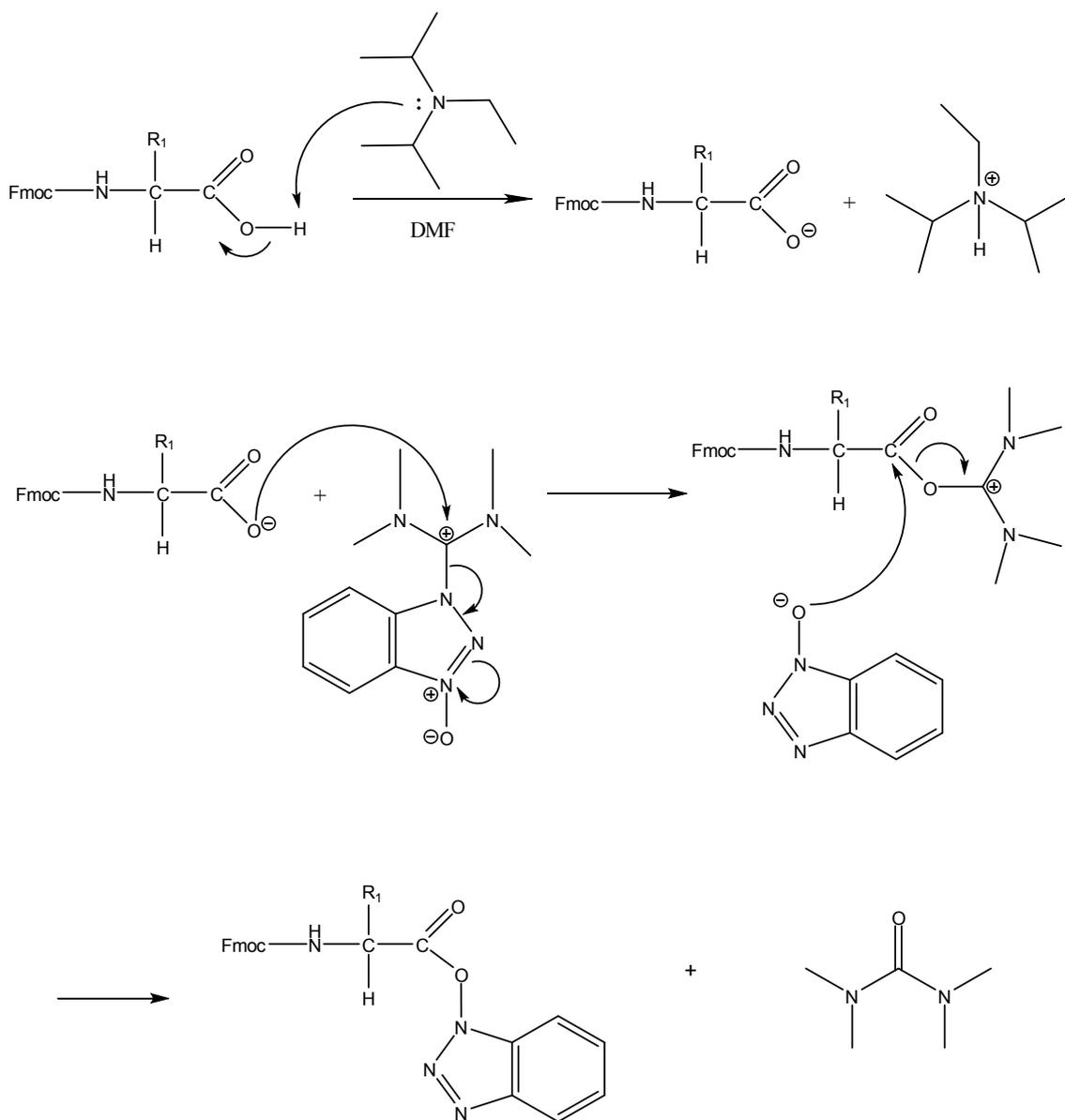


Figura 22: Reação de ativação do aminoácido com HBTU, em que R_1 é a cadeia lateral do aminoácido.^{104,105}

Com o derivado de aminoácido ativado, é possível proceder ao acoplamento deste à resina ou a outro derivado de aminoácido. O mecanismo para a reação de acoplamento do Fmoc-aminoácido ativado à resina é mostrado na Figura 23. Um esquema para o acoplamento de um Fmoc-aminoácido a outro resíduo de aminoácido já ligado à resina é representado na Figura 24.

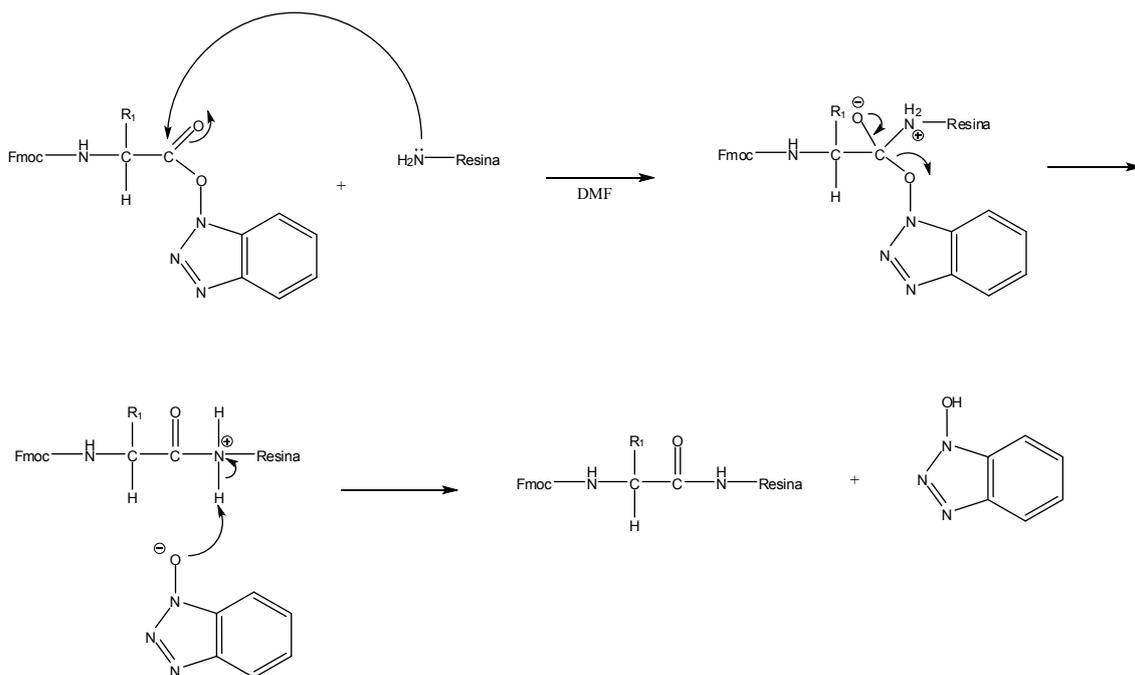


Figura 23: Reação de acoplamento do aminoácido ativado à resina. R_1 é a cadeia lateral de um aminoácido.¹⁰³

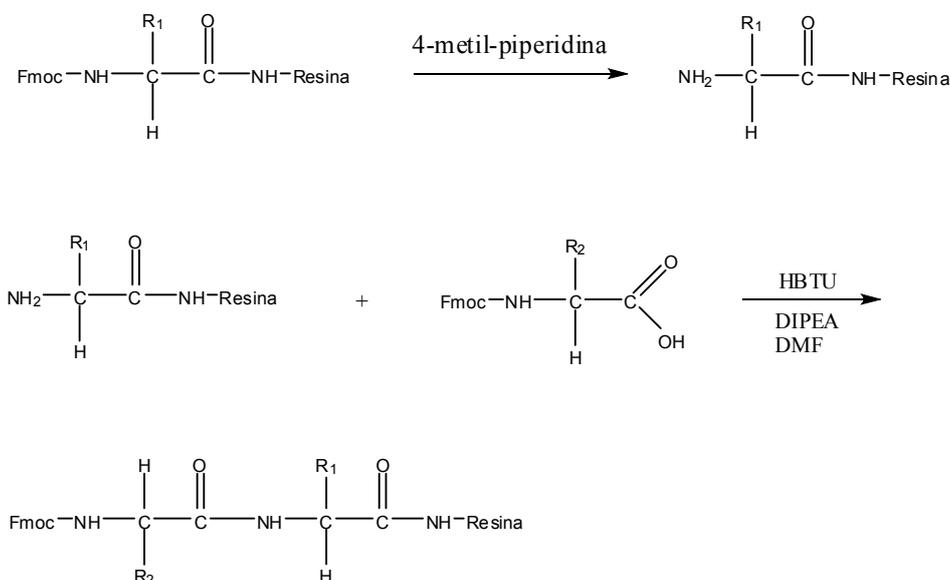


Figura 24: Esquema geral para o acoplamento dos aminoácidos, em que R_1 e R_2 são cadeias laterais de aminoácidos.

Após efetivar todos os acoplamentos para obter o peptídeo sintético, é preciso realizar a clivagem para a remoção da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais (protetores permanentes) e com isso obter os peptídeos desejados, livres de qualquer proteção ou modificação.

O processo de clivagem pelo TFA leva à formação de carbocátions, intermediários extremamente reativos. Estes carbocátions podem reagir com as cadeias laterais da tirosina, triptofano, metionina e cisteína (que são ricas em elétrons) gerando produtos indesejáveis. Para evitar que esse fato ocorra, espécies mais nucleofílicas são adicionadas, como o tioanisol e o 1,2-etanoditiol (EDT), cujas estruturas são mostradas na Figura 25.⁷³ O mecanismo para a reação de retirada da resina é mostrado na Figura 26.

Derivados de aminoácidos como serina, cisteína e treonina que não possuem apenas grupos alquila em suas cadeias laterais, devem conter protetores permanentes nos grupos funcionais das cadeias laterais para evitar reações indesejadas ao longo da síntese. Esses grupos protetores também devem ser removidos nesse processo de clivagem.

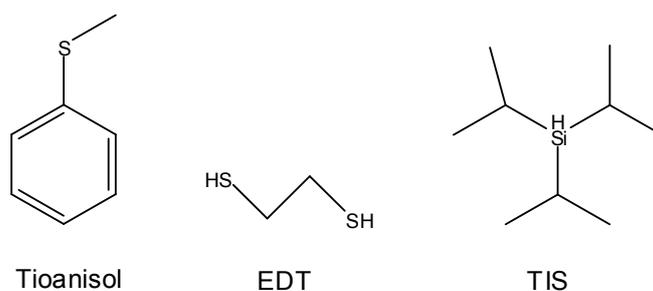


Figura 25: Estruturas do Tioanisol, EDT e TIS.

A clivagem dos grupos *t*-butila e Boc levam à formação de cátions *t*-butila via reação S_N1, como mostrado nas Figuras 27 e 28. Esses cátions formados podem reagir com o triptofano, levando à sua alquilação.⁷⁵ Para evitar essa reação, o EDT é adicionado ao processo de clivagem para sequestrar os cátions *t*-butila. Para evitar completamente a alquilação do triptofano, um segundo sequestrador é adicionado, o tioanisol.⁷⁵

A clivagem do grupo tritil (Trt) da cisteína é reversível sem a presença de sequestradores de carbocátions. Para evitar esse fato, fenol e TIS (estrutura mostrada na Figura 25) são adicionados ao processo de clivagem.⁷⁵

Os mecanismos para a retirada da resina e dos grupos protetores *t*-butil, Boc, *O*-*t*-butil, Trt, Pbf e são mostrados nas Figuras 27, 28, 29, 30, 31, respectivamente.

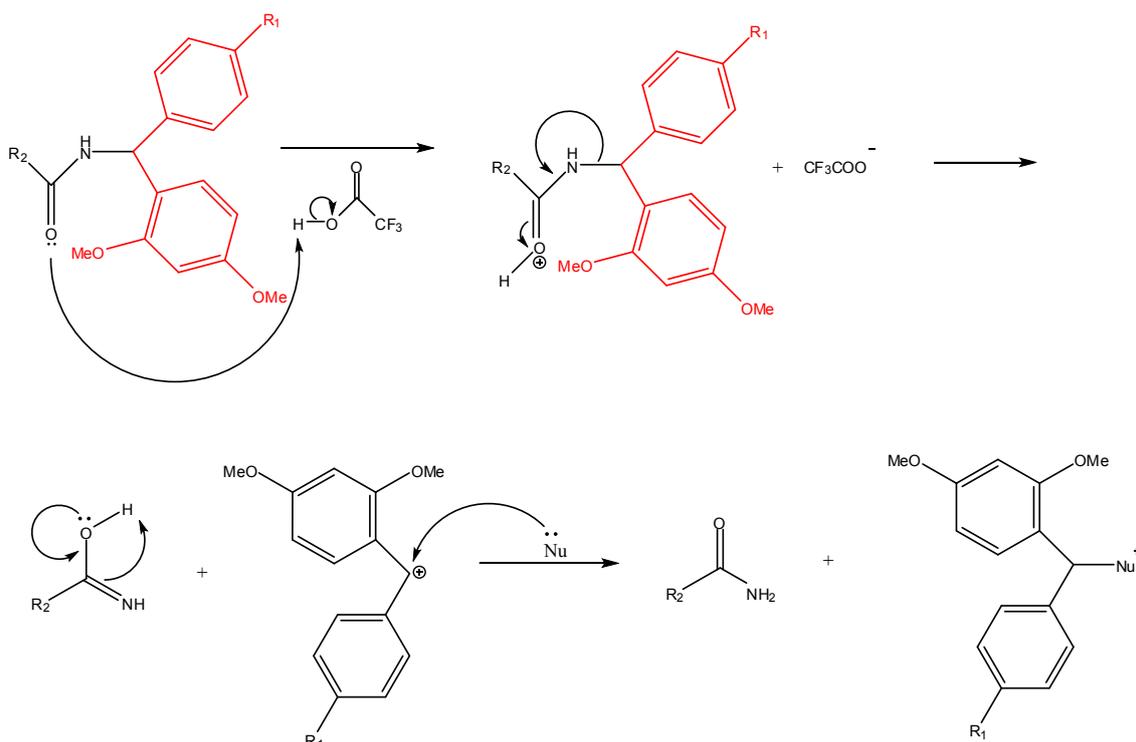


Figura 26: Remoção da resina da cadeia peptídica, em que R_1 é a cadeia da resina, R_2 é a cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho a estrutura a ser retirada pela clivagem para a formação do peptídeo amidado.¹⁰⁵

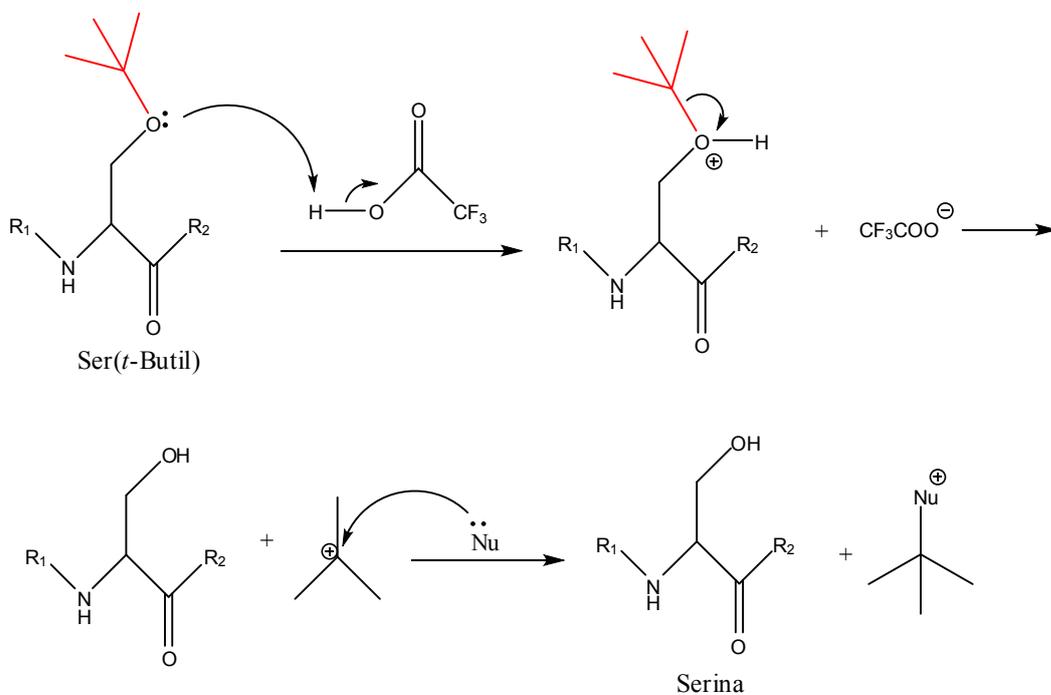


Figura 27: Retirada do grupo *t*-butil da serina, em que R_1 e R_2 são continuação da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.^{105,106}

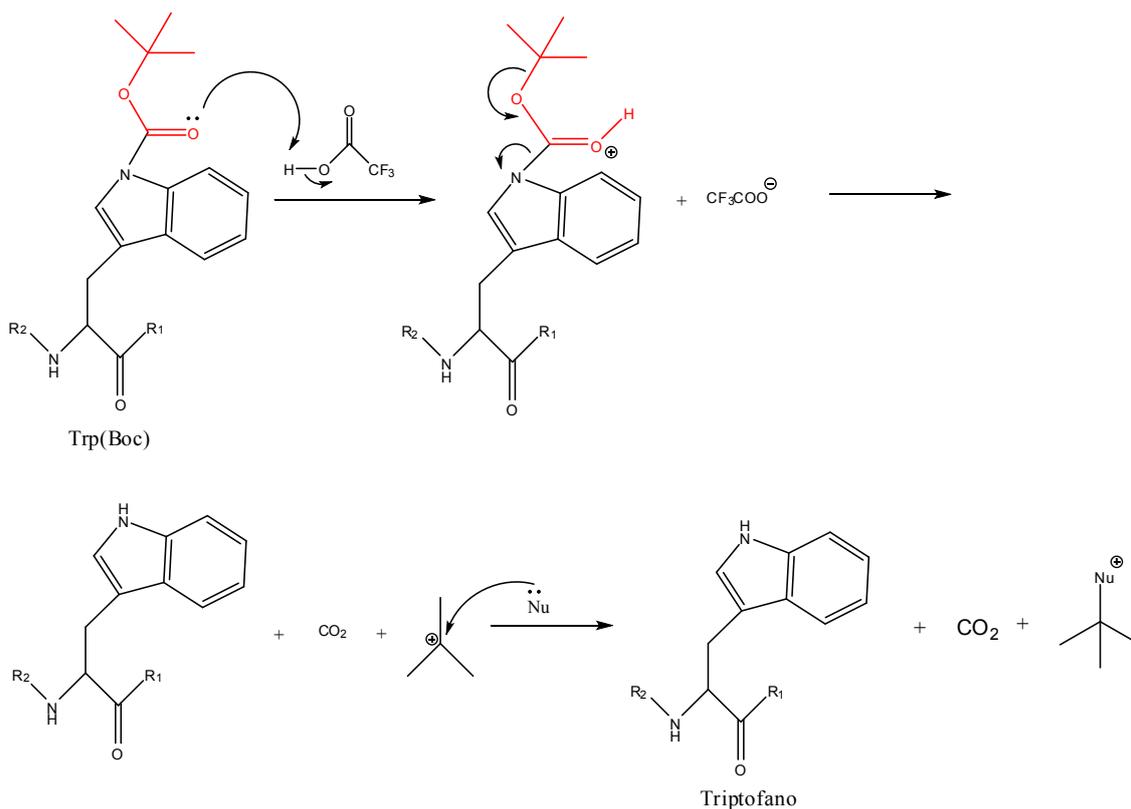


Figura 28: Retirada do grupo Boc do triptofano, em que R_1 e R_2 são continuação da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.¹⁰⁶

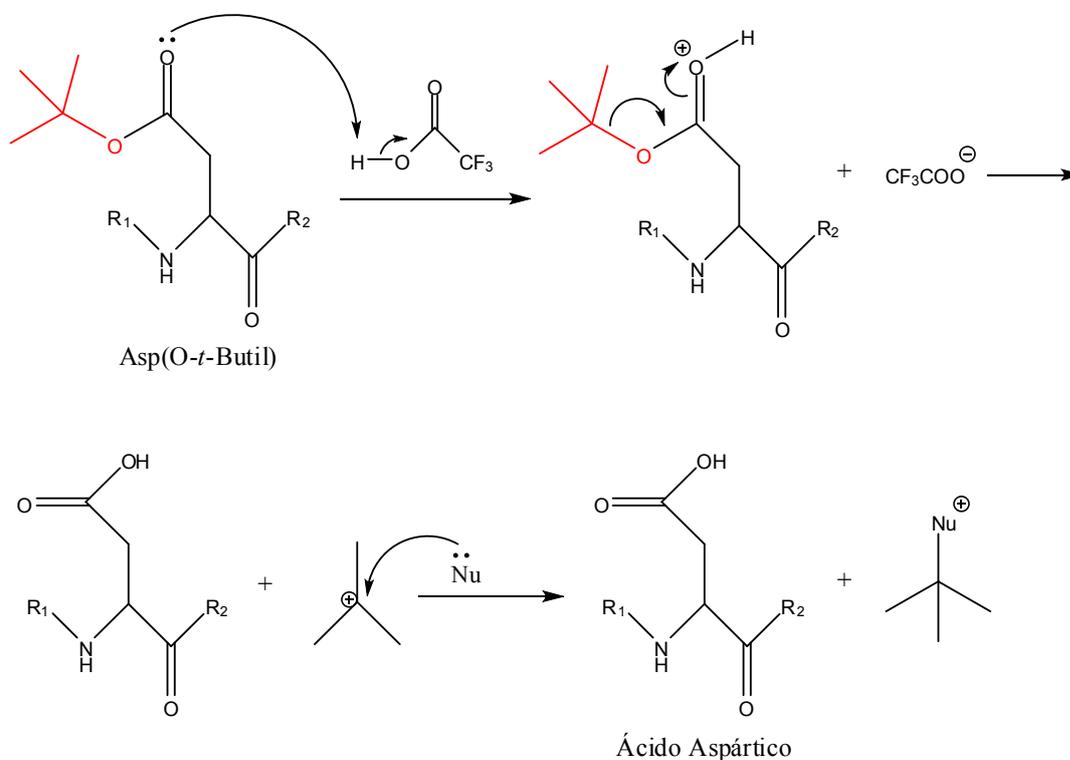


Figura 29: Retirada do grupo O-*t*-butil do ácido aspártico, em que R_1 e R_2 são continuação da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.^{105,106}

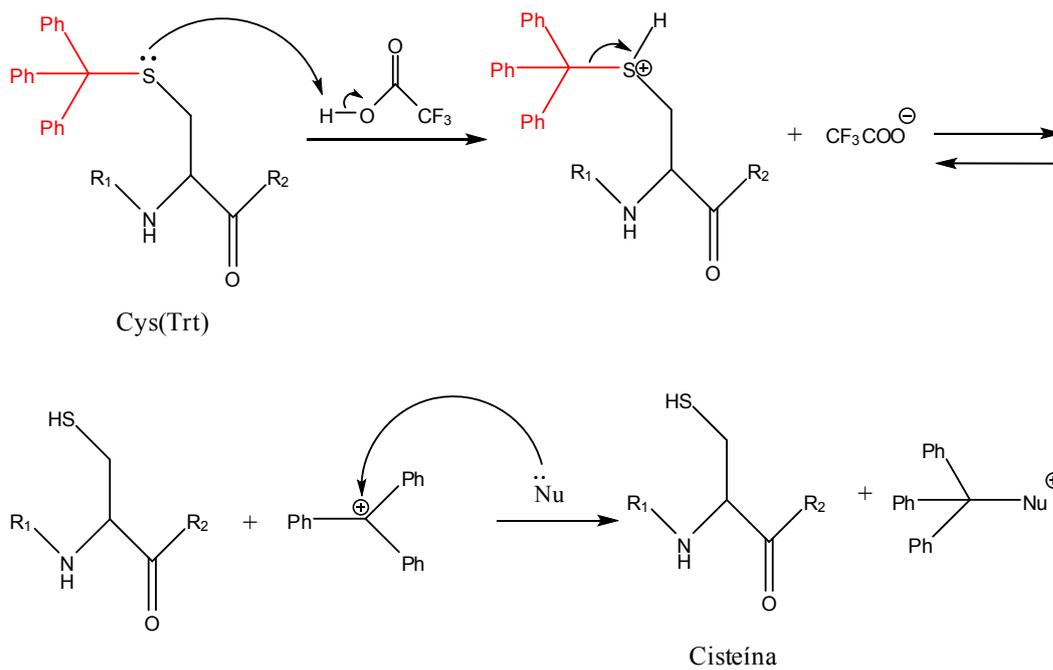


Figura 30: Retirada do grupo tritil (Trt) da cisteína, em que R_1 e R_2 são continuação da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.⁷⁴

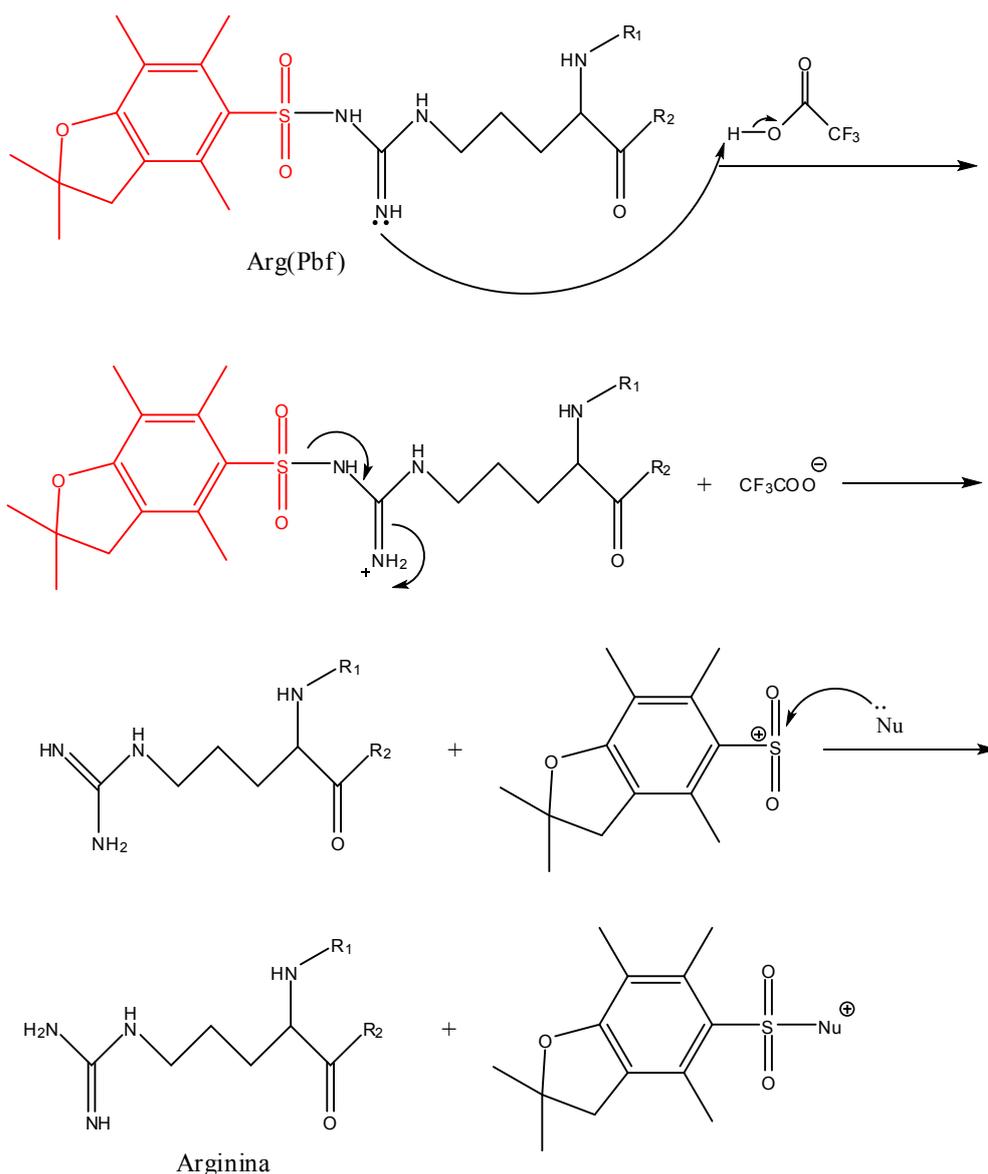


Figura 31: Retirada do grupo Pbf da arginina, em que R₁ e R₂ são continuaçãoções da cadeia peptídica e Nu é um nucleófilo presente no processo da clivagem. Em vermelho o grupo a ser retirado.¹⁰⁷

2.4.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético

A massa esperada, $[M+H]^+$, para o peptídeo KGD é de 1669,72 Da, e o espectro de massa (MS) obtido pode ser observado na Figura 32. Pelo espectro, foi possível notar a presença do íon com a massa esperada para o peptídeo, juntamente com outros valores de massa não esperados e não desejados, fato este que justificou a necessidade de purificação da amostra para retirar os subprodutos indesejados que possivelmente foram gerados ao longo da síntese ou no processo de clivagem.

Para confirmar que o íon observado no espectro era de fato o peptídeo sintetizado, procedeu-se à sua fragmentação (espectro de MS/MS, Figura 33). Pelas fragmentações, foi possível sequenciar o peptídeo utilizando as séries y e b, observando a sequência desejada, o que confirmou que a massa analisada refere-se ao peptídeo sintetizado. A determinação da sequência do peptídeo pode ser feita pela diferença de massa entre picos vizinhos em uma mesma série de íons.¹⁹

Os pares de íons referentes às séries y e b são correspondentes a fragmentos opostos e complementares entre si, o que facilita a interpretação final do espectro.²⁰ Identificar um íon na série y e o seu complementar na série b aumenta a confiabilidade da interpretação do espectro.²⁰

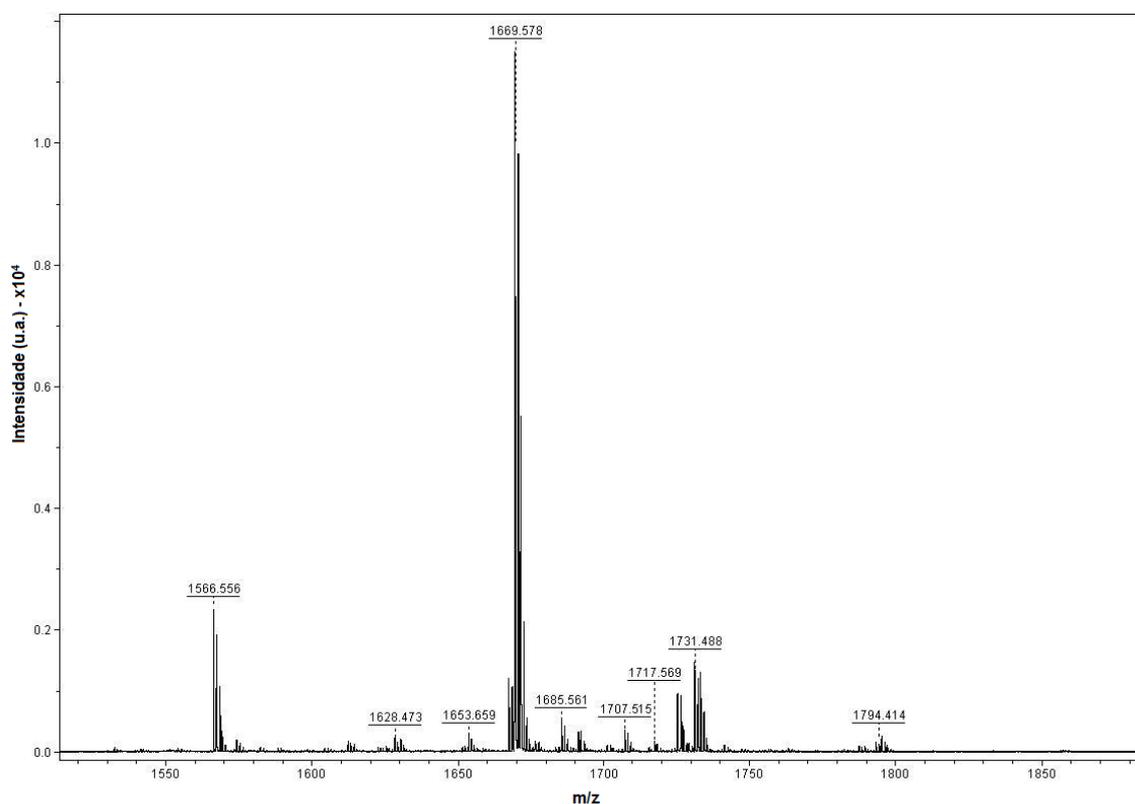


Figura 32: Espectro de Massa do peptídeo KGD sintetizado (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ($[M+H]^+ = 1669,57$)

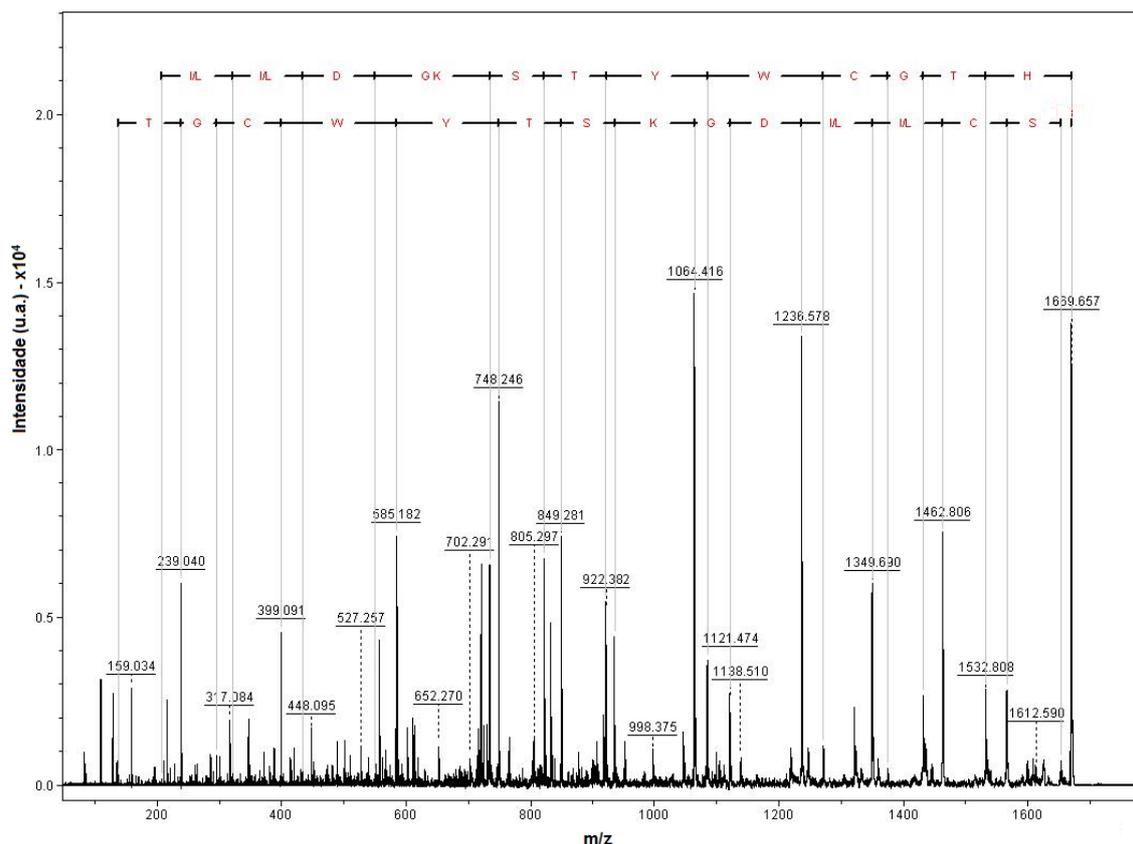


Figura 33: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor.

2.4.4 – Purificação do Peptídeo Sintético

O cromatograma do peptídeo KGD pode ser observado na Figura 34. Todas as frações foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa, e a fração indicada é referente ao peptídeo na forma reduzida (sem formar ponte dissulfeto).

A fração em destaque na Figura 34 foi coletada, congelada e liofilizada. Em seguida foi ressuspensa em água e deixada em solução por 48h em contato por o ar. O oxigênio do ar possibilitou a oxidação do peptídeo, levando à formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas.

Após oxidar o peptídeo, realizou-se um novo fracionamento com uma coluna analítica, e o cromatograma pode ser visto na Figura 35. Uma ampliação desse cromatograma pode ser visto na Figura 36, em que a fração 1 é referente ao peptídeo oxidado e a fração 2 é referente ao peptídeo reduzido. O espectro de massa da fração 1 referente ao peptídeo oxidado e puro pode ser visto na Figura 37 e a ampliação desse espectro com a distribuição

monoisotópica pode ser observado na Figura 38. Nota-se um valor de massa duas unidades menor do que a do peptídeo reduzido, devido à perda de hidrogênio de cada cisteína para formar a ponte dissulfeto.

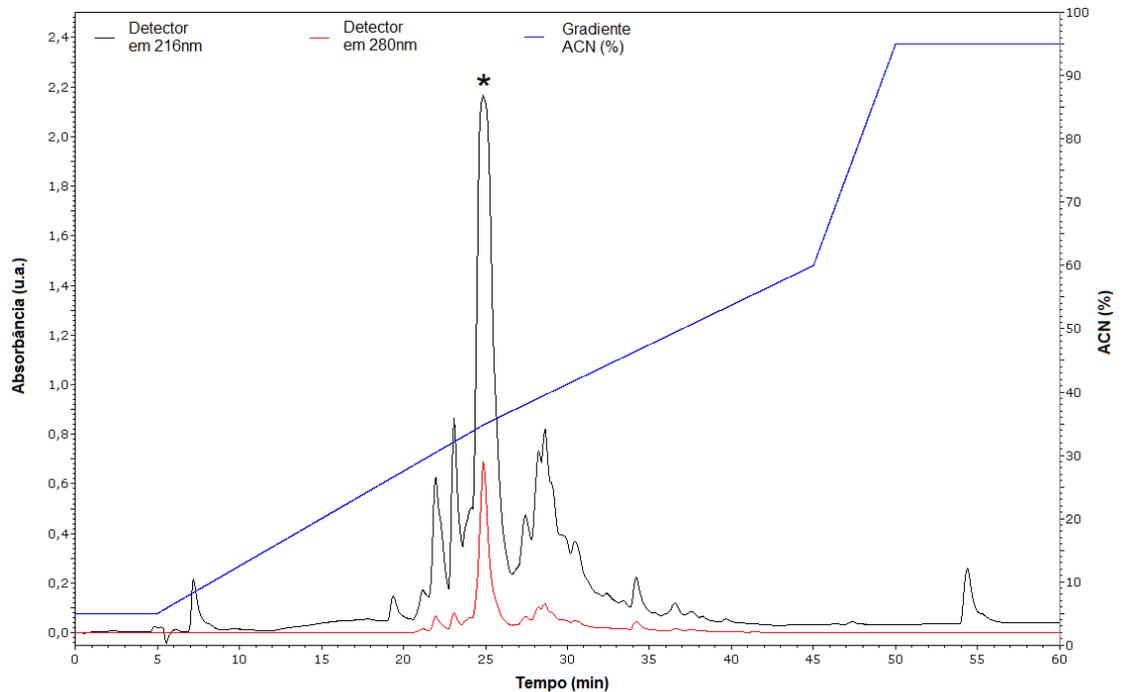


Figura 34: Cromatograma do peptídeo KGD. O * indica a fração referente ao peptídeo reduzido.

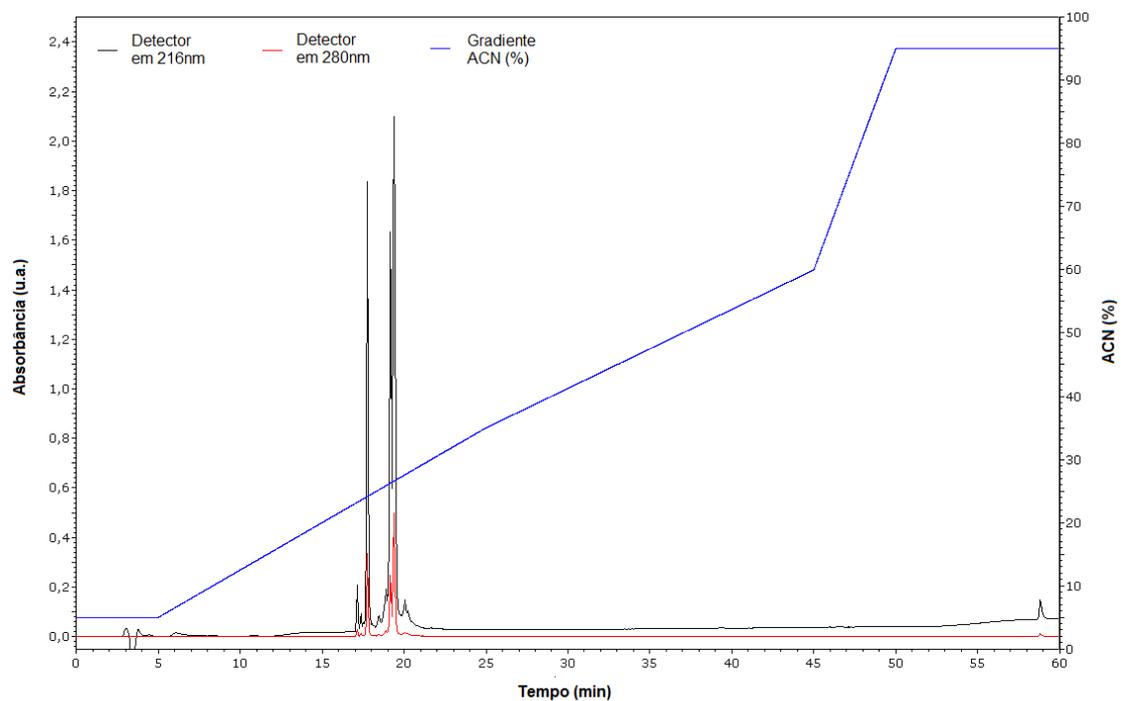


Figura 35: Cromatograma do peptídeo após oxidação.

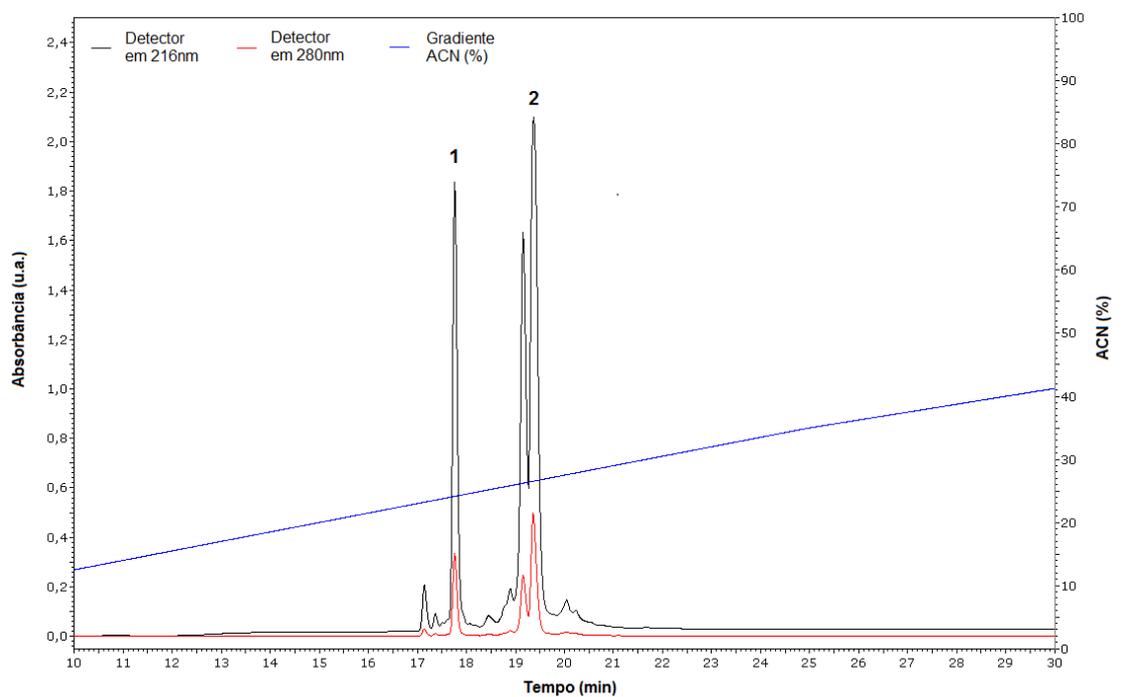


Figura 36: Expansão do cromatograma do peptídeo após oxidação (mostrado na Figura 35), indicando (1) peptídeo oxidado e (2) peptídeo reduzido.

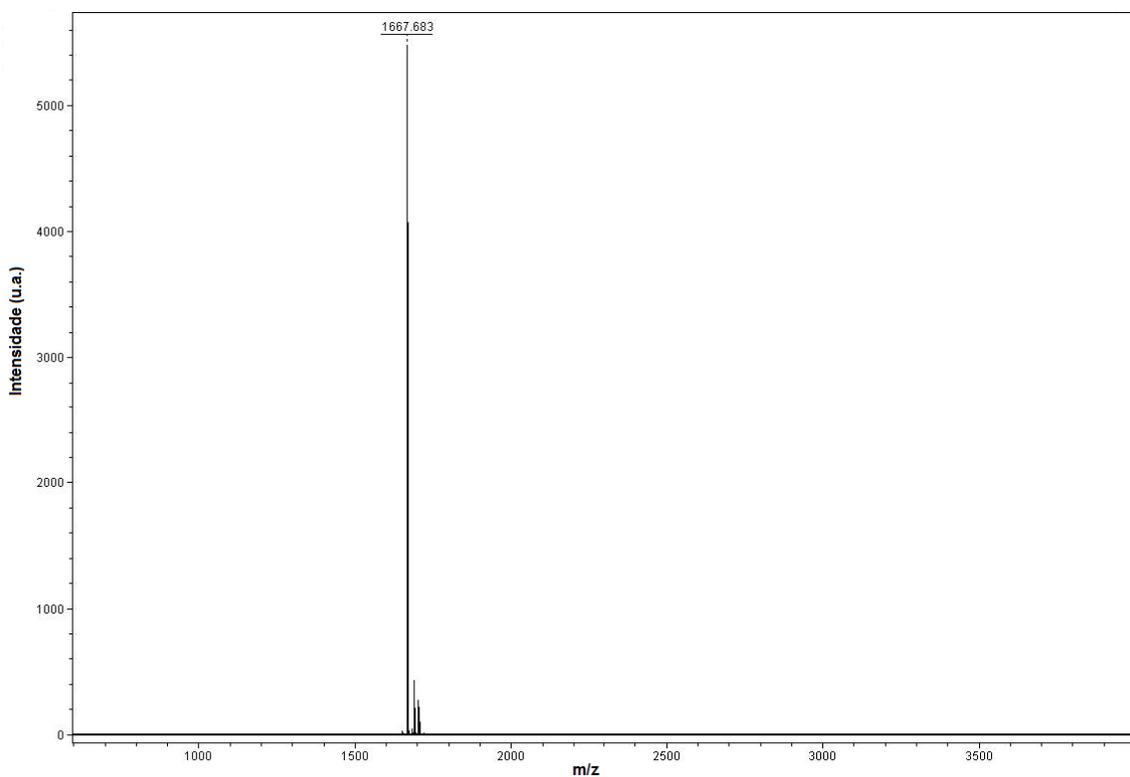


Figura 37: Espectro de massa do peptídeo oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ($[M+H]^+ = 1667,68$)

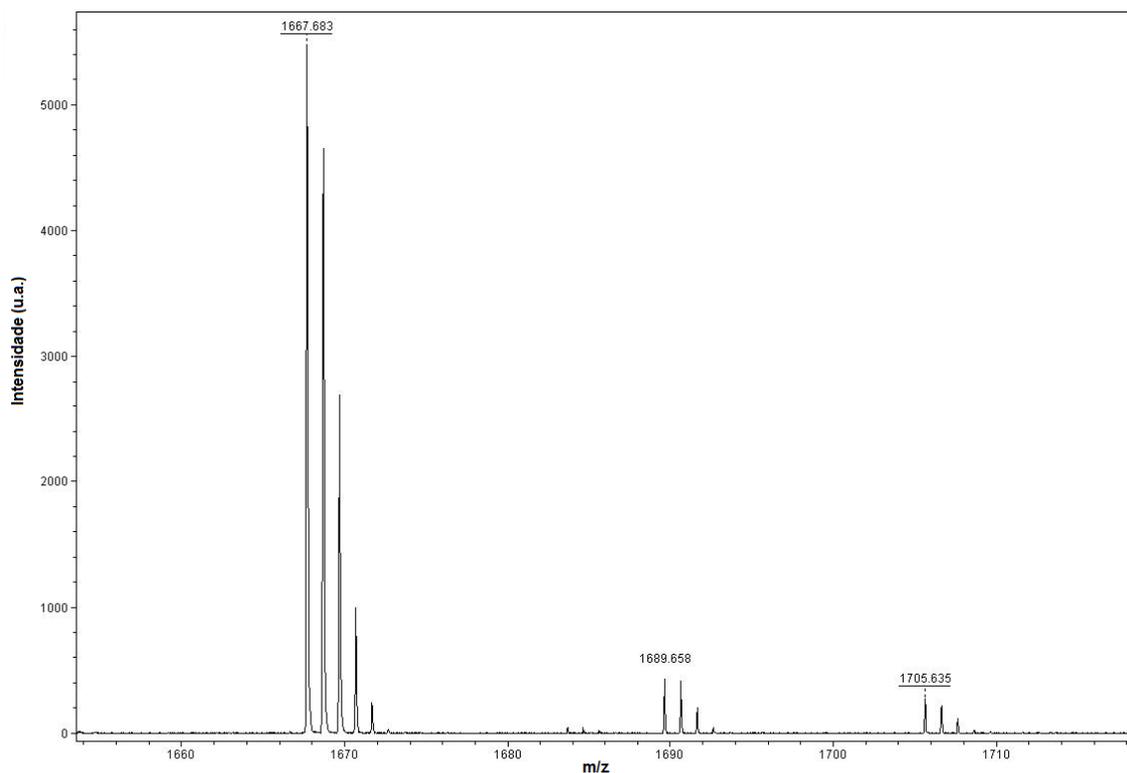


Figura 38: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo oxidado e também à presença de adutos de sódio e potássio.

As análises por cromatografia foram monitoradas a 216 e 280 nm, uma vez que a ligação peptídica possui absorvância em 216 nm e o anel indólico do triptofano possui absorvância em 280 nm.¹⁰⁸ A fase móvel utilizada não absorve no comprimento de onda selecionado (acetonitrila absorve em 190 nm) para evitar interferências indesejadas durante a análise.¹⁰⁹

Empregou-se o método de eluição por gradiente para obter melhor resolução e detectabilidade, maior simetria para as frações cromatográficas e um tempo menor de análise.¹¹⁰ A utilização de 0,1% de TFA nos solventes visa obter melhor simetria dos sinais e aumentar a solubilidade do peptídeo.¹¹¹

2.4.5 – Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Pelo experimento TOCSY, juntamente com o espectro de NOESY, foi possível identificar os diferentes sistemas de spins referentes a cada resíduo de aminoácido da sequência do peptídeo. Essas informações permitiram os assinalamentos (pelo assinalamento sequencial) de todos os átomos de

hidrogênio do peptídeo (Anexo 3). Uma parte do espectro TOCSY obtido, mostrando alguns sistemas de spins, pode ver visto no Anexo. 4.

A partir dos valores médios das constantes de acoplamento entre os átomos H_N e H_α ($J_{HN-H\alpha}$) medidas no espectro DQF-COSY, foi possível relacioná-los com o ângulo diedro Φ , que pode caracterizar a estrutura secundária do peptídeo. Os valores medidos para as constantes de acoplamento encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9: Constante de acoplamento $J_{HN-H\alpha}$ para cada aminoácido.

Aminoácido	$J_{HN-H\alpha}$ (Hz)
1.H	-
2.T	-
3.G	5,6/7,2
4.C	8,8
5.W	-
6.Y	8,8
7.T	7,2
8.S	10,4
9.K	10,4
10.G	6,4/5,6
11.D	9,6
12.L	8,8
13.I	9,6
14.C	8,8
15.S	11,2

Foi possível observar para os aminoácidos 4C, 6Y, 12L, 13I e 14C valores de constantes próximos a 8,9 Hz, valor característico para uma estrutura em folha β antiparalela (Tabela 1).³³ Este dado é coerente quando observado que o peptídeo KGD é um peptídeo cíclico com uma ponte dissulfeto entre os resíduos 4C e 14C.

Pelo experimento HSQC-editado (1H - ^{13}C) foi possível assinalar os átomos de carbono da molécula. Os assinalamentos dos átomos de hidrogênio e carbono referentes ao peptídeo KGD encontram-se no Anexo 3. Partes dos espectros de HSQC da região alifática e da região aromática podem ser observados nos Anexos 5 e 6, respectivamente. Pelo HSQC foi possível diferenciar os sinais de CH_2 dos sinais de CH e CH_3 , em que os sinais

referentes aos grupos -CH e -CH₃ apresentam intensidades positivas e os sinais referentes ao -CH₂ apresentam intensidades negativas.

No espectro NOESY foi possível identificar e assinalar os sinais de NOEs existentes entre os átomos de hidrogênio da molécula. O espectro de NOESY, mostrando alguns NOEs de maior relevância, pode ser visto nos Anexos 7 e 8. Foi possível identificar NOEs existentes entre os resíduos de aminoácidos 4C/14C, 5W/13I e 6Y/12L. Esse fato vai de acordo com o observado anteriormente, pois o peptídeo apresenta uma ponte dissulfeto entre os resíduos 4C/14C, o que torna possível a existência de NOEs entre os resíduos 4C/14C, 5W/13I e 6Y/12L.

2.4.6 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN

Com os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H_α, H_β e H_N, juntamente com os assinalamentos dos carbonos C_α e C_β foi possível calcular os ângulos diedros para o peptídeo KGD pelo programa TALOS.⁹¹ A lista com os ângulos Φ e Ψ podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 10: Ângulos diedros Φ e Ψ calculados pelo programa TALOS.

Aminoácido	Φ (°)	Ψ (°)
1.H	-	-
2.T	-109	2
3.G	-93	148
4.C	-94	119
5.W	-98	129
6.Y	-117	137
7.T	-91	169
8.S	-61	-30
9.K	-81	-3
10.G	-99	2
11.D	-84	133
12.L	-88	135
13.I	-107	137
14.C	-118	140
15.S	-	-

Os NOEs assinalados pelo espectro de NOESY foram convertidos em restrições de distância. Estas restrições de distâncias, juntamente com os ângulos diedros foram os parâmetros utilizados para realizar os cálculos estruturais. A sobreposição das 20 estruturas de menor energia pode ser vista na Figura 39.

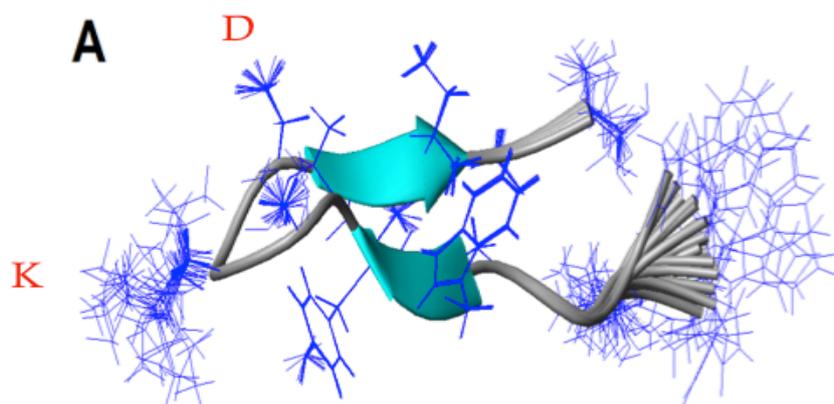


Figura 39: Estrutura calculada para o peptídeo KGD. Sobreposição das 20 estruturas de menor energia.

As estruturas calculadas foram obtidas com 285 restrições de distâncias, uma média de 19 NOEs por resíduo de aminoácido, valor acima da média de 15 NOEs por resíduo para se obter uma estrutura de maior confiabilidade.⁴³ O valor do RMSD para as 20 estruturas foi de 0,473, mostrando grande estruturação para um peptídeo, fato que pode se justificar pela presença da ponte dissulfeto entre as cisteínas e também por uma estruturação em folha β antiparalela. O RMSD obtido apresenta um valor alto quando comparado à proteínas, entretanto, para um peptídeo, este é um bom valor tendo em vista a maior mobilidade por ser uma molécula pequena.

Foi possível observar a formação, em uma pequena região, de uma estruturação em folha β antiparalela envolvendo os resíduos C-4, W-5, Y-6, L-12, I-13 e C-14. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos na folha β apresentaram uma melhor estruturação e uma menor mobilidade. Já os resíduos de aminoácidos localizados no *looping* não apresentaram uma boa estruturação, mostrando, com isso, maior mobilidade.

Um gráfico mostrando a quantidade de NOEs utilizados para o cálculo por resíduo de aminoácido, indicando também se o NOE observado foi inte-

residual ou de intraresidual, pode ser visto na Figura 40. Foi possível observar que a maior quantidade de NOEs ocorreu entre os aminoácidos estruturados em folha β , principalmente os NOEs de longa distância (maior que $i+1$).

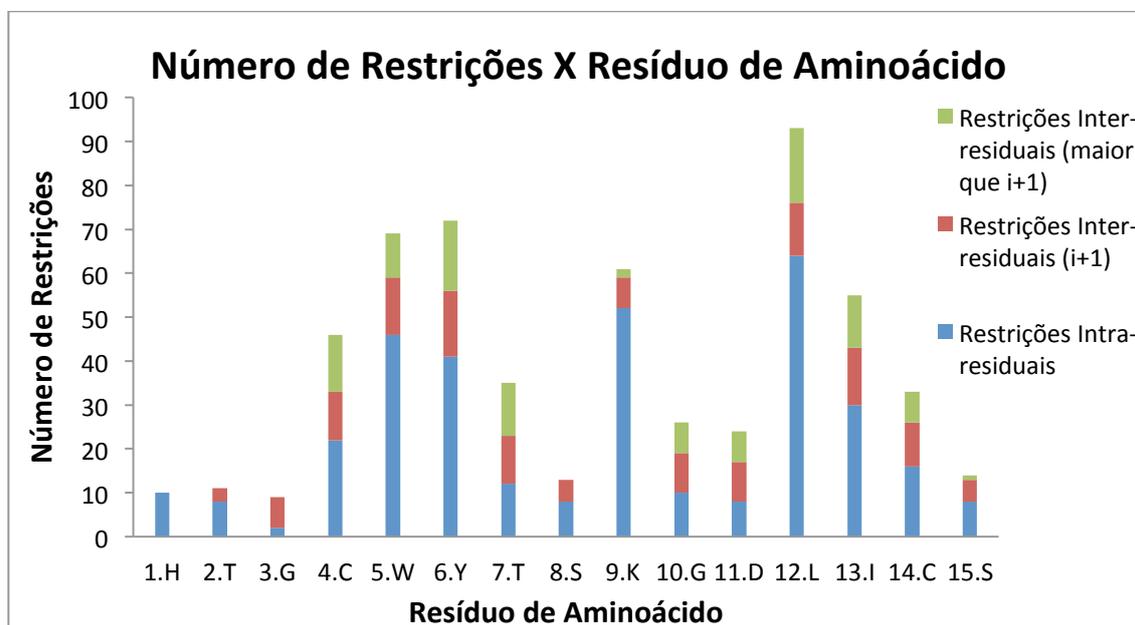


Figura 40: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido.

As restrições intraresiduais (em azul) são NOEs que naturalmente se espera, como por exemplo, H_α e H_β são vizinhos e por esse motivo apresentam NOE, uma vez que estão espacialmente próximos. Restrições inter-residuais do tipo $i+1$ (em vermelho) são os NOEs que geralmente são utilizados para os assinalamentos sequenciais, em que após assinalar um resíduo de aminoácido é observado o NOE do tipo $i+1$ para identificar o próximo resíduo da sequência. Restrições inter-residuais, maiores do que $i+1$ (em verde), representam os NOEs de longa distância. São os NOEs de maior importância para se obter informações acerca da estrutura.

Realizou-se o cálculo do CSI para o H_α , C_α e C_β para observar a coerência com a estrutura calculada e observar os possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos em uma estruturação em folha β . Os gráficos de CSI para os átomos de H_α , C_α e C_β podem ser observados nas Figuras 41, 42 e 43, respectivamente. Notou-se para os gráficos de CSI referentes ao H_α e C_β grupos seguidos de resíduos com valores positivos, em especial 4C, 5W e 6Y, o que pode caracterizar uma estrutura em folha β envolvendo estes

resíduos, e que vai de acordo com a estrutura calculada. Para o gráfico referente ao C_{α} foi possível notar grupos seguidos de resíduos com valores negativos, como 12L, 13I e 14C, o que pode caracterizar a estrutura com uma tendência de folha β envolvendo estes resíduos, o que vai também de acordo com a estrutura calculada.

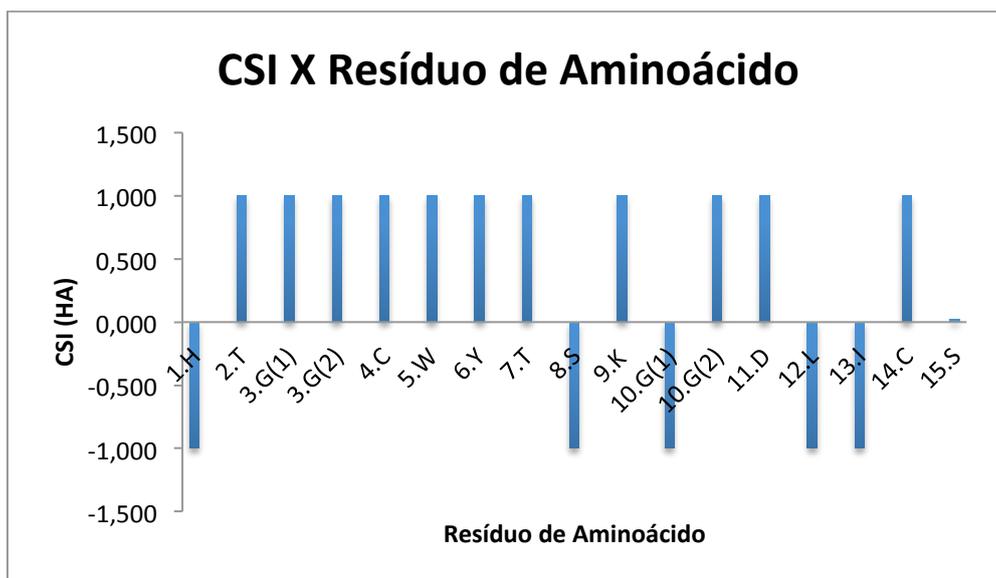


Figura 41: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H_{α} do peptídeo KGD.

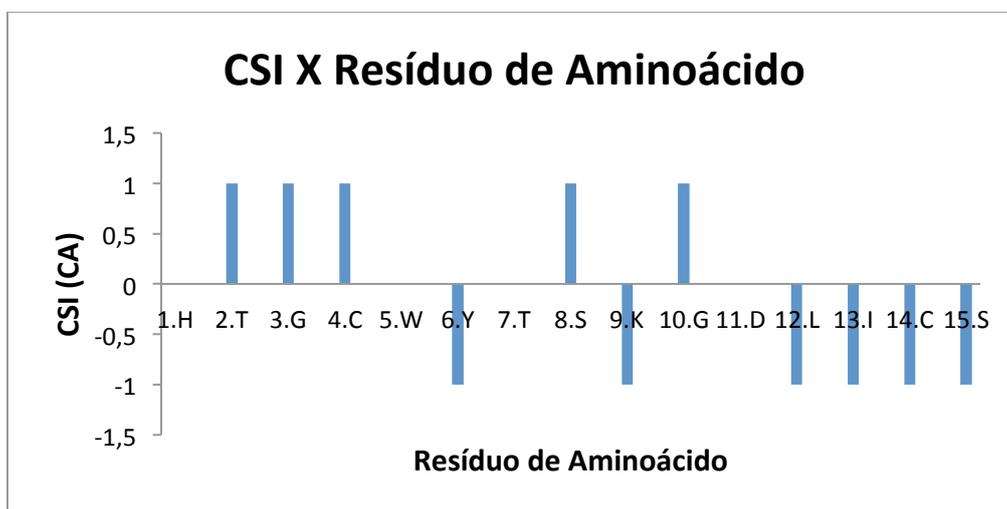


Figura 42: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{α} do peptídeo KGD.

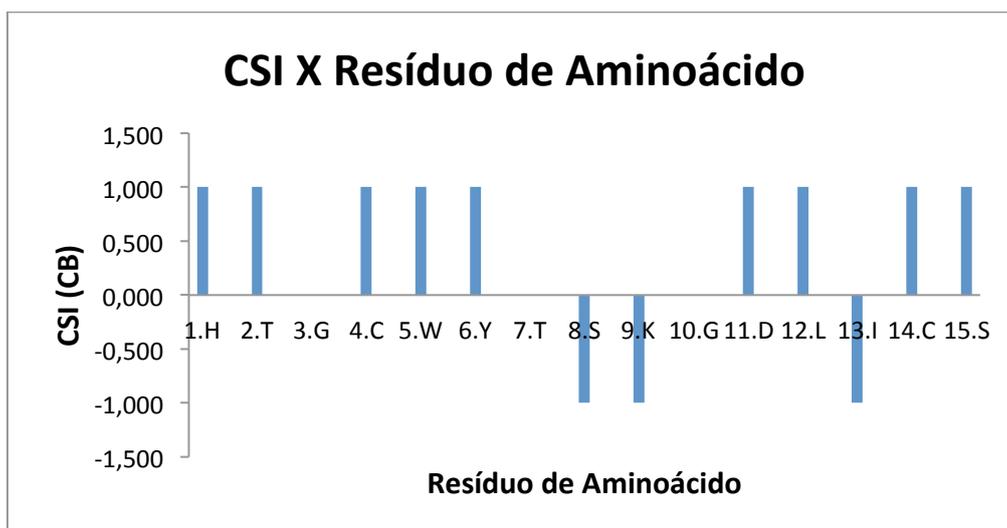


Figura 43: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{β} do peptídeo KGD.

Realizou-se experimentos de TOCSY a diferentes temperaturas (278, 298 e 308 K) para observar a variação no valor do deslocamento químico do hidrogênio amídico para cada resíduo de aminoácido, e com isso, observar possíveis ligações de hidrogênio apresentadas por estes átomos.

Com os resultados obtidos a partir dos espectros, foi possível construir um gráfico, para cada resíduo de aminoácido, do valor do deslocamento químico do H_N pela temperatura. Os pontos de cada gráfico foram linearizados e o coeficiente angular da reta nos fornece o coeficiente de temperatura, em ppm/K.

O gráfico dos coeficientes de temperatura para os hidrogênios amídicos de cada resíduo de aminoácido para o peptídeo KGD pode ser visto na Figura 44.

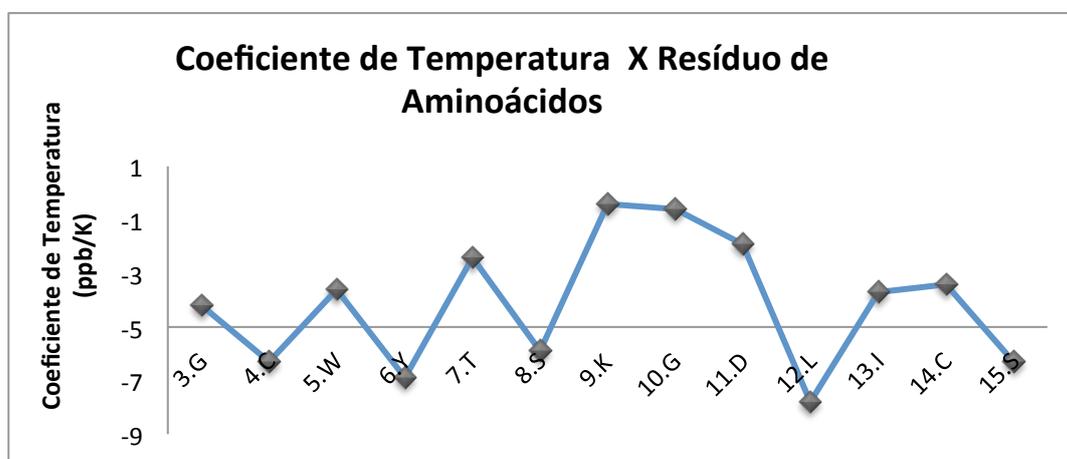


Figura 44: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo KGD.

Para este experimento, valores do coeficiente de temperatura maiores do que -5 indicam possíveis ligações de hidrogênio intramoleculares do hidrogênio da amina (H_N), enquanto que valores menores do que -5 indicam possíveis ligações de hidrogênio que não intramolecular, possivelmente com a água.⁹³

Foi possível observar valores do coeficiente de temperatura maiores do que -5 para os resíduos de aminoácidos 5W, 7T, 13I e 14C, o que pode indicar ligações de hidrogênio intramolecular para o H_N . Este fato pode se justificar devido à estruturação em folha β apresentada pelo peptídeo KGD. Observou-se também valores de coeficiente de temperatura maiores do que -5 para os aminoácidos 9K, 10G e 11D, indicando possíveis ligações de hidrogênio intramolecular para os hidrogênio amídicos desses resíduos, o que se justifica pelo fato de estes resíduos se encontrarem no *looping* existente na estrutura.

2.4.7 – Teste Biológico: Agregação Plaquetária

Apesar do peptídeo apresentar algumas características comuns aos peptídeos com motivo de desintegrina, como a presença de cisteínas, ponte dissulfeto e a presença da sequência KGD, o peptídeo KGD não apresentou atividade contra a coagulação plaquetária. Este peptídeo, mesmo apresentando uma sequência de aminoácidos similar a outros peptídeos com motivo de desintegrina, como pode ser visto na Tabela 8, não apresentou atividade antitrombótica.

A região KGD do peptídeo, juntamente com a região KGD de uma proteína com motivo de desintegrina (ação antitrombótica) pode ser vista na Figura 45 para comparação. Foi possível observar que a região KGD do peptídeo, região onde poderia ocorrer a interação com a integrina para se obter uma ação antitrombótica, é diferente quando comparada com uma proteína com esta atividade. A falta de atividade observada pode estar associada a essa diferença estrutural.

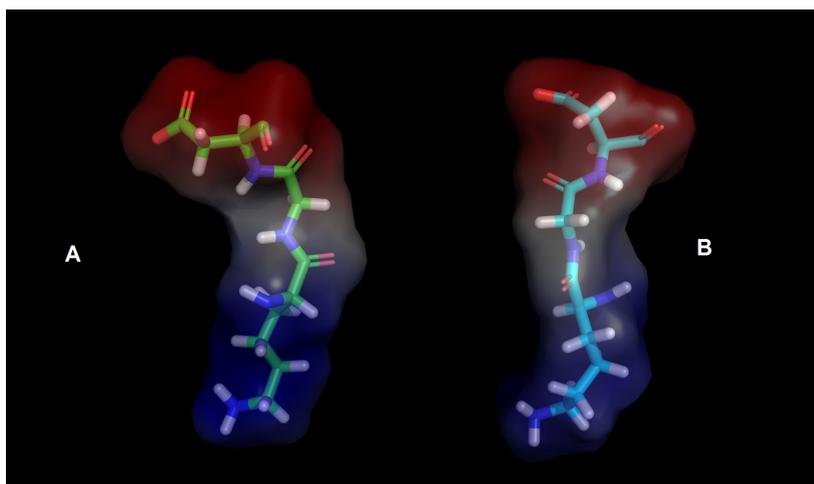


Figura 45: Estruturas (A) região KGD do peptídeo KGD, (B) região KGD de uma desintegrina com motivo KGD (PDB_1Q7J).

2.4.8 – Síntese, Caracterização e Purificação de Peptídeos Análogos

Realizou-se a síntese dos dois novos peptídeos análogos, denominados peptídeos RGD e HGD. A mudança na sequência de aminoácidos de KGD para RGD e HGD foi feita devido à similaridade da estrutura da lisina com a arginina e a histidina quando comparadas ao restante dos aminoácidos. Dentre os 20 aminoácidos, os que apresentam maiores semelhanças estruturais com a lisina são arginina e histidina, fato que justifica o desenho dos dois novos peptídeos análogos.

Outro fator que justifica o desenho dos novos peptídeos é o fato de que a maioria dos peptídeos que apresentam motivos de desintegrinas (ação antitrombótica) apresentam em sua estrutura a sequência RGD. Apesar de se encontrar na literatura peptídeos antitrombóticos com a sequência KGD, é muito mais frequente a ocorrência de peptídeos com motivo de desintegrina com a sequência RGD.^{55,57} A sequência de aminoácidos do peptídeo RGD, análogo do peptídeo KGD, juntamente com outros peptídeos RGD com ação antitrombótica podem ser vistas na Tabela 11:

Tabela 11: Sequência de aminoácidos do peptídeo RGD e outros peptídeos antitrombóticos contendo o domínio RGD.^{54,62,94}

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
Peptídeo RGD	HTGCWYTS RGDLICS
Antitrombótico 1	<u>CRR</u> RGD NPDDRC
Antitrombótico 2	<u>CR</u> RGD MDDDC
Antitrombótico 3	<u>CFTPR</u> RGD MPPGYC
Antitrombótico 4	<u>CRR</u> RGD DLDDLYC
Antitrombótico 5	<u>C</u> RGD DC

Os peptídeos análogos também foram sintetizados utilizando a estratégia Fmoc/*t*-butila e caracterizados por espectrometria de massa com espectros de MS e MS/MS. A massa teórica para cada peptídeo análogo pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12: Massa monoisotópica para os peptídeos RGD e HGD.

	Sequência de Aminoácidos	Massa monoisotópica (Da)
Peptídeo RGD	HTGCWYTS RGDLICS -NH ₂	1697,73
Peptídeo HGD	HTGCWYTS HGDLICS -NH ₂	1678,69

Os espectros de MS para os peptídeos RGD e HGD podem ser vistos respectivamente nas Figuras 46 e 47. A massa $[M+H]^+$ observada para o peptídeo RGD foi de 1697,5 Da. Observou-se também outros valores diversos de massa não esperados, fato que mostra diversas impurezas e justifica a necessidade de realizar uma purificação para obter apenas o peptídeo de interesse.

Para o peptídeo HGD a massa observada (Figura 47) foi 1678,5 Da. Pelo espectro, notou-se também a presença de íons com outros valores de massa não esperados e não desejados, justificando também a necessidade de purificação da amostra.

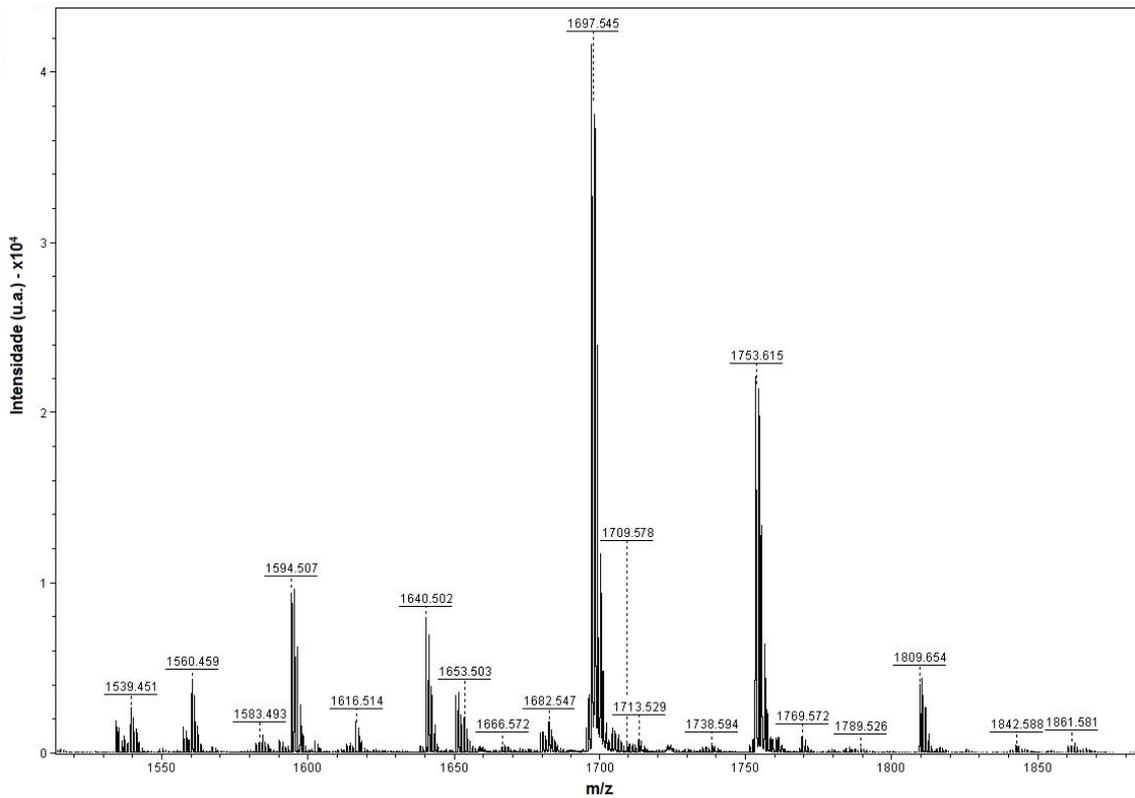


Figura 46: Espectro de Massa (MS) do peptídeo RGD (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ($[M+H]^+ = 1697,54$).

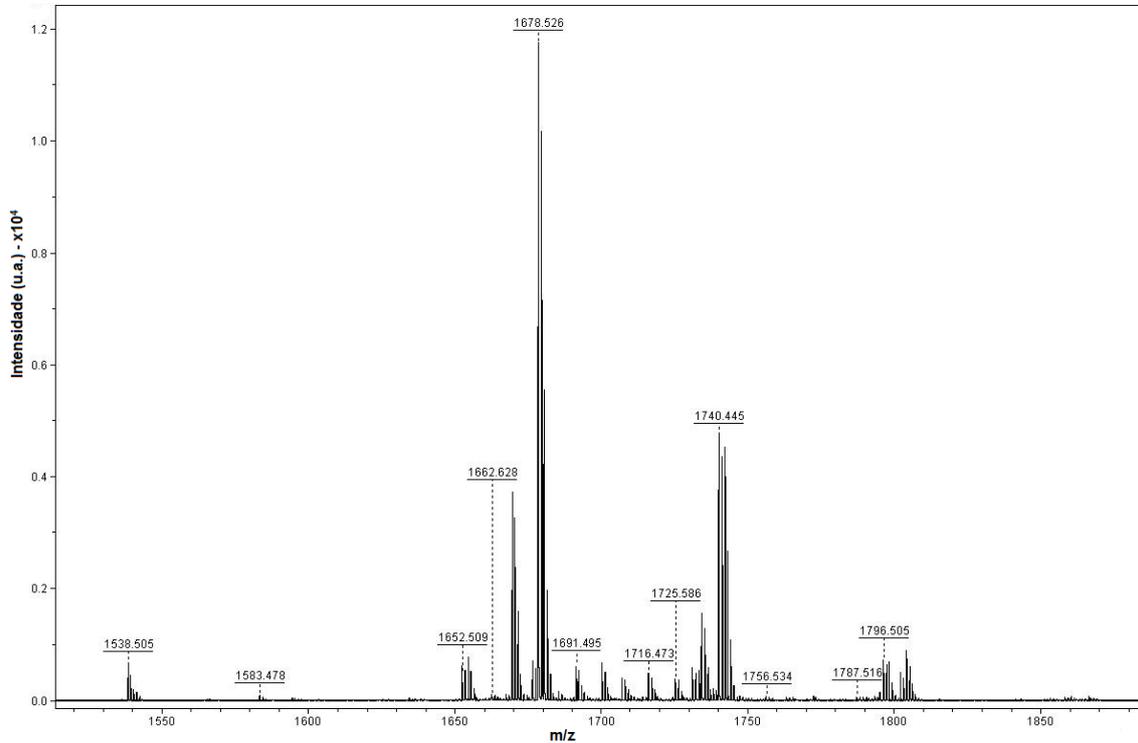


Figura 47: Espectro de Massa do peptídeo HGD (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ($[M+H]^+ = 1678,52$).

Análogo ao que foi feito com o peptídeo KGD, para confirmar se os íons observados nos espectros das Figuras 46 e 47 eram de fato referentes aos peptídeo análogos, procedeu-se à fragmentação dos íons com a massa referente aos peptídeos em questão (espectro de MS/MS, Figura 48 e 49). Pelas fragmentações, foi possível sequenciar os peptídeos RGD e HGD utilizando as séries y e b, observando a sequência desejada, o que confirmou que as massa observadas nos espectros de MS se referiam aos peptídeos análogos RGD e HGD.

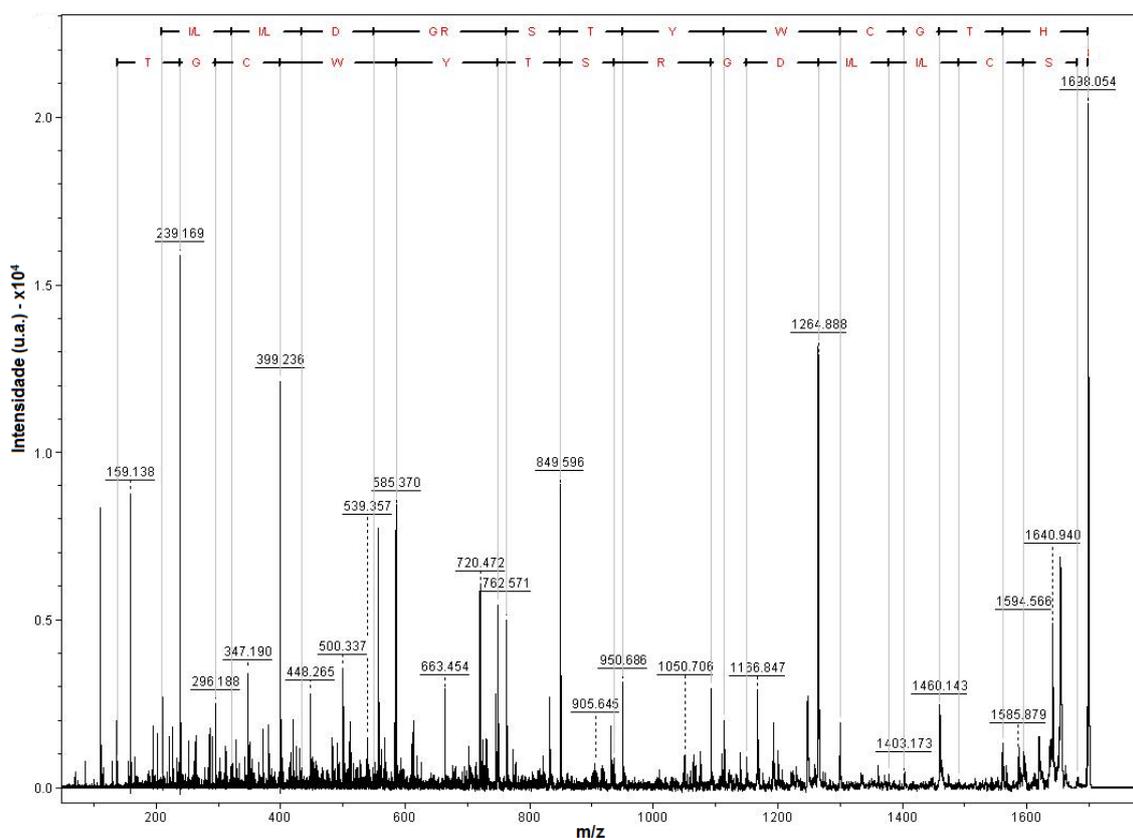


Figura 48: Espectro de MS/MS do peptídeo RGD referente à fragmentação do íon precursor.

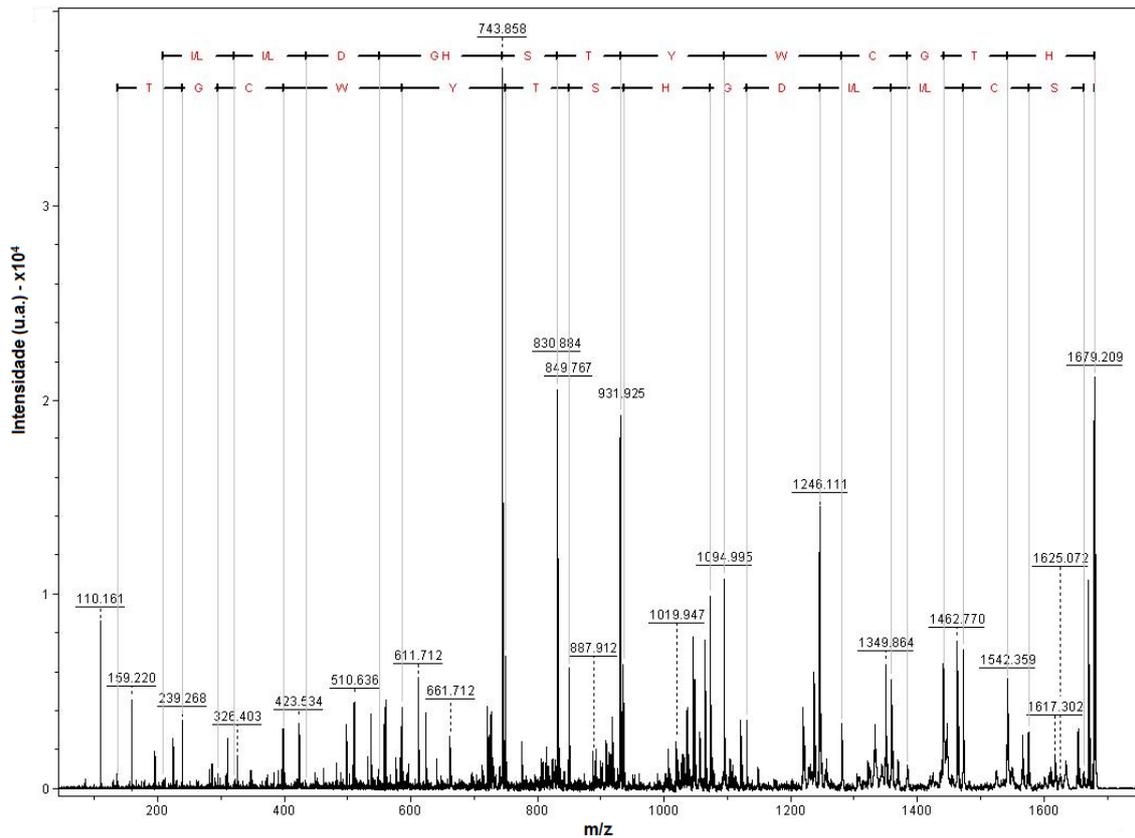


Figura 49: Espectro de MS/MS do peptídeo HGD referente à fragmentação do íon precursor.

Os peptídeos análogos foram submetidos à cromatografia para a purificação. Os cromatogramas dos peptídeos RGD e HGD podem ser observados nas Figuras 50 e 51, respectivamente. Todas as frações observadas foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa para descobrir qual seria a fração de interesse. A fração indicada em cada cromatograma é referente ao peptídeo de interesse na forma reduzida.

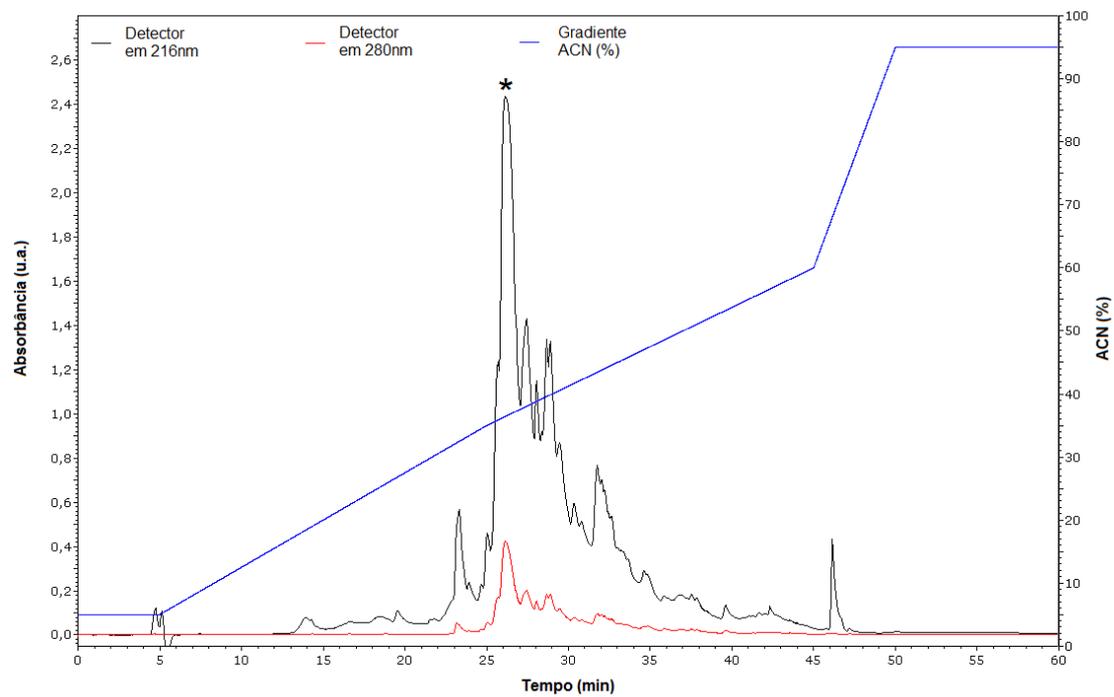


Figura 50: Cromatograma do peptídeo RGD, com a fração referente ao peptídeo reduzido em destaque.

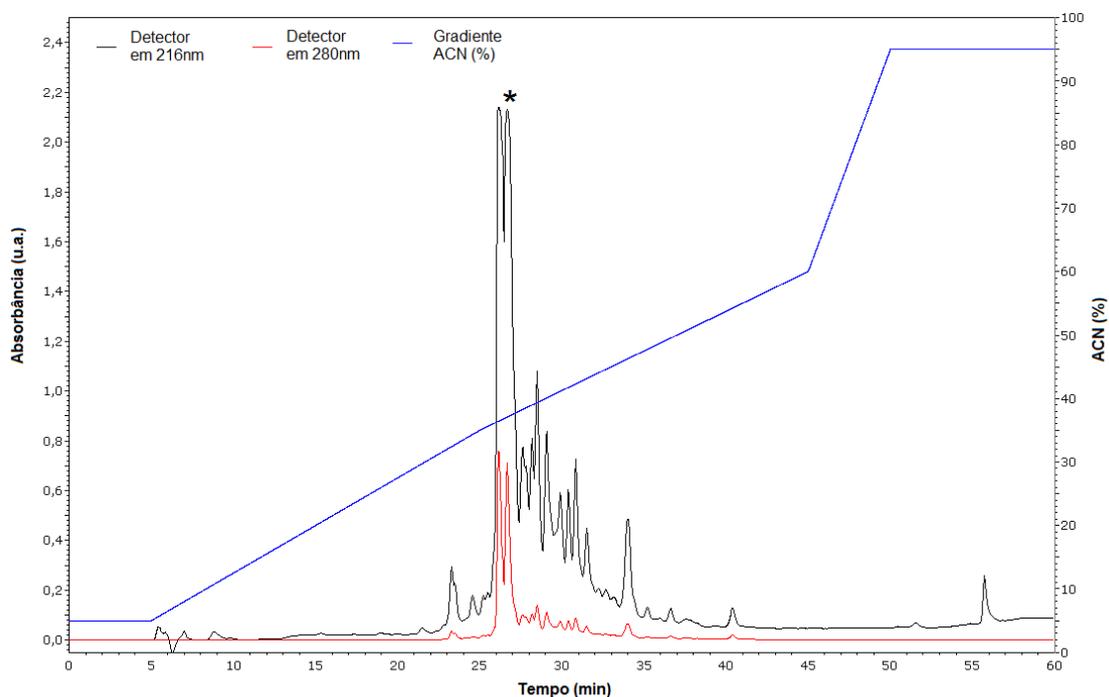


Figura 51: Cromatograma do peptídeo HGD, com a fração referente ao peptídeo reduzido em destaque.

As frações em destaque nas Figuras 50 e 51 foram coletadas, congeladas e liofilizadas. Em seguida foram ressuspensas em água e deixadas em solução por 48h em contato por o ar. O oxigênio do ar possibilitou a

oxidação do peptídeo, levando à formação de pontes dissulfeto entre as cisteínas. Com isso houve a ciclização dos peptídeos análogos da mesma maneira realizada para o peptídeos KGD.

Após oxidar os peptídeos RGD e HGD, realizou-se um novo fracionamento com uma coluna analítica, e os cromatogramas podem ser vistos nas Figuras 52 e 53. A ampliação desses cromatogramas pode ser vista nas Figuras 54 e 55, em que a fração indicada pelo número 1 é referente ao peptídeo oxidado e a fração 2 é referente ao peptídeo reduzido.

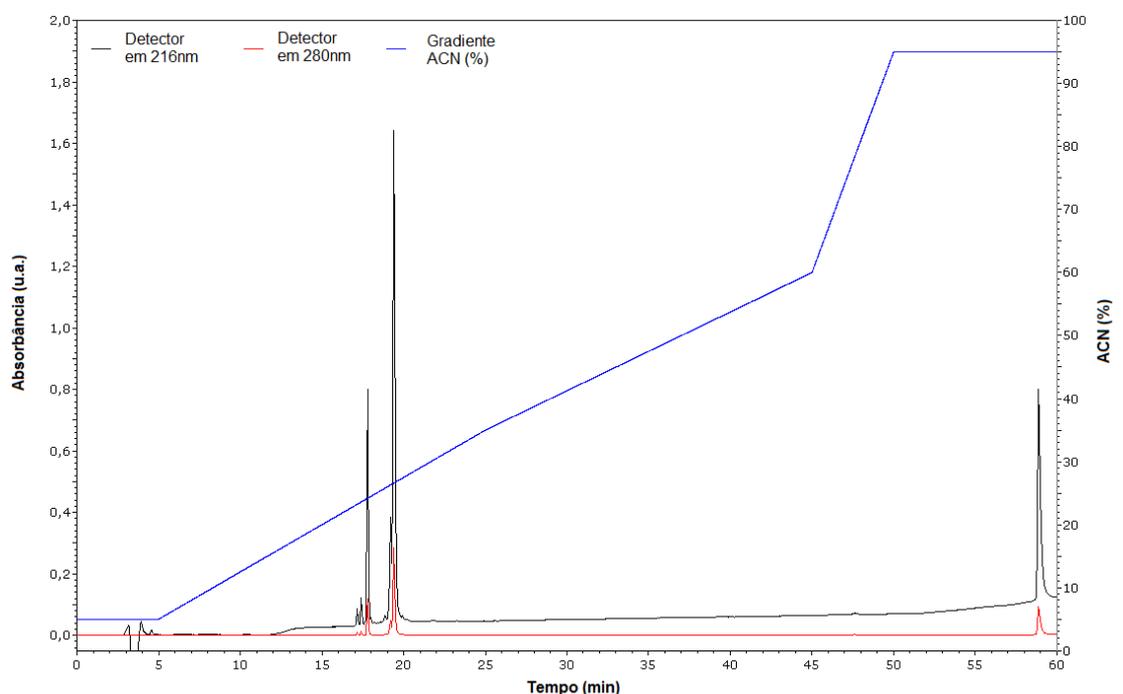


Figura 52: Cromatograma do peptídeo RGD após ser submetido a oxidação.

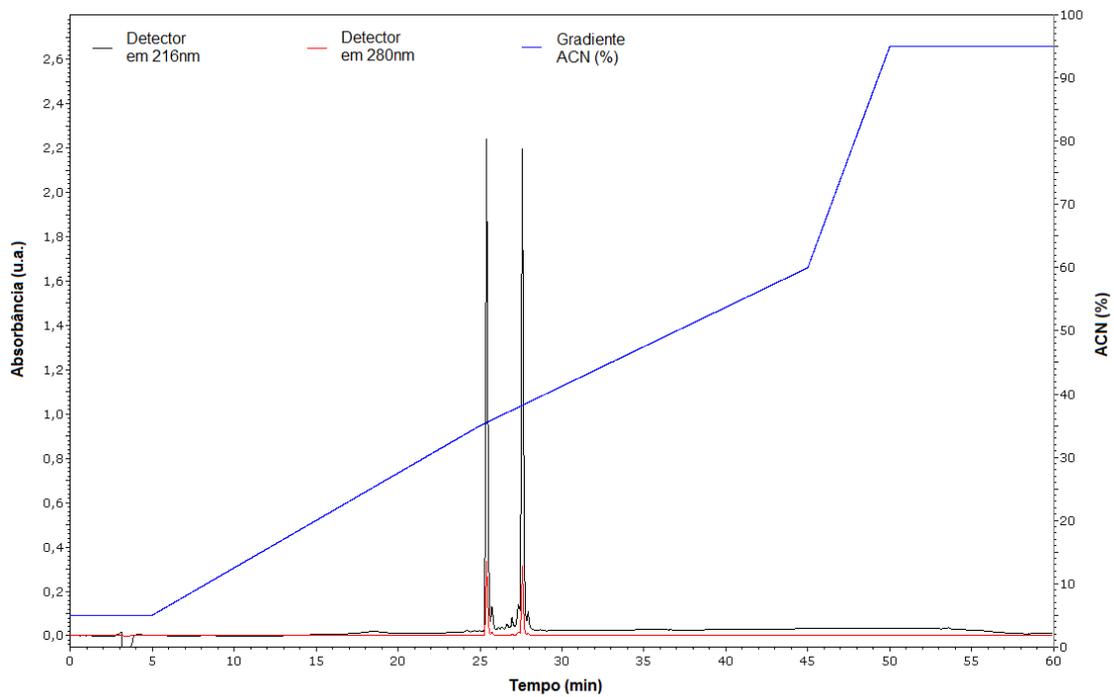


Figura 53: Cromatograma do peptídeo HGD após ser submetido a oxidação.

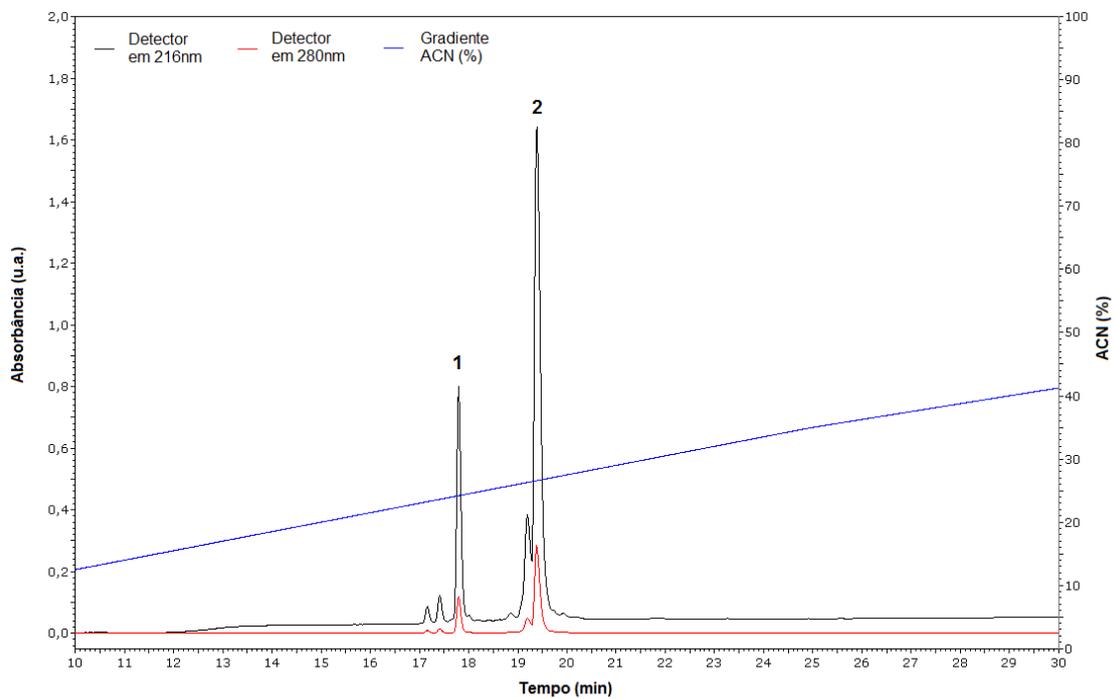


Figura 54: Ampliação do cromatograma do peptídeo RGD após oxidação. (1) fração referente ao peptídeo oxidado e (2) fração referente ao peptídeo reduzido.

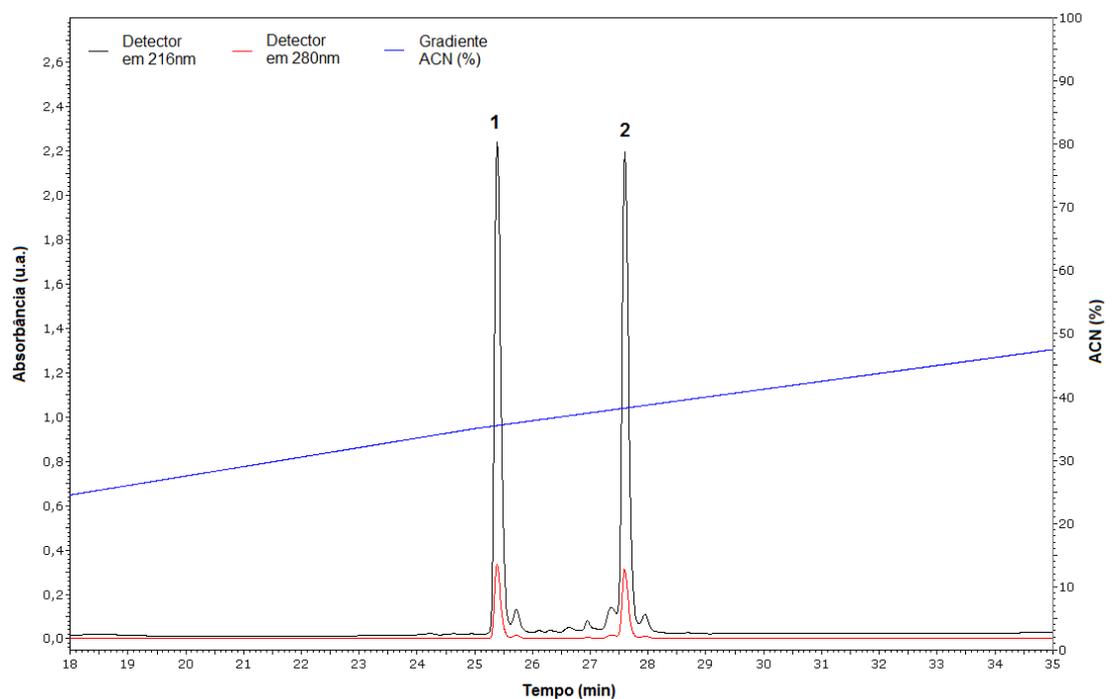


Figura 55: Ampliação do cromatograma do peptídeo HGD após oxidação. (1) fração referente ao peptídeo oxidado e (2) fração referente ao peptídeo reduzido.

As frações indicadas com os números 1 e 2 foram submetidas a análises por espectrometria de massa. Os espectros de massa das frações 1, referentes aos peptídeos RGD e HGD oxidados e puros podem ser vistos nas Figuras 56 e 57. A ampliação desses espectros com a distribuição monoisotópica pode ser observada nas Figuras 58 e 59. Nota-se um valor de massa duas unidades menor do que a do peptídeo reduzido, devido à perda do hidrogênio de cada cisteína para formar a ponte dissulfeto. Foi possível notar também que os peptídeos coletados nas frações 1 encontram-se puros.

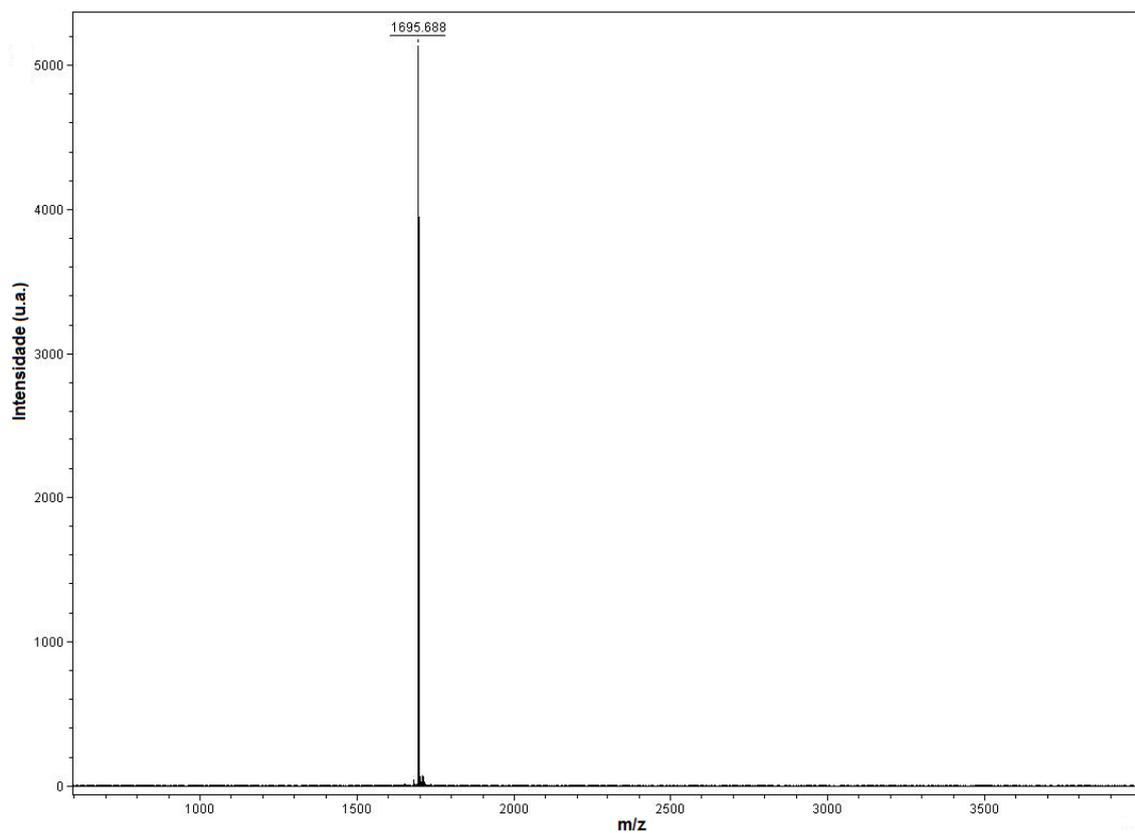


Figura 56: Espectro de massa do peptídeo RGD oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ($[M+H]^+ = 1695,68$).

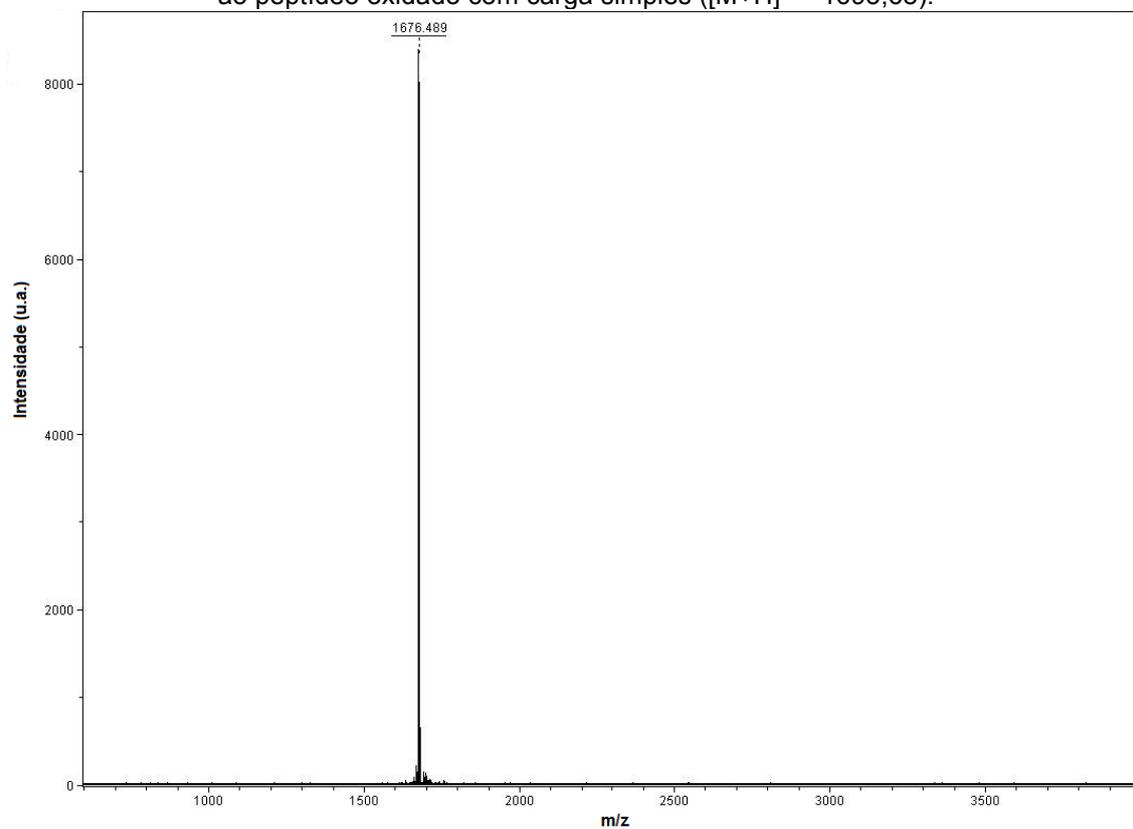


Figura 57: Espectro de massa do peptídeo HGD oxidado e puro. Presença da massa referente ao peptídeo oxidado com carga simples ($[M+H]^+ = 1676,49$).

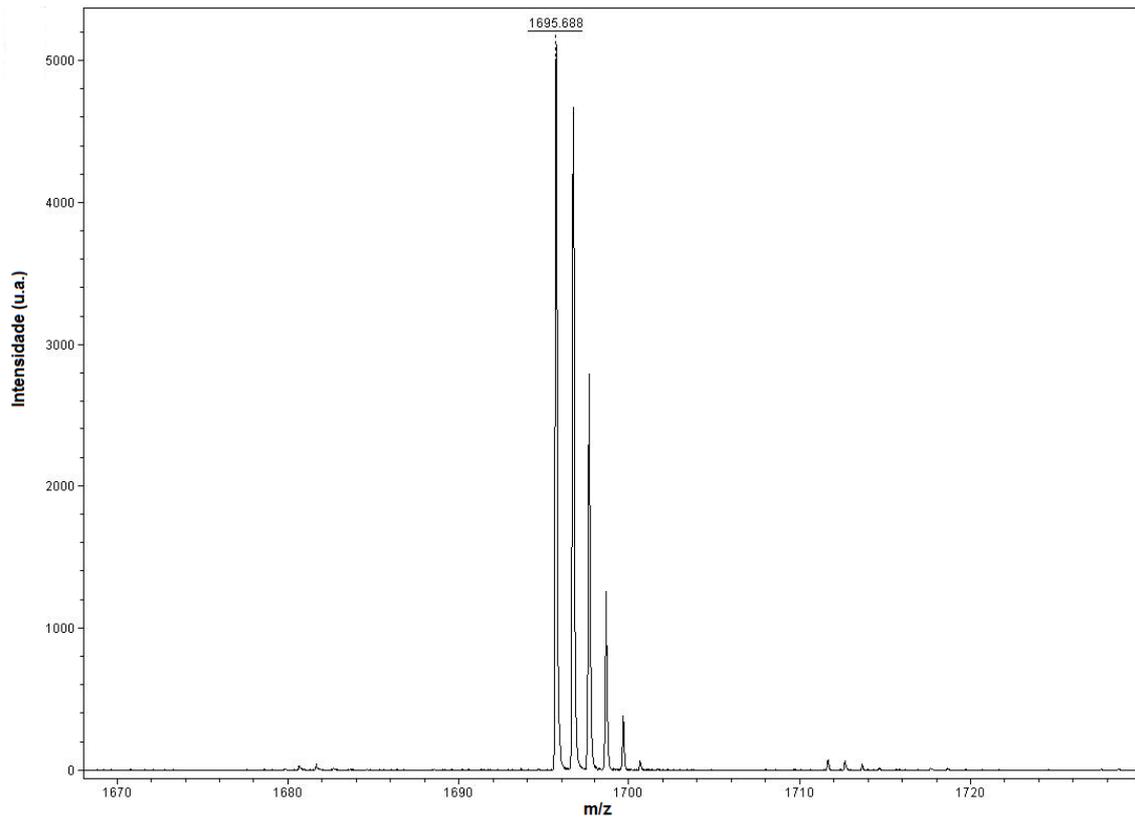


Figura 58: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo RGD oxidado.

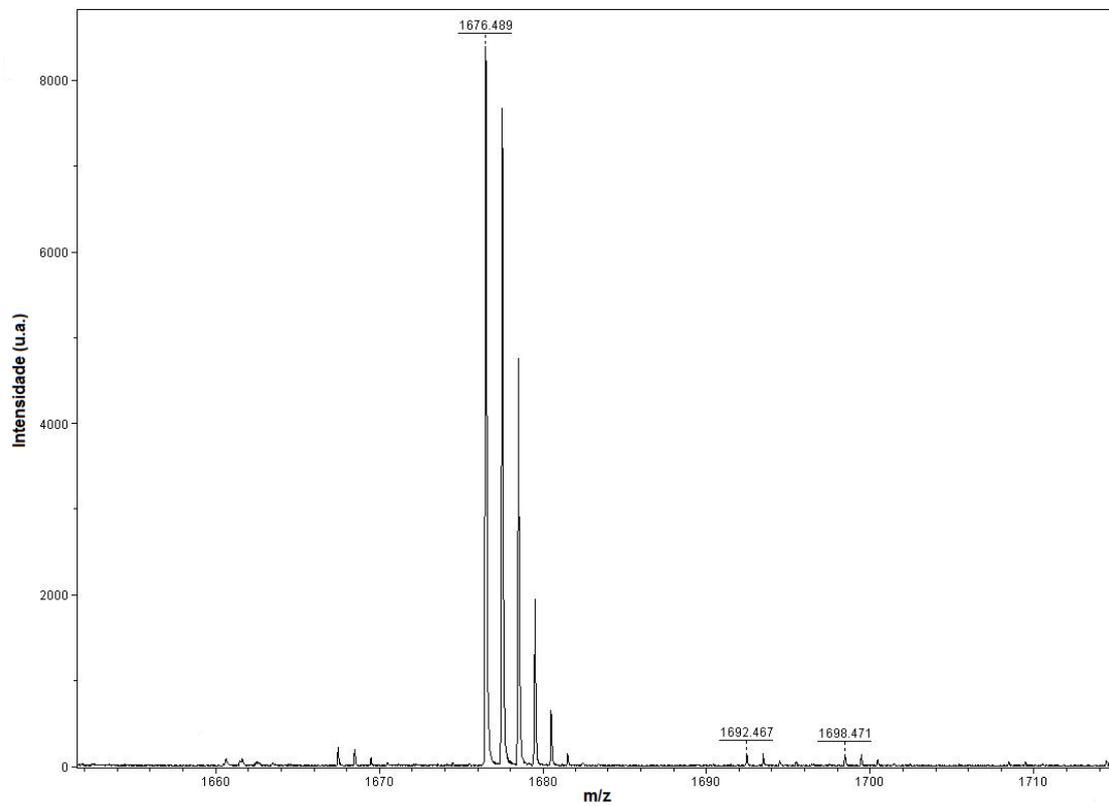


Figura 59: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo HGD oxidado.

2.4.9 – Experimentos de RMN dos Peptídeos Análogos

De forma análoga ao peptídeo KGD, os espectros obtidos para os peptídeos RGD e HGD a partir dos experimentos TOCSY e NOESY foram utilizados para o assinalamento dos átomos de hidrogênio (Anexos 9 e 10). Uma parte do espectro TOCSY obtido, mostrando alguns sistemas de spins, também pode ser visto no anexos 11 (peptídeo RGD) e 12 (peptídeo HGD).

Os valores das constantes de acoplamentos medidas a partir do espectro COSY para os peptídeos análogos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Constante de acoplamento $J_{\text{HN-H}\alpha}$ para cada aminoácido dos peptídeos análogos.

Aminoácido	RGD	HGD
	$J_{\text{HN-H}\alpha}$ (Hz)	$J_{\text{HN-H}\alpha}$ (Hz)
1.H	-	-
2.T	7,2	11,2
3.G	6,4 / 7,2	7,2 / 6,4
4.C	9,6	10,4
5.W	8,8	8,8
6.Y	8,8	8,8
7.T	8,0	7,2
8.S	7,2	7,2
9.R/H	15,2	7,2
10.G	6,4 / 8,0	12,0 / 12,8
11.D	9,6	9,6
12.L	8,8	8,8
13.I	8,8	8,8
14.C	9,6	9,6
15.S	10,4	7,2

Foi possível observar para os aminoácidos 4C, 5W, 6Y, 12L, 13I e 14C valores para as constantes próximos de 8,9 Hz, valor característico para uma estrutura em folha β antiparalela.³³ Este dado é coerente quando observado que os peptídeos RGD e HGD, assim como o peptídeo KGD, são peptídeos cíclicos com uma ponte dissulfeto entre os resíduos 4C e 14C.

Pelo experimento de HSQC-editado (^1H - ^{13}C) foi possível assinalar os átomos de carbono dos peptídeos (Anexos 9 e 10). Partes dos espectros HSQC da região alifática e da região aromática também podem ser observados

nos Anexos 13, 14, 15, 16, sendo os dois primeiros referentes ao peptídeo RGD e os dois últimos referentes ao peptídeo HGD.

No espectro NOESY foi possível identificar e assinalar os NOEs existentes entre os átomos de hidrogênio das moléculas. Partes do espectro NOESY, mostrando alguns NOEs de maior relevância, podem ser vistos nos Anexos 17, 18, 19, e 20. Assim como observado para o peptídeo KGD, também foi possível identificar para os peptídeos análogos NOEs existentes entre os resíduos de aminoácidos 4C/14C, 5W/13I e 6Y/12L. Esse fato vai de acordo com o observado anteriormente, pois os peptídeos apresentam uma ponte dissulfeto entre os resíduos 4C/14C, o que torna possível a existência de NOEs entre os resíduos 4C/14C, 5W/13I e 6Y/12L.

2.4.10 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN dos Peptídeos Análogos

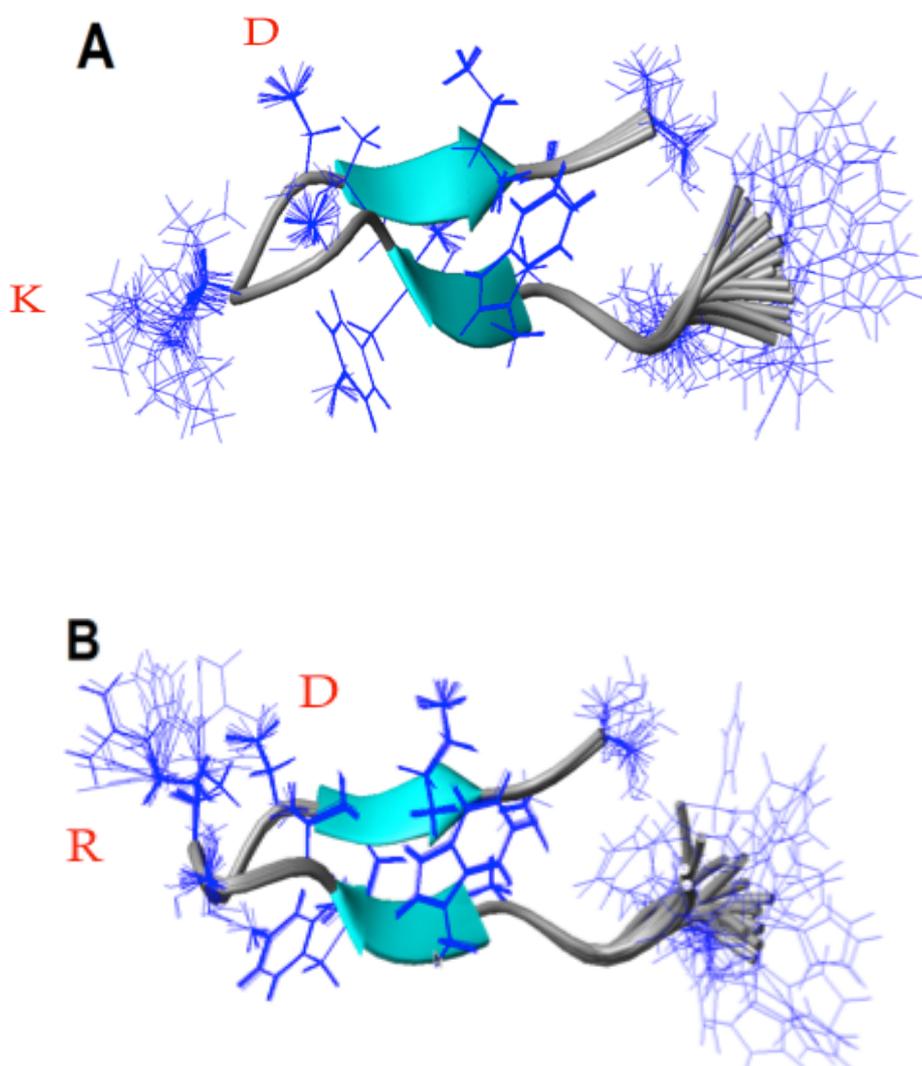
Com os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H_{α} , H_{β} e H_N , juntamente com os assinalamentos dos carbonos C_{α} e C_{β} foi possível calcular os ângulos diedros para os peptídeos RGD e HGD pelo programa TALOS. A lista com os ângulos Φ e Ψ para os dois peptídeos podem ser vistos na Tabela 14.

Tabela 14: Ângulos diedros Φ e Ψ calculados pelo programa TALOS para os peptídeos RGD e HGD.

Aminoácido	RGD		HGD	
	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)
1.H	-	-	-	0
2.T	-95	137	-99	132
3.G	-123	133	-112	140
4.C	-110	147	-148	149
5.W	-133	135	-117	130
6.Y	-123	133	-112	134
7.T	-110	132	-85	167
8.S	-88	108	-63	-30
9.R/H	-130	147	-86	4
10.G	-104	145	-93	-1

11.D	-91	131	-71	126
12.L	-86	122	-83	137
13.I	-121	133	-108	131
14.C	-93	132	-116	139
15.S	-	-	-	-

Os NOEs assinalados pelo espectro NOESY foram convertidos em restrições de distância. Estas restrições de distâncias, juntamente com os ângulos diedros foram os parâmetros utilizados para realizar os cálculos estruturais para os peptídeos análogos. A sobreposição das 20 estruturas de menor energia para cada um dos peptídeos análogos, juntamente com a estrutura calculada para o peptídeo KGD pode ser vista na Figura 60.



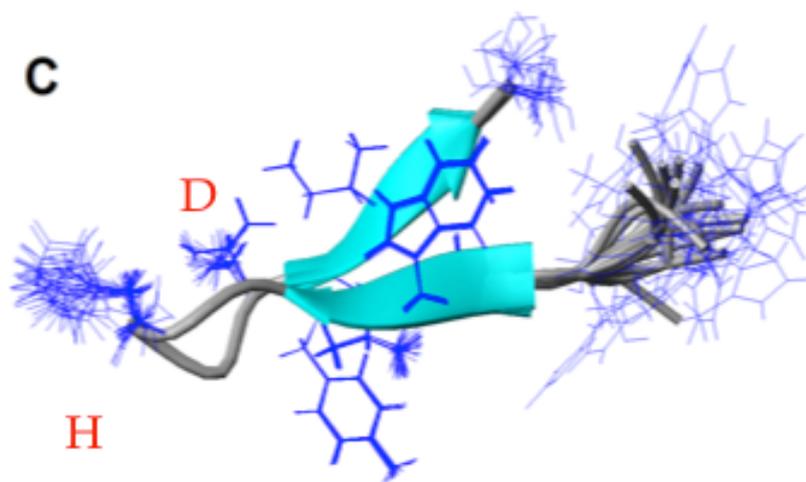


Figura 60: Estruturas calculadas para os peptídeos KGD, RGD e HGD. Sobreposição das 20 estruturas de menor energia para cada peptídeo.

As estruturas calculadas para o peptídeo RGD foram obtidas com 287 restrições de distâncias, uma média de 19,13 NOEs por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para as 20 estruturas foi de 0,579.

As estruturas calculadas para os peptídeos HGD foram obtidas com 298 restrições de distâncias, uma média de 19,86 NOEs por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para as 20 estruturas foi de 0,603.

Os valores de RMSD de 0,579 e 0,603 para os peptídeos RGD e HGD, respectivamente, mostram grande estruturação para peptídeos, fato que pode se justificar pela presença da ponte dissulfeto entre as cisteínas e também pela formação de uma folha β antiparalela na estrutura. O RMSD obtido apresenta um valor alto quando comparado à proteínas, entretanto, para um peptídeo, este é um bom valor tendo em vista a maior mobilidade por ser uma molécula pequena.

Para os peptídeos RGD e HGD, assim como para o peptídeo KGD, foi possível observar a formação, em uma pequena região, de uma estruturação em folha β antiparalela. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos na folha β apresentaram uma melhor estruturação e uma menor mobilidade. Já os resíduos de aminoácidos localizados no *looping* não apresentaram uma boa estruturação, mostrando, com isso, maior mobilidade.

Foi possível também observar para os três peptídeos que as regiões do RGD, HGD e KGD se encontram no *looping* da estrutura, e com isso, esses aminoácidos apresentaram maior flexibilidade. Entretanto as região RGD, HGD e KGD não se localizaram no centro do *loop*, em que o ácido aspártico, mais deslocado do centro, apresentou uma melhor estruturação do que os outros dois resíduos (R ou K ou H e G).

Notou-se que a mudança de um único aminoácido da sequência, de K para R e H, causou mudança na estrutura do peptídeo, principalmente na região do *loop* onde estão presentes as sequências RGD, KGD e HGD. Esta variação de estrutura no *loop* pode gerar mudanças na possível atividade antitrombótica do peptídeo visto que esta região é a responsável pela interação com a integrina.

O gráfico mostrando a quantidade de NOEs utilizados para os cálculos por resíduo de aminoácido, indicando também se o NOE observado foi inter-residual ou de intraresidual, pode ser visto nas Figuras 61 e 62, referentes aos peptídeos RGD e HGD, respectivamente. Foi possível observar que, assim como o peptídeo KGD, a maior quantidade de NOEs ocorreu entre os aminoácidos estruturados em folha β , principalmente os NOEs de longa distância (maior que $i+1$).

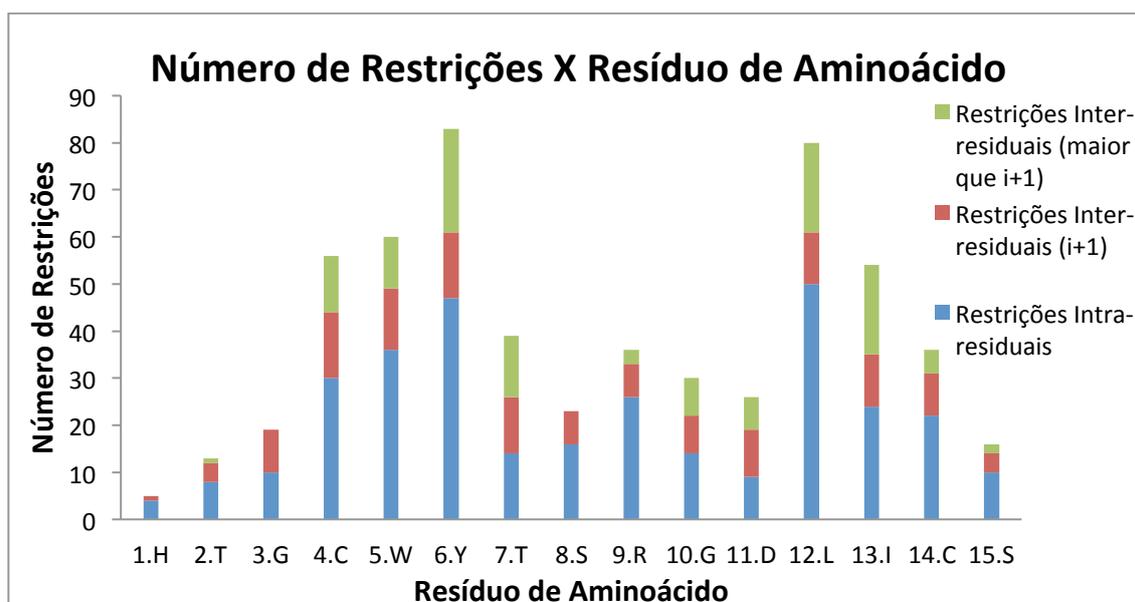


Figura 61: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido para o peptídeo RGD.

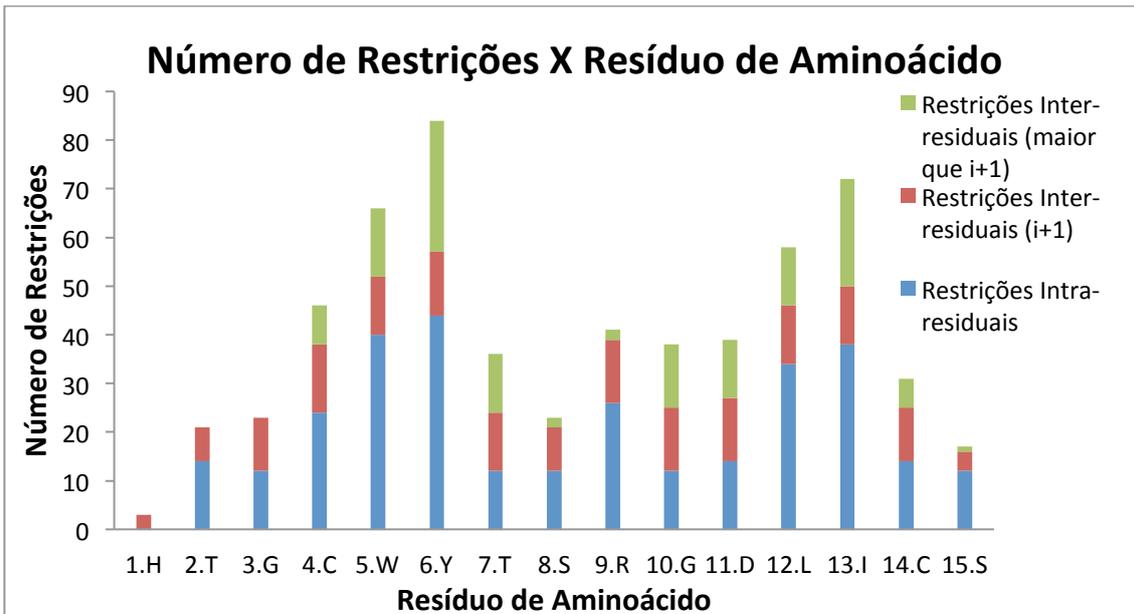


Figura 62: Gráfico de número de restrições por resíduo de aminoácido para o peptídeo HGD.

Também para os peptídeos análogos, realizou-se o cálculo do CSI para o H_α , C_α e C_β para observar a coerência com a estrutura calculada. Os gráficos de CSI para os átomos de H_α , C_α e C_β para o peptídeo RGD podem ser observados nas Figuras 63, 64 e 65, respectivamente. Para o peptídeo HGD esses gráficos são mostrados nas Figuras 66, 67 e 68.

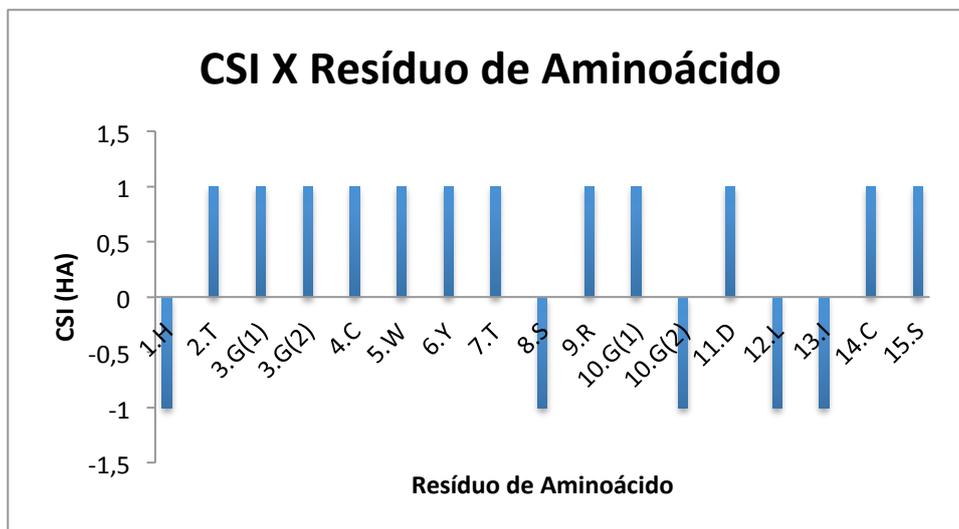


Figura 63: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H_α do peptídeo RGD.

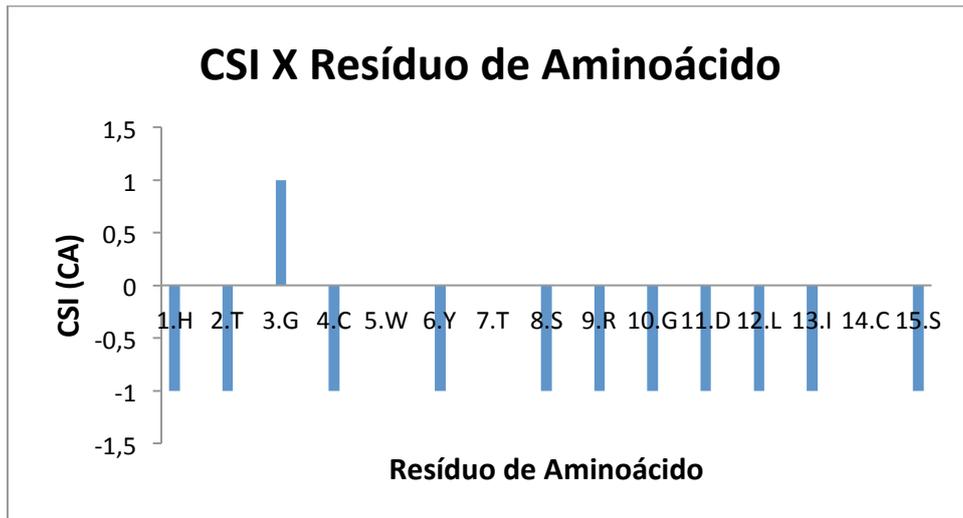


Figura 64: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{α} do peptídeo RGD.

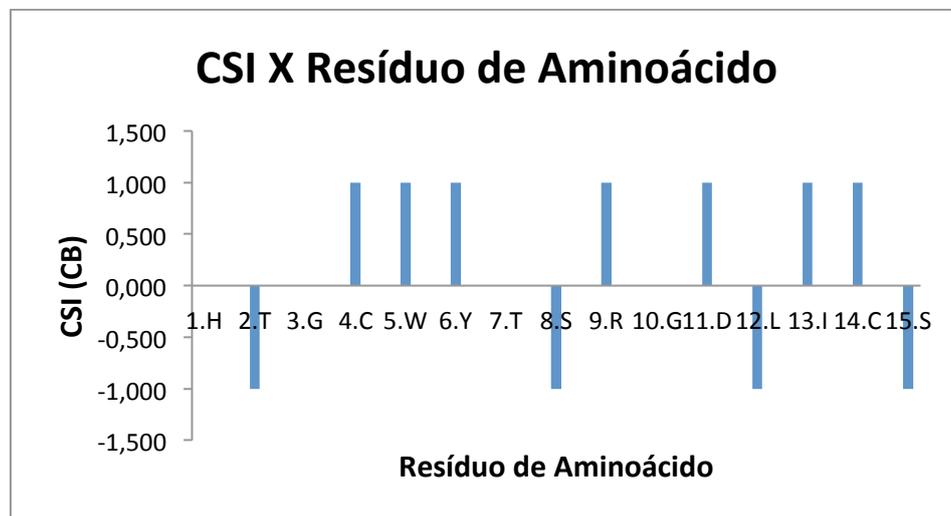


Figura 65: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{β} do peptídeo RGD.

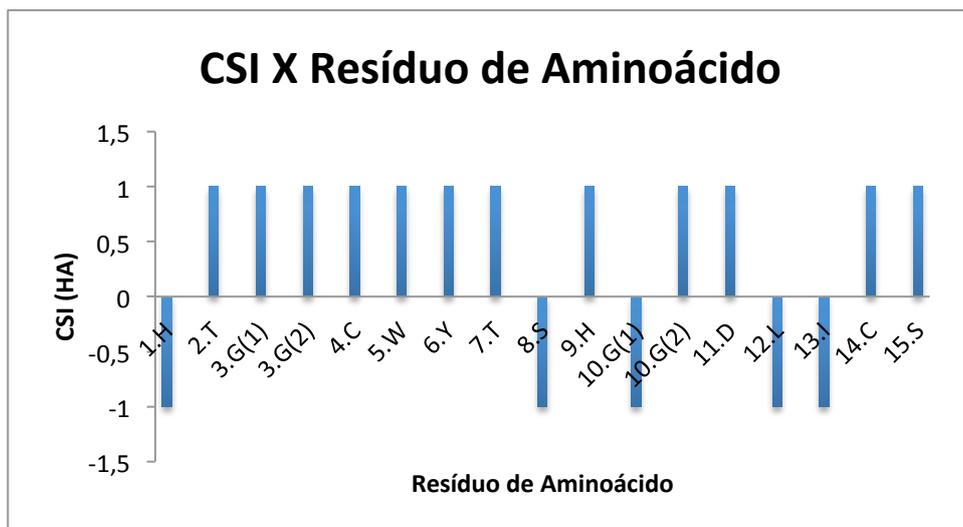


Figura 66: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao H_{α} do peptídeo HGD.

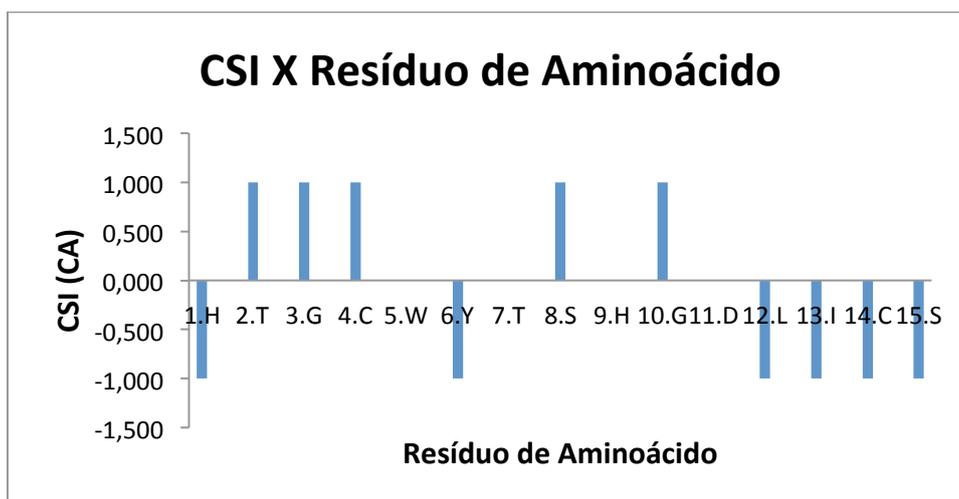


Figura 67: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{α} do peptídeo HGD.

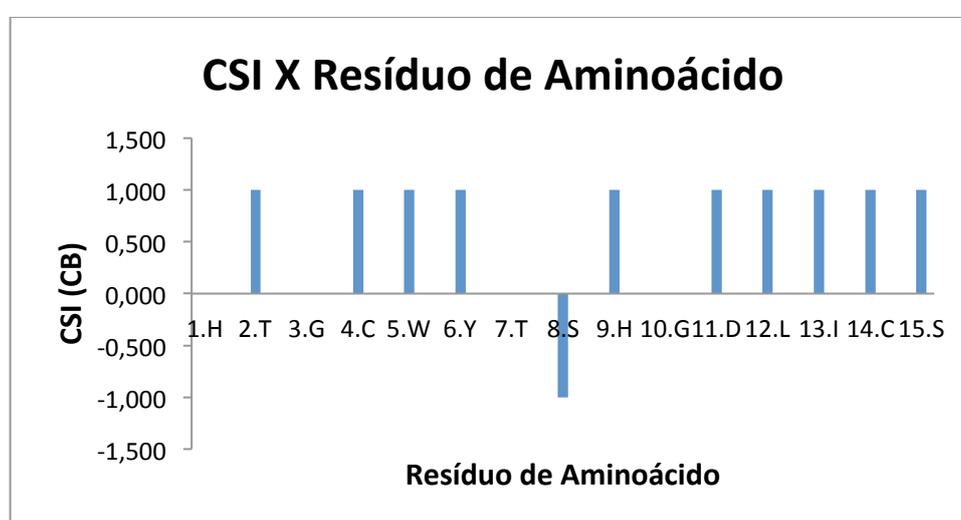


Figura 68: Gráfico de CSI por resíduo de aminoácido, referente ao C_{β} do peptídeo HGD.

Notou-se para os gráficos de CSI referentes ao H_{α} e C_{β} grupos seguidos de resíduos com valores positivos, em especial 4C, 5W e 6Y, o que pode caracterizar uma estrutura em folha β envolvendo estes resíduos, e que concorda com a estrutura calculada e resultado semelhante ao obtido para o peptídeo KGD. Notou-se também para o CSI do C_{β} referente ao peptídeo HGD grupos seguidos de aminoácidos com valores positivos como 12L, 13I e 14C, o que pode reforçar a ideia da presença de uma folha β nessa estrutura, envolvendo estes resíduos.

Para o gráfico referente ao C_{α} foi possível notar grupos seguidos de resíduos com valores negativos, como 12L, 13I e 14C, o que pode caracterizar a estrutura com uma tendência de folha β , envolvendo tais resíduos, e que

também concorda com a estrutura calculada. Este resultado também é semelhante ao obtido para o peptídeo KGD.

Pelos experimentos de TOCSY a diferentes temperaturas (278, 298 e 308 K) foi possível observar a variação do valor do deslocamento químico do hidrogênio amídico para cada resíduo de aminoácido, e com isso, observar possíveis ligações de hidrogênio apresentadas por estes átomos em questão. Os gráficos do coeficiente de temperatura para os hidrogênios amídicos de cada resíduo de aminoácido para os peptídeos RGD e HGD podem ser vistos na Figura 69 e 70, respectivamente.

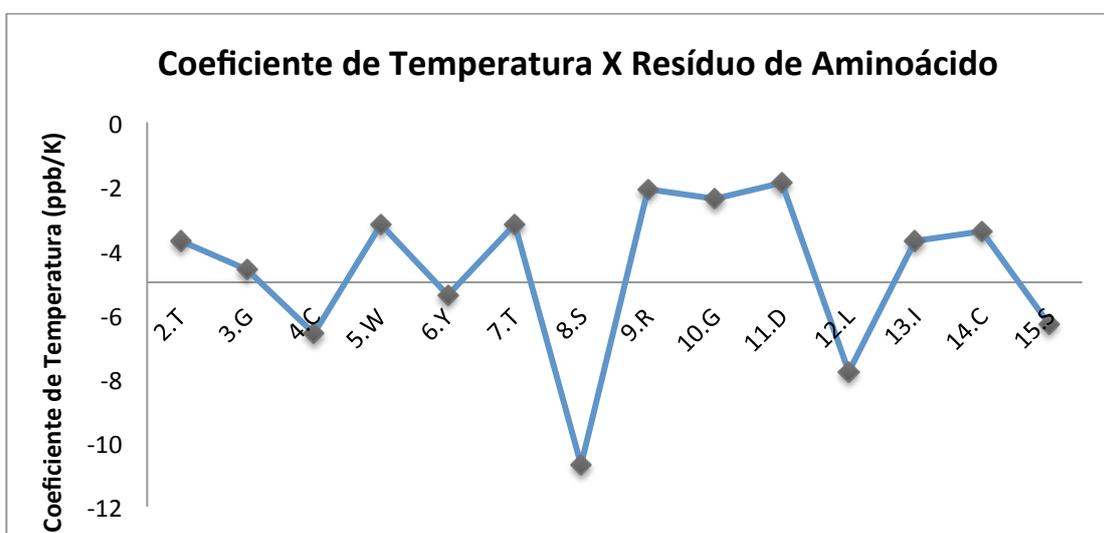


Figura 69: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo RGD.

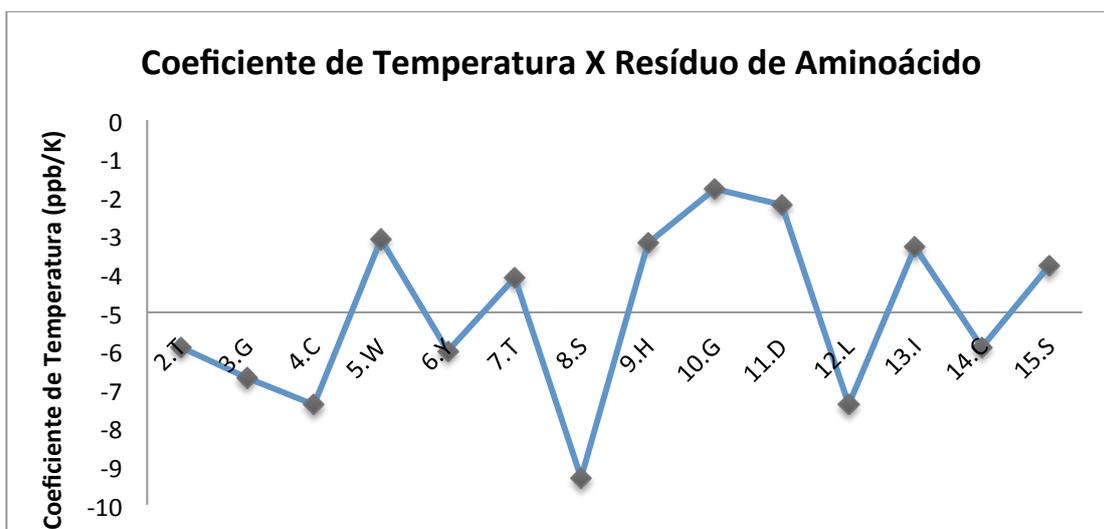


Figura 70: Gráfico do coeficiente de temperatura por resíduo de aminoácido para o peptídeo HGD.

Assim como para o peptídeo KGD, foi possível observar também para os peptídeos análogos valores do coeficiente de temperatura maiores que -5 para os resíduos de aminoácidos 5W, 7T e 13I (o peptídeo RGD também apresentou um valor de coeficiente de temperatura maior do que -5 para o resíduo 14C), o que pode indicar ligações de hidrogênio intramolecular para o H_N. Este fato pode se justificar devido à estruturação em folha β também apresentada pelos peptídeos RGD e HGD. Foram observados também valores de coeficiente de temperatura maiores que -5 para os aminoácidos 9K, 10G e 11D, indicando possíveis ligações de hidrogênio intramolecular para os hidrogênio amídicos desses resíduos, o que se justifica pois estes resíduos também se encontram no *looping* existente em suas respectivas estruturas.

2.4.11 – Teste Biológico dos Peptídeos Análogos: Agregação Plaquetária

Da mesma forma que o peptídeo KGD, apesar dos peptídeos análogos apresentarem algumas características comuns aos peptídeos com motivo de desintegrina, como a presença de cisteínas, ponte dissulfeto, os peptídeos RGD e HGD não apresentaram atividade contra a coagulação plaquetária.

Observou-se que a mudança da sequência de aminoácidos de KGD para RGD não gerou atividade antitrombótica, mostrando que a ausência de atividade não ocorreu devido à presença ou ausência da arginina. Uma possível justificativa para a ausência da atividade é as sequências KGD, RGD e HGD não estarem localizadas no centro do *loop*, o que não causaria a devida exposição destes aminoácidos essenciais para interagir com as interginas.

Uma comparação da região RGD do peptídeo RGD com a região RGD de proteínas com ação antitrombótica (motivo de desintegrina) pode ser vista na Figura 71.

Pela Figura 71 foi possível observar que a região RGD de proteínas com ação antitrombótica não apresenta um padrão definido. Mesmo assim, a região do RGD do peptídeo estudado apresentou uma estrutura diferente quanto comparada com as demais proteínas com atividade.

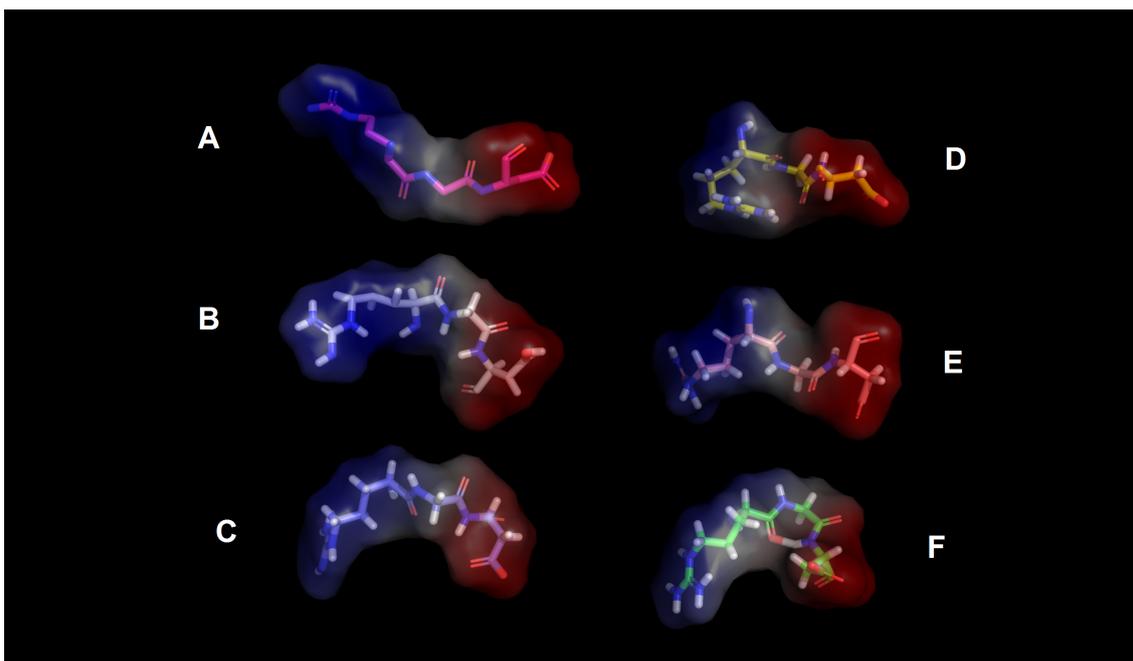


Figura 71: Comparação da região RGD de proteínas com ações antitrombóticas com o peptídeo RGD: (A) Proteína Flavonidina, (B) Proteína Echistatina, (C) Proteína Kistrina, (D) Proteína Salmosina, (E) Proteína Rhodostomina e (F) Peptídeo RGD.

2.4.12 – Teste Biológico: Inibição de Tripsina

O teste de inibição da tripsina foi realizado devido à similaridade na sequência de aminoácidos dos peptídeos KGD, RGD e HGD com inibidores desta enzima. Na Tabela 15 é possível observar a sequência de aminoácidos do peptídeo KGD e também de outros peptídeos inibidores da Tripsina.

Tabela 15: Sequência de aminoácidos para os peptídeos KGD, RGD e HGD, e outros peptídeos inibidores de tripsina.¹¹²⁻¹¹⁴

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
Peptídeo KGD	HTGCWYTSKGD LICS
Peptídeo RGD	HTGCWYTSRGD LICS
Peptídeo HGD	HTGCWYTSHGDLICS
Inibidor 1	LKGCWTKSIPP KPCF
Inibidor 2	AALKGCWTKSIPP KPCFGF
Inibidor 3	CAPKGCWTKSYPP QPCS
Inibidor 4	SALVGCWTKSWPP KPCFGRG

As estruturas tridimensionais dos peptídeos KGD, RGD e HGD não foram comparadas com as estruturas tridimensionais dos inibidores de tripsina citados acima pois as estruturas em PDB destes não estavam disponibilizadas.

Nenhum dos três peptídeos (KGD, RGD e HGD) apresentou atividade biológica de inibição de tripsina.

2.5 – Conclusão

Pela síntese dos peptídeos em fase sólida, juntamente com a etapa de purificação foi possível obter maiores quantidades destas biomoléculas, o que viabilizou determinar as estruturas tridimensionais das mesmas e também realizar ensaios biológicos.

A Espectrometria de Massa possibilitou caracterizar os peptídeos sintéticos e também caracterizar as frações observadas no processo de purificação para identificar as frações de interesse.

Como todos os peptídeos apresentavam duas cisteínas, era possível encontrar os mesmos nas formas reduzida e oxidada. Foi observado uma tendência dos peptídeos em serem oxidados pelo próprio oxigênio do ar e em solução. Com isso, foi relativamente simples se obter os peptídeos em questão nas formas cíclicas.

A Ressonância Magnética Nuclear, juntamente com os cálculos de mecânica molecular possibilitaram determinar as estruturas tridimensionais dos três peptídeos. Notou-se que a mudança de apenas um resíduo de aminoácido na sequência causou variações estruturais, principalmente na região do *looping*, entretanto, as três estruturas tendem a formar uma região de folha β antiparalela.

Observou-se que os resíduos de aminoácidos que estão envolvidos em uma possível região de folha β apresentaram maior quantidade de NOEs do que os resíduos fora desta região. Os cálculos do CSI indicaram uma possível estruturação em folha β , fato que vai de acordo com as estruturas elucidadas por RMN e cálculos de mecânica molecular. Outro fator que também vai de acordo com as estruturas obtidas é o coeficiente de temperatura, que evidencia possível formação de uma folha β .

Notou-se que apesar dos peptídeos estudados apresentarem algumas características comuns com as desintegrinas, estes não apresentaram atividade antitrombótica. As regiões KGD e RGD dos peptídeos em questão apresentaram uma estrutura diferente das mesmas regiões de proteínas com atividade antitrombótica.

Embora os peptídeos estudados apresentem estrutura primária semelhante a outros peptídeos inibidores de tripsina, eles não foram capazes de inibir a ação dessa enzima.

Capítulo III

Influência de Zn(II), Cd(II) e CO₂ na Estrutura de um Hexapeptídeo em Solução

3.1 – Introdução

A pele de anfíbios apresenta papel fundamental na respiração, transporte de água e solutos e na regulação osmótica,¹¹⁵ sendo um órgão onde podem ser encontrados diversos compostos biologicamente ativos, desde compostos reguladores de funções fisiológicas a compostos que agem contra predadores e micro-organismos.¹¹⁶

Por esse motivo, a pele de anfíbios pode estar em contato direto com vários metais e gases, como é o caso do CO₂ e O₂ que, por estarem envolvidos na respiração, estão em contato direto com esse órgão.¹¹⁵ O mesmo pode ocorrer com alguns metais essenciais para o bom funcionamento do sistema biológico, como Fe, Mn, Co, Cu, Ca, dentre outros.¹¹⁷ Metais contaminantes e, portanto, não-essenciais para o bom funcionamento do sistema biológico como Pb, Cd e Hg também podem estar em contato com a pele desses animais.¹¹⁷

Neste órgão também é possível encontrar diversos peptídeos com diferentes atividades farmacológicas. Tais peptídeos podem ser efetivos no auxílio do sistema biológico, bem como das linhas de defesa do anfíbio contra micro-organismos.¹¹⁶ Uma grande variedade de peptídeos antibióticos de diferentes espécies de anfíbios já foram isolados e caracterizados¹¹⁶ e tem sido mostrado que a presença de diversos metais e gases pode influenciar a estrutura desses peptídeos, interferindo em suas respectivas atividades.

Peptídeos ricos em histidinas podem apresentar maior afinidade por metais,^{118,119} uma vez que o anel imidazólico presente na cadeia lateral da histidina pode possibilitar a ligação do peptídeo com metais, como Zn e Cd.¹²⁰⁻¹²²

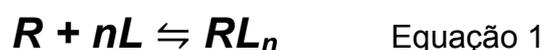
Peptídeos ricos em aminoácidos com características básicas, como histidina (H), lisina (K) e arginina (R) podem apresentar maior afinidade por CO₂.¹²³ Este gás pode se ligar a aminoácidos básicos por ligações de hidrogênio,¹²⁴ sendo as interações ácido/base as principais forças químicas para explicar as interações de peptídeos com CO₂.¹²⁵

A interação do CO₂ com um resíduo de aminoácido pode aumentar a polarização do átomo de carbono, deixando este mais eletrofílico e, portanto, mais reativo.¹²⁴ Este fato pode ser de extrema importância para o bom

funcionamento de alguns sistemas biológicos uma vez que pode propiciar a ocorrência de novas reações.

Estudos de afinidade de peptídeos com metais são importantes para avaliar a especificidade de um metal pela biomolécula e também avaliar possíveis mudanças no sistema biológico no qual o peptídeo e o metal estão inseridos.¹²⁶ Interações metal/peptídeo podem fornecer informações sobre processos de transporte do metal e também de como e por onde o metal pode se ligar à biomolécula.¹²⁶

Um modo de estudar a afinidade de um ligante por uma proteína ou um peptídeo pode ser pela equação de Hill.² Essa equação foi inicialmente e empiricamente utilizada para estudar e descrever a interação do oxigênio com a hemoglobina.² Posteriormente foi então adaptada para ser utilizada em estudos de biomoléculas para analisar a ligação e a interação de um ligante com um determinado receptor.¹²⁷ A ligação de um receptor (como, por exemplo, uma proteína ou um peptídeo) com um ligante (como zinco ou cádmio) pode ser descrita pela Equação 1,³ em que R é o receptor, L é o ligante em estudo e n é o número de ligantes.



Para a equação 1 é possível calcular a constante de formação (K_a) para o complexo RL_n assim como a constante de dissociação (K_d) que são, na verdade, as constantes que descrevem o equilíbrio (Equações 2 e 3).³

$$K_a = \frac{[RL_n]}{[R].[L]^n} \quad \text{Equação 2}$$

$$K_d = \frac{[R].[L]^n}{[RL_n]} \quad \text{Equação 3}$$

Por um rearranjo matemático, θ (fração de sítios ocupados onde o ligante pode se ligar ao receptor da proteína) é dado pela Equação 4,³ e a equação de Hill pode ser descrita também pela Equação 5.³

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \quad \text{Equação 4}$$

$$\log \left(\frac{\theta}{1 - \theta} \right) = n \log [L] - \log K_d \quad \text{Equação 5}$$

Na equação de Hill, o valor de n , chamado de coeficiente de Hill, pode ser utilizado para determinar o número de ligantes que se ligam ao receptor. Entretanto, na prática, esse coeficiente é mais apropriado para fornecer informações sobre a cooperatividade do que sobre o próprio número de ligantes em si.¹²⁸ Um valor de n maior do que 1 indica uma cooperatividade, isto é, após um ligante se ligar ao receptor, esta ligação facilita a ligação de um segundo ligante, caso haja um segundo sítio de ligação.²

Pela equação Hill também é possível calcular a afinidade de um ligante por um receptor pela constante de dissociação (K_d). Para ilustração, peptídeos que apresentam grandes afinidades por metais, como Zn, apresentam um K_d na ordem de grandeza de 10^{-9} M,¹²⁹ enquanto que para peptídeos com afinidade moderada, os valores de K_d são da ordem de 10^{-4} M.¹³⁰

3.2 – Objetivos

- Sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo extraído do anfíbio *Phyllomedusa centralis*.
- Estudar possíveis interações do peptídeo com metais e gases por Espectrometria de Massa e RMN-1D.
- Determinar a estrutura tridimensional do peptídeo extraído do anfíbio *Phyllomedusa centralis* e também do peptídeo em contato com zinco, cádmio e dióxido de carbono utilizando RMN e cálculos de mecânica molecular.
- Localizar possíveis sítios de interação do peptídeo pelo Zn, Cd e CO₂.
- Calcular as constantes de afinidade do peptídeo pelo Zn(II) e Cd(II).
- Comparar as mobilidades iônicas do peptídeo livre com o peptídeo em contato com zinco e cádmio por Mobilidade Iônica acoplado a Espectrometria de Massa.

3.3 – Metodologia

3.3.1 - Extração da Secreção Cutânea e Identificação do Peptídeo

A secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa centralis* (Figura 72), foi obtida por estímulos elétricos moderados (6 V) das glândulas dermais. O extrato bruto foi recolhido e coletado com água Milli-Q, filtrado com o auxílio de um papel de filtro, congelado e liofilizado.¹³¹

Depois de seco, o extrato bruto foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna semi-preparativa C18 (Vydac 218 TP 510). As frações coletadas foram congeladas e liofilizadas.¹³²

Em continuidade, as frações coletadas foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker) para identificar a presença e caracterizar peptídeos com possíveis atividades biológicas. Realizaram-se espectros de MS e MS/MS, utilizando o método *de novo* de sequenciamento para identificar os peptídeos presentes nas frações do extrato bruto.^{133,134}

Os procedimentos de extração da secreção cutânea, identificação e caracterização do peptídeo foram realizados pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Carlos Bloch Jr (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

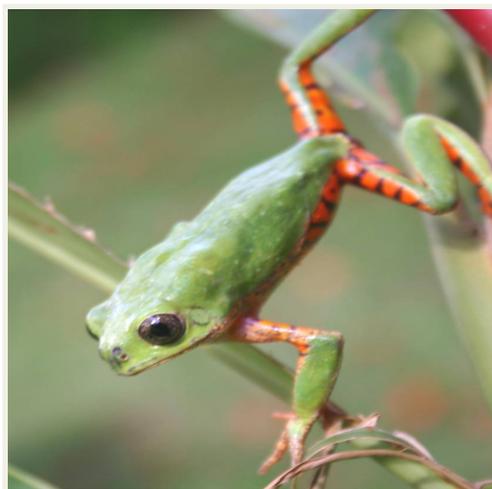


Figura 72: Foto do anfíbio *Phyllomedusa centralis* (Foto fornecida pelo Professor Dr. Luciano Paulino da Silva – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

3.3.2 – Síntese do Peptídeo em Fase Sólida

Para obter uma maior quantidade de peptídeo objetivando estudos estruturais e observar possíveis afinidades desse peptídeo por metais e gases, realizou-se a síntese do peptídeo, HRFLRH-NH₂, em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc/*t*-butil.⁷³⁻⁷⁵

A metodologia empregada para realizar esta síntese foi a mesma utilizada para sintetizar os peptídeos anteriormente descritos (Capítulo II), em que primeiramente ocorre a desproteção (retirada do grupo Fmoc) seja da resina para acoplar o primeiro aminoácido ou do aminoácido já acoplado e, em seguida, adiciona-se 0,4 mmol do aminoácido a ser acoplado, 0,4 mmol de HBTU (156 mg), 0,8 mmol de DIPEA (132 µL) e 1,5 mL de DMF, sempre com 1h30 de reação. Esse procedimento foi empregado para acoplar todos os aminoácidos da sequência.

Uma tabela com os aminoácidos utilizados na síntese, mostrando seus grupos protetores permanentes e temporários, a massa utilizada e também a massa molecular de cada aminoácido estão listados na Tabela 16.

Tabela 16: Massa molecular (MM) dos aminoácidos utilizados com seus respectivos grupos protetores temporários (Fmoc) e permanentes (Trt e Pbf) e massa, em gramas, para 0,4 mmol.

Fmoc-aminoácidos	MM (g/mol)	Massa para 0,4 mmol (mg)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	259,5
Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	247,8
Fmoc-Leu-OH	353,4	141,3
Fmoc-Phe-OH	387,4	154,9

Para concluir o processo da síntese, procedeu-se à clivagem do peptídeo sintético, similar ao que foi descrito no Capítulo 2 para o peptídeo KGD e seus análogos.

Com o auxílio de uma filtração a vácuo, lavou-se o peptídeo clivado com éter gelado. Em seguida, o peptídeo foi extraído com 50 mL de água e depois com 50 mL de uma solução água/acetonitrila 1:1. As soluções contendo o peptídeo sintético foram recolhidas em tubos de 50 mL, congeladas e, por fim, liofilizadas.

3.3.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético

O peptídeo sintetizado foi caracterizado por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex III, Bruker). Espectros de MS e MS/MS foram obtidos.

O equipamento foi calibrado com um calibrante externo próprio para peptídeos (Peptide Calibration Standard – Starter Kit, Tubo 4, Bruker). As análises foram feitas misturando o peptídeo em uma solução saturada de matriz (5 mg de Matriz, 200 µL de H₂O, 500 µL de ACN e 50 µL de TFA (3%)) constituída pelo ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico e em seguida, essa mistura foi depositada em duplicata sobre uma placa, própria para o equipamento. A proporção utilizada de peptídeo para matriz foi de 1:3.⁸⁰

Os espectros de massa foram adquiridos no método refletido/positivo para tentar observar a massa esperada do peptídeo. Adquiriram-se também espectros de MS/MS pela fragmentação dos íons precursores utilizando argônio como gás de colisão para caracterizar a sequência de aminoácidos do peptídeo.⁸¹

3.3.4 – Purificação do Peptídeo Sintético

Realizou-se a purificação da amostra por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Shimadzu) com um espectrofotômetro como detector. As análises foram feitas com monitoramento em 216 e 280 nm.⁸²

Utilizou-se uma coluna semi-preparativa C18 (Vydac 218TP510) com um fluxo de 2,5 mL/min e um gradiente de eluição com água Milli-Q e acetonitrila como solventes, ambos com 0,1 % de TFA.^{83,84} O gradiente de eluição está descrito na Tabela 17.

Tabela 17: Gradiente de eluição para a purificação por HPLC.

Tempo (min)	Porcentagem de Acetonitrila (%)
0	5
5	5
25	35
45	60
50	95
60	95

As frações observadas no cromatograma foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa do tipo Q-TOF (microTOF-QII, Bruker) para descobrir a fração de interesse, referente ao peptídeo sintético. O material coletado no fracionamento foi congelado e liofilizado.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas utilizando apenas água Milli-Q como solvente, uma voltagem no capilar de 4,5 kV e um fluxo de 2,0 µL/min. Para a calibração, utilizou-se um calibrante externo próprio para ionização do tipo eletrospray (ESI) e peptídeos, ESI-Tuning Mix (Agilent Technologies). A solução para calibrar o equipamento foi preparada utilizando 500 µL do calibrante, 10 µL de ACN e 10 µL de H₂O.

3.3.5 – Experimentos de Espectrometria de Massa

Foram realizados experimentos de Espectrometria de Massa do peptídeo puro em contato com esses metais e também com o dióxido de carbono em um espectrômetro do tipo Q-TOF (microTOF-QII, Bruker).

As análises foram realizadas utilizando apenas água Milli-Q como solvente, uma voltagem no capilar de 4,5 kV e um fluxo de 2,0 µL/min. Para a calibração, utilizou-se um calibrante externo próprio para ionização do tipo eletrospray (ESI) e peptídeos, ESI-Tuning Mix (Agilent Technologies). A solução para calibrar o equipamento foi preparada utilizando 500 µL do calibrante, 10 µL de ACN e 10 µL de H₂O.

Os experimentos foram realizados com o peptídeo a uma concentração de 2 mM. Foram utilizados os sais ¹¹³CdCl₂ (98,9% de ¹¹³Cd) e ZnCl₂.

Preparou-se duas soluções desses sais, ambas com a proporção de 1:1. As soluções foram submetidas à análise por Espectrometria de Massa.

Para a análise de interação com CO₂, o gás foi borbulhado por cerca de 40 minutos em uma solução do peptídeo puro a uma concentração de 2 mM. A solução foi deixada em repouso e em contato com o ar por cerca de 2 horas. Em seguida, foram analisadas por Espectrometria de Massa.

3.3.6 – Experimentos de RMN (1D)

Os experimentos de ressonância magnética nuclear em uma dimensão (RMN-1D) foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (90%/10%) como solvente e um volume de 0,6 mL de solução. A concentração da solução de peptídeo utilizada em todos os experimentos foi de 2 mM.

Inicialmente, mediu-se o pH do peptídeo livre a uma concentração de 2mM em um volume de 0,6 mL. O espectro de RMN-¹H foi adquirido utilizando-se os parâmetros listados na Tabela 18. Para a supressão do sinal da água foi utilizada a técnica *excitation sculpting*.⁸⁶

Tabela 18: Parâmetros de aquisição dos experimentos de RMN-¹H (TD = *time domain*; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = *dummy scans*; SW = janela espectral e o1 = centro da janela espectral).

Experimento	Parâmetros	Valor
RMN- ¹ H	TD	4096
	NS	8
	DS	1
	SW	16,01 ppm
	o1	4,7 ppm

Para os estudos de interação com os metais, foram utilizadas soluções do peptídeo à concentração de 2 mM e os sais CdCl₂ e ZnCl₂ a uma proporção de 1:1 de peptídeo/metálico. O pH das soluções foi medido antes e depois da aquisição dos espectros de RMN a uma dimensão.

O mesmo procedimento foi adotado para estudos com o peptídeo em contato com CO₂ e O₂. As soluções com os gases foram preparadas borbulhando-se CO₂ e O₂ em 0,6 mL de uma solução do peptídeo a 2 mM por cerca de 40 minutos.

Os dados de aquisição para os experimentos de ¹H-RMN para as soluções contendo o peptídeo livre, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II), peptídeo + CO₂ e peptídeo + O₂ foram os mesmos já descritos na Tabela 18.

Realizou-se também experimentos de RMN de hidrogênio para o peptídeo em diferentes valores de pH. Os experimentos foram realizados com 0,6 mL da solução do peptídeo a 2 mM e o valor do pH foi ajustado com uma solução de NaOH 10 mM. Os espectros de ¹H-RMN foram adquiridos com os mesmos parâmetros listados anteriormente na Tabela 18, nos seguintes valores de pH: 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,8; 5,2; 5,5 e 5,9.

3.3.7 – Experimentos de RMN-2D

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (90%/10%) como solvente, e se trabalhou com as amostras de peptídeo sempre a uma concentração de 2 mmol/L em um volume de 0,6 mL.

Adquiriu-se os espectros TOCSY, HSQC (¹H-¹³C) e ROESY. Utilizou-se o sinal da H₂O a 298 K em 4,773 ppm para referenciar os espectros. Os parâmetros de aquisição destes experimentos podem ser observados na Tabela 19. O experimento de HSQC foi dividido em região aromática e região alifática. No HSQC alifático utilizou-se uma janela espectral de 80 ppm e 39 ppm como o centro da janela; no HSQC aromático utilizou-se uma janela espectral de 30 ppm e 130 ppm como o centro da janela. O experimento de HSQC adquirido foi um HSQC editado. O experimento TOCSY foi adquirido utilizando a sequência MLEV para spin-lock⁸⁵ e a técnica *excitation sculpting* para eliminação do sinal da água.⁸⁶ Todos os experimentos foram adquiridos no modo sensível à fase.

Tabela 19: Dados de aquisição para os experimentos de RMN 2D.

Experimentos	Parâmetros	F1	F2
TOCSY	TD	4096	512
	NS	24	
	DS	512	
	SW	10,99 ppm	
	o1	4,7 ppm	
	Mixing Time	60 ms	
HSQC alifático	TD	1024	128
	NS	128	
	DS	512	
	SW	10,99 ppm	80 ppm
	o1	4,7 ppm	39 ppm
HSQC aromático	TD	1024	64
	NS	96	
	DS	512	
	SW	10,99 ppm	30 ppm
	o1	4,7 ppm	130 ppm
ROESY	TD	4096	512
	NS	32	
	DS	512	
	SW	10,99 ppm	
	o1	4,7 ppm	
	Mixing Time	300 ms	

Foram utilizados os valores de 60 ms e 300 ms para os experimentos de TOCSY e ROESY, respectivamente.

Os experimentos de RMN 2D foram adquiridos para as soluções contendo o peptídeo livre, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II), peptídeo + CO₂ e peptídeo + O₂. Os experimentos 2D foram realizados imediatamente após a aquisição dos experimentos 1D, com as mesmas soluções utilizadas para os experimentos de RMN de hidrogênio. Após a aquisição dos espectros 2D, o pH das soluções foi novamente medido para verificar possíveis variações de acidez durante a realização dos experimentos mais longos (2D).

Os FIDs obtidos foram processados utilizando-se os programas NMRPipe e NMRDraw;⁸⁷ o programa NMRView 5.0⁸⁸ foi utilizado para assinalar os espectros. Para o processamento, a função *cosine-bells* foi aplicada em cada dimensão; uma função polinomial foi aplicada para correção da linha base. Os ajustes de fase foram realizados manualmente utilizando o programa NMRDraw.

3.3.8 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN

Os cálculos estruturais foram realizados utilizando parâmetros obtidos por experimentos de RMN através do programa CNS_Solve^{89,90} (método de simulated annealing). Os volumes dos ROEs assinalados pelo espectro de ROESY foram integrados e convertidos em restrições de distância: 2,8, 3,5 e 5,0 Å para intensidades fortes, médias e fracas, respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos átomos H_{α} , H_{β} , C_{α} , C_{β} e H_N foram utilizados para calcular os ângulos diedro pelo programa TALOS.⁹¹ As restrições de distâncias e os ângulos diedro foram utilizados como restrições para os cálculos e determinação da estrutura do peptídeo nos diferentes meios. Foram calculadas 200 estruturas. As estruturas calculadas foram visualizadas pelo programa MOLMOL⁹² e as 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) foram sobrepostas. Calculou-se o RMSD para estas 20 estruturas sobrepostas também pelo programa MOLMOL.

Para calcular a constante de afinidade do peptídeo pelo Zn e pelo Cd e também observar variações nos valores de alguns deslocamentos químicos adquiriu-se vários espectros de RMN-¹H com diferentes proporções de peptídeo/metálico.

Todos os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (90%/10%) como solvente e um volume de 0,6 mL de solução. A concentração inicial de peptídeo foi de 2 mM.

Adquiriu-se inicialmente o espectro de RMN de hidrogênio para o peptídeo livre (proporção de 4:0 peptídeo:metal). Em seguida foram adquiridos espectros para cada incremento do metal na solução com o peptídeo (proporção de 4:1, 4:2, 4:3, 4:4 até 4:10 peptídeo:metal). Para eliminação do

sinal da água foi utilizada a técnica *excitation sculpting*.⁸⁶ Os parâmetros de aquisição para todas as soluções foram os mesmos e estão listados na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros de aquisição dos experimentos de ¹H-RMN.

Experimento	Parâmetros	Valor
¹ H-RMN	TD	4096
	NS	64
	DS	16
	SW	16,01 ppm
	o1	4,7 ppm

3.3.9 – Experimentos de Mobilidade Iônica

Os experimentos de Mobilidade Iônica acoplado com Espectrometria de Massa foram realizados em um equipamento Synapt HDMS (Water). Procedeu-se às análises do peptídeo livre (1 mM), peptídeo + Cd(II) (1mM e proporção 1:1) e peptídeo + Zn(II) (1mM e proporção 1:1). Utilizou-se CdCl₂ e ZnCl₂ para o preparo das solução e acrescentou-se 50% (v/v) de acetonitrila.

Empregou-se um fluxo de 1 µL/min, a voltagem no capitar de 2,6 kV, célula de hélio com 176,5 psi, célula de mobilidade iônica (IMS) 95,2 psi e uma energia de colisão de 6 eV para os espectros de MS/MS.

Adquiriu-se os espectros de Mobilidade Iônica para o peptídeo livre, peptídeo + Cd(II) e peptídeo + Zn(II). Também foram adquiridos espectros de MS/MS dos íons referentes ao peptídeo + Zn(II) e peptídeo + Cd(II).

3.4 – Resultados e Discussão

3.4.1- Extração da Secreção Cutânea e Identificação do Peptídeo

Pelas análises da secreção cutânea foi possível identificar um hexapeptídeo que apresenta a sequência de aminoácidos HRFLRH-NH₂. Por possuir aminoácidos com características básicas ao longo de sua sequência (histidina e arginina), este peptídeo pode interagir com CO₂ ou metais, como zinco (Zn) e cádmio (Cd) por ligações de hidrogênio ou por interações do tipo ácido-base.¹²⁵ Todas as análises realizadas para esse peptídeo levam em consideração essa hipótese.

3.4.2 - Síntese do Peptídeo em Fase Sólida

Para realizar a síntese do hexapeptídeo, utilizou-se os aminoácidos histidina e arginina com as cadeias laterais protegidas, respectivamente, com os grupos Trt e Pbf, enquanto que a leucina e a fenilalanina não apresentavam grupos protetores para as cadeias laterais. Histidina e arginina, por não possuírem apenas grupos alquila em suas cadeias laterais, devem conter protetores permanentes nos grupos funcionais das cadeias laterais para evitar reações indesejadas ao longo da síntese e, por consequência, leucina e fenilalanina por apresentarem apenas grupos alquila em suas cadeias laterais não necessitam de grupos protetores.⁷³ Esses grupos protetores também devem ser removidos no processo de clivagem, juntamente com a resina, análogo ao que foi descrito no capítulo 2 para o peptídeo KGD e seus análogos RGD e HGD.

Na clivagem do hexapeptídeo não foi necessário utilizar tioanisol, fenol e EDT devido à ausência de triptofano e cisteína na sequência de aminoácidos do peptídeo. Utilizou-se 2,5% de TIS na clivagem devido à presença do grupo protetor tritil na histidina, em que a retirada do grupo Trt é um processo reversível e o TIS evita que o Trt se ligue novamente a histidina.⁷³

3.4.3 – Caracterização do Peptídeo Sintético

A massa esperada, $[M+H]^+$, para o hexapeptídeo sintetizado é de 864,48 Da, e o espectro de massa (MS) obtido pode ser observado na Figura 73. Pelo espectro, foi possível notar a presença do íon com a massa esperada para o peptídeo, juntamente com outros valores de massa não esperados e não desejados, fato esse que justifica a necessidade de realizar uma purificação da amostra para retirar os subprodutos indesejados gerados ao longo da síntese ou no processo de clivagem.

Para confirmar que o íon observado no espectro era de fato o peptídeo sintetizado, procedeu-se à sua fragmentação (espectro de MS/MS, Figura 74). Pelas fragmentações, foi possível sequenciar o peptídeo utilizando as séries y e b, observando a sequência desejada, o que confirmou que a massa observada refere-se ao peptídeo sintetizado. A determinação da sequência do peptídeo pode ser feita pela diferença de massa entre picos vizinhos em uma mesma série de íons.¹⁹

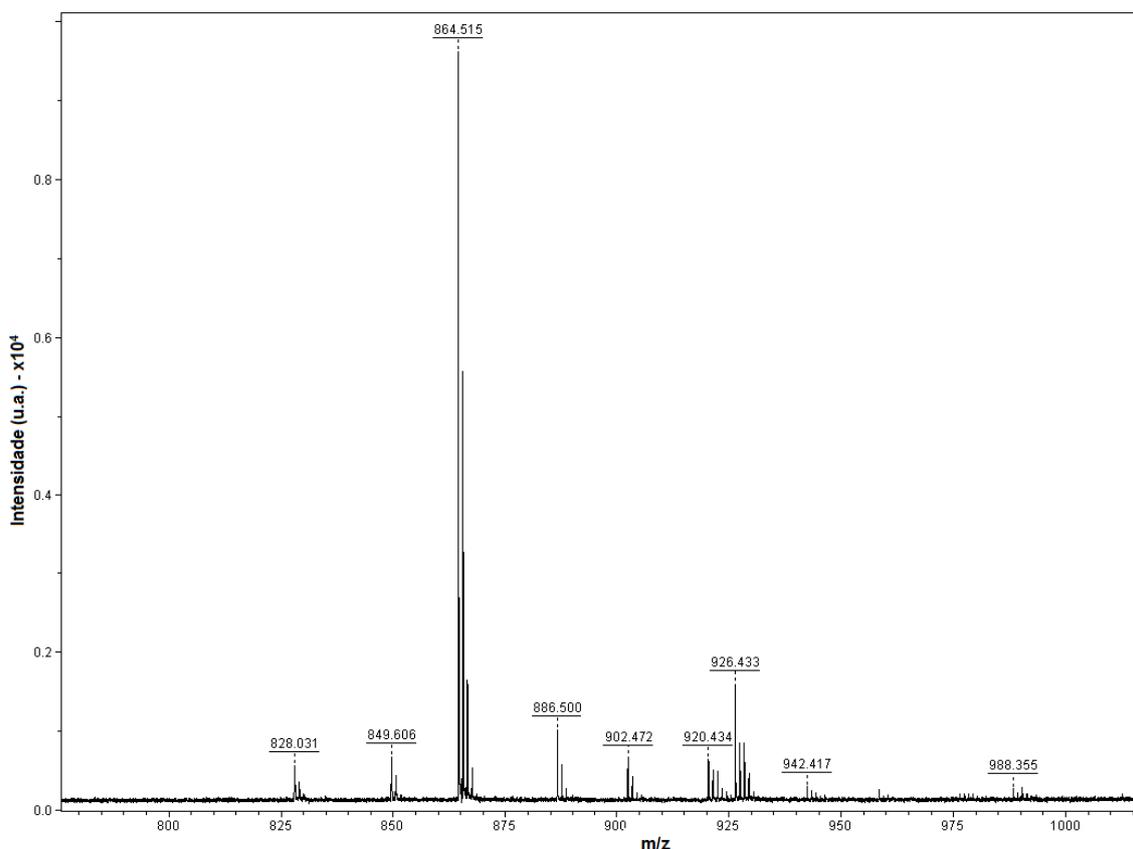


Figura 73: Espectro de Massa do hexapeptídeo (sem purificação). Presença da massa referente ao peptídeo com carga simples ($[M+H]^+ = 864,51$)

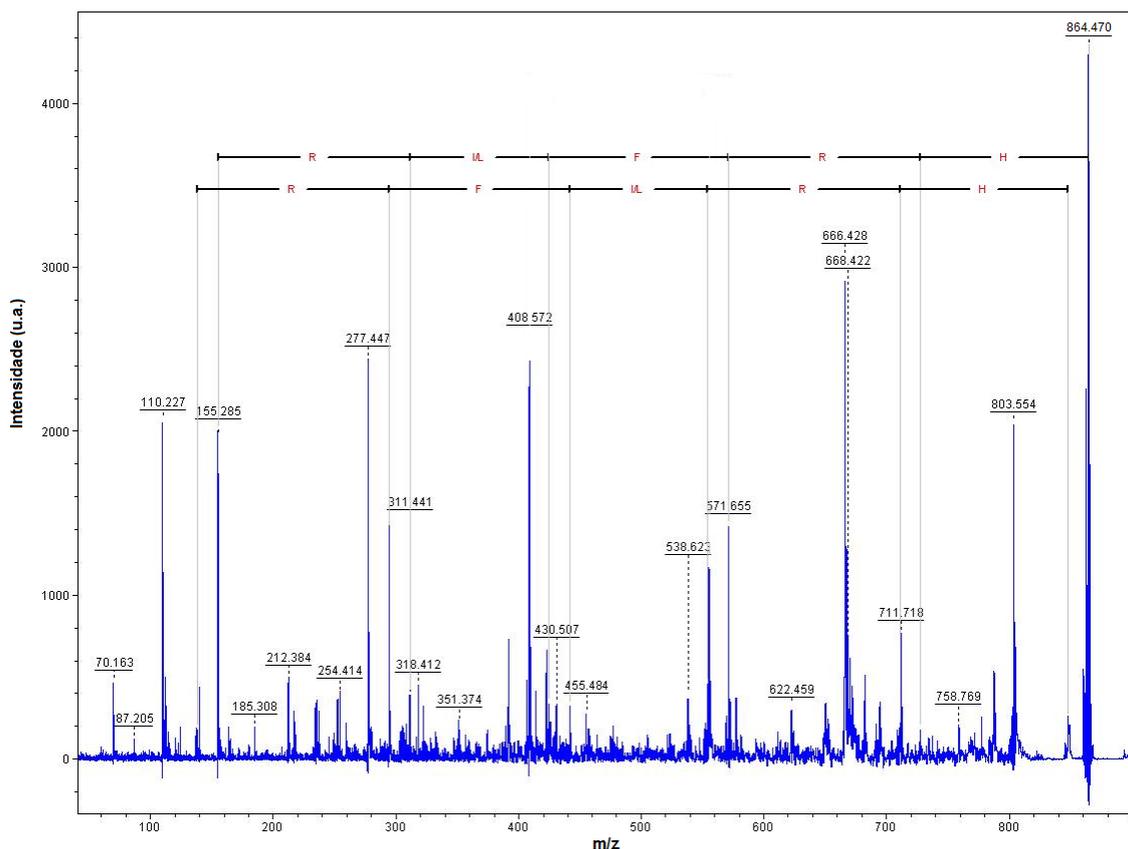


Figura 74: Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor.

3.4.4 - Purificação do Peptídeo Sintético

O cromatograma do hexapeptídeo pode ser observado na Figura 75. Todas as frações foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa, e a fração em destaque refere-se ao peptídeo sintetizado (fração de interesse). Foi possível notar que a fração de interesse apresentava a maior intensidade no cromatograma.

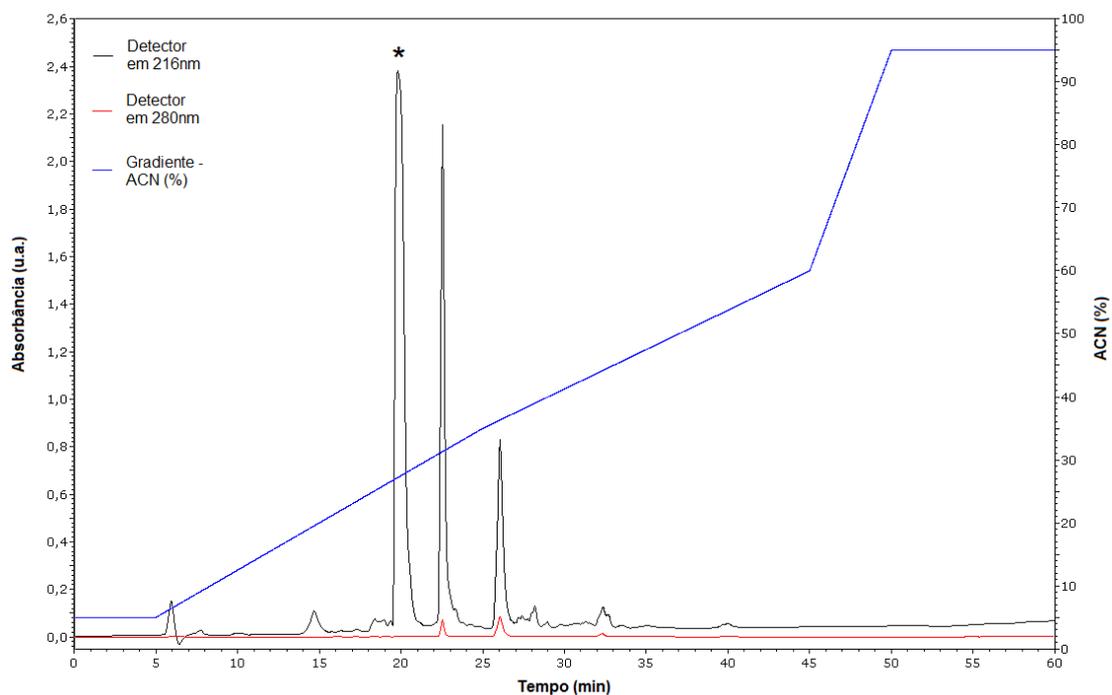


Figura 75: Cromatograma do hexapeptídeo. Em destaque a fração de interesse referente ao peptídeo.

O espectro de massa referente à fração em destaque indicando a presença do hexapeptídeo puro pode ser visto na Figura 76. É possível observar a presença do peptídeo com carga simples, $[M+H]^+ = 864,50$ e também com dupla carga, $[M+2H]^{2+} = 432,76$, o que é comum em análises por ESI.

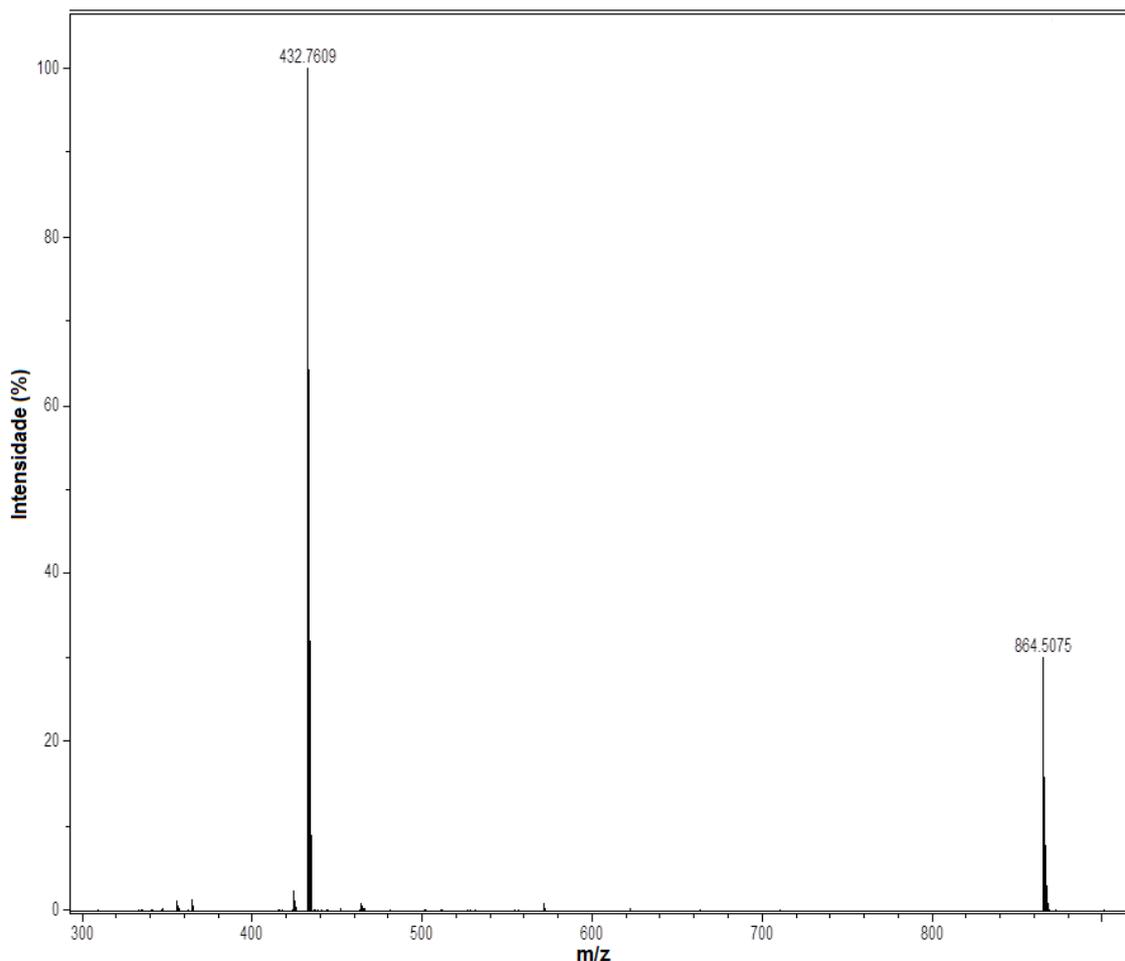


Figura 76: Espectro de Massa do peptídeo puro – presença do peptídeo com dupla carga ($[M+2H]^{2+} = 432,76$ Da) e carga simples ($[M+H]^+ = 864,50$ Da).

3.4.5 – Experimentos de Espectrometria de Massa

Pela análise do peptídeo em contato com o cádmio pode-se observar no espectro a massa do peptídeo acrescida da massa do cádmio, o que indica possível interação do peptídeo com este metal. O espectro do peptídeo com Cd(II) pode ser observado na Figura 77 e uma ampliação desse espectro, na Figura 78. A distribuição monoisotópica dos sinais referentes ao peptídeo e ao peptídeo + Cd(II) pode ser vista nas Figuras 79 e 80, respectivamente.

Foi possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7567$ Da) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do cádmio ($[M+Cd]^{2+} = 488,1989$ Da). O total da massa é 976,3978 Da, sendo 863,50 Da referente à massa do peptídeo e 112,89 Da referente à massa do Cd. É possível observar no espectro a diferença de massa de 55,4422

(55,4422 x 2 pois é duplamente carregado) mais duas unidade de massa referente a dois "H" pois o peptídeo não é mais ionizado pela protonação e sim pelo Cd^{2+} , totalizando a diferença de 112,89 Da, massa referente ao cádmio.

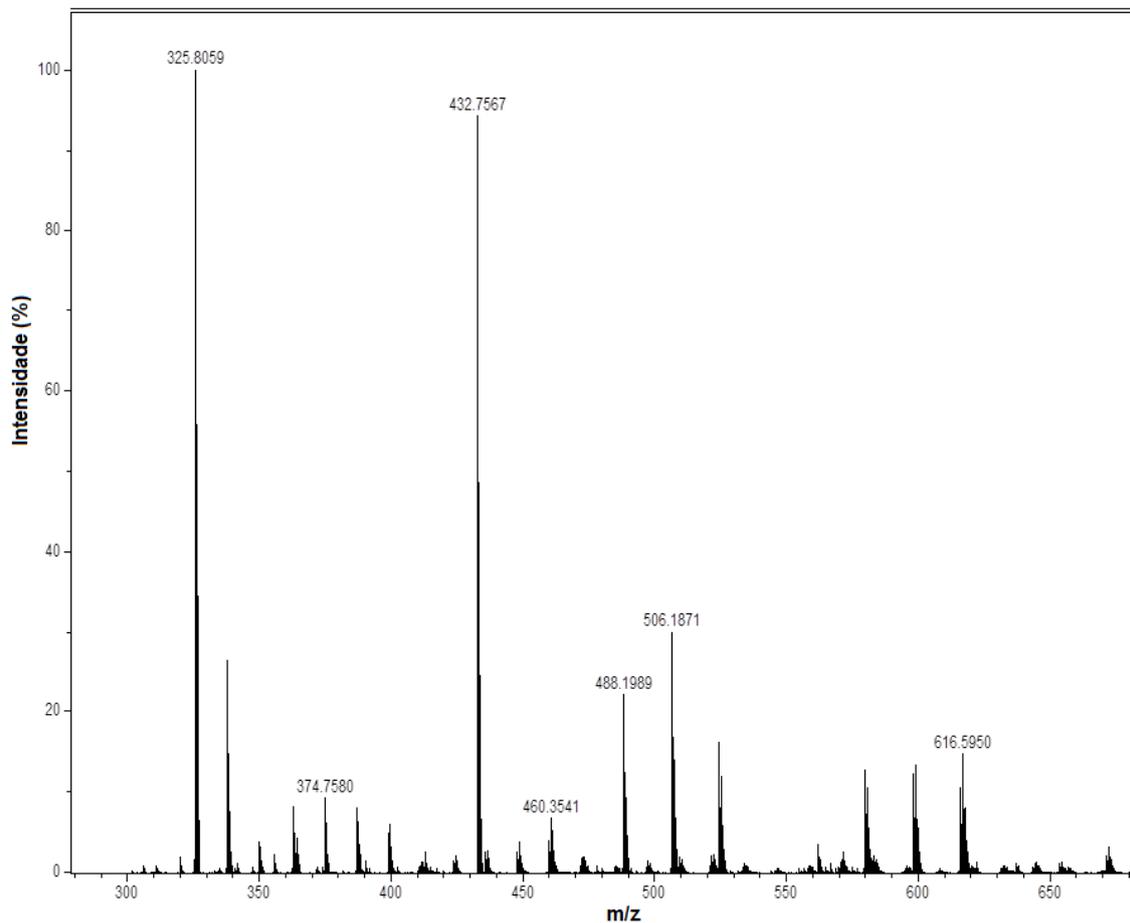


Figura 77: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + $^{113}\text{Cd}(\text{II})$, onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 432,7567$ Da.

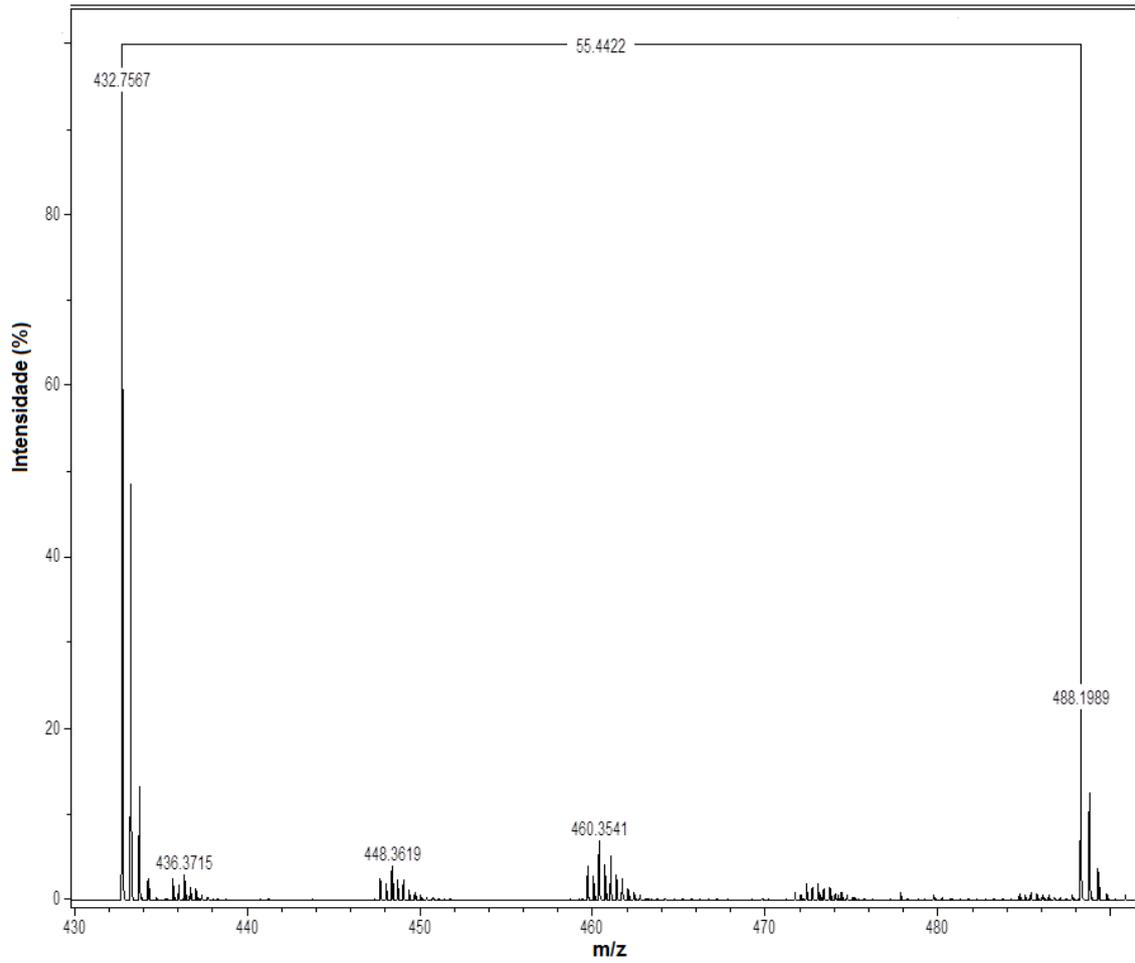


Figura 78: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo + $^{113}\text{Cd}(\text{II})$.

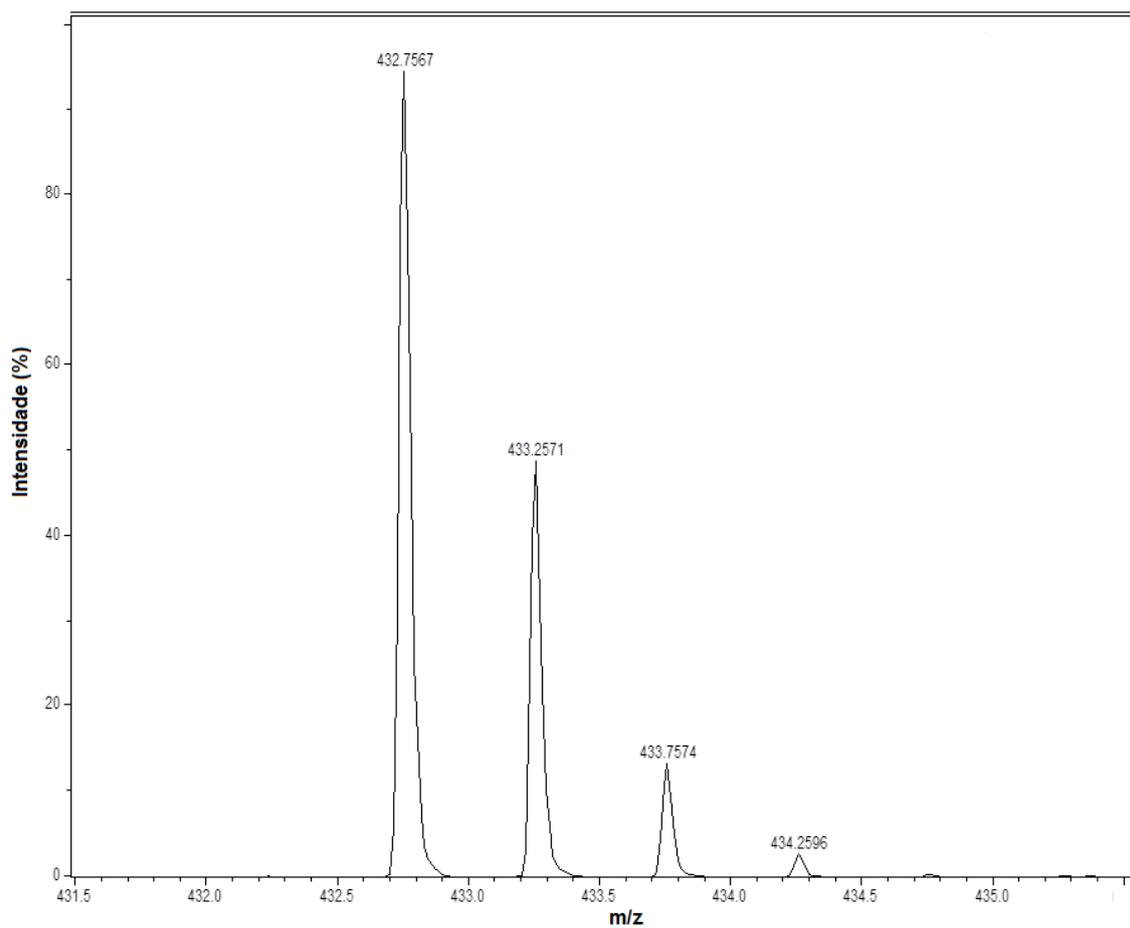


Figura 79: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7567$ Da).

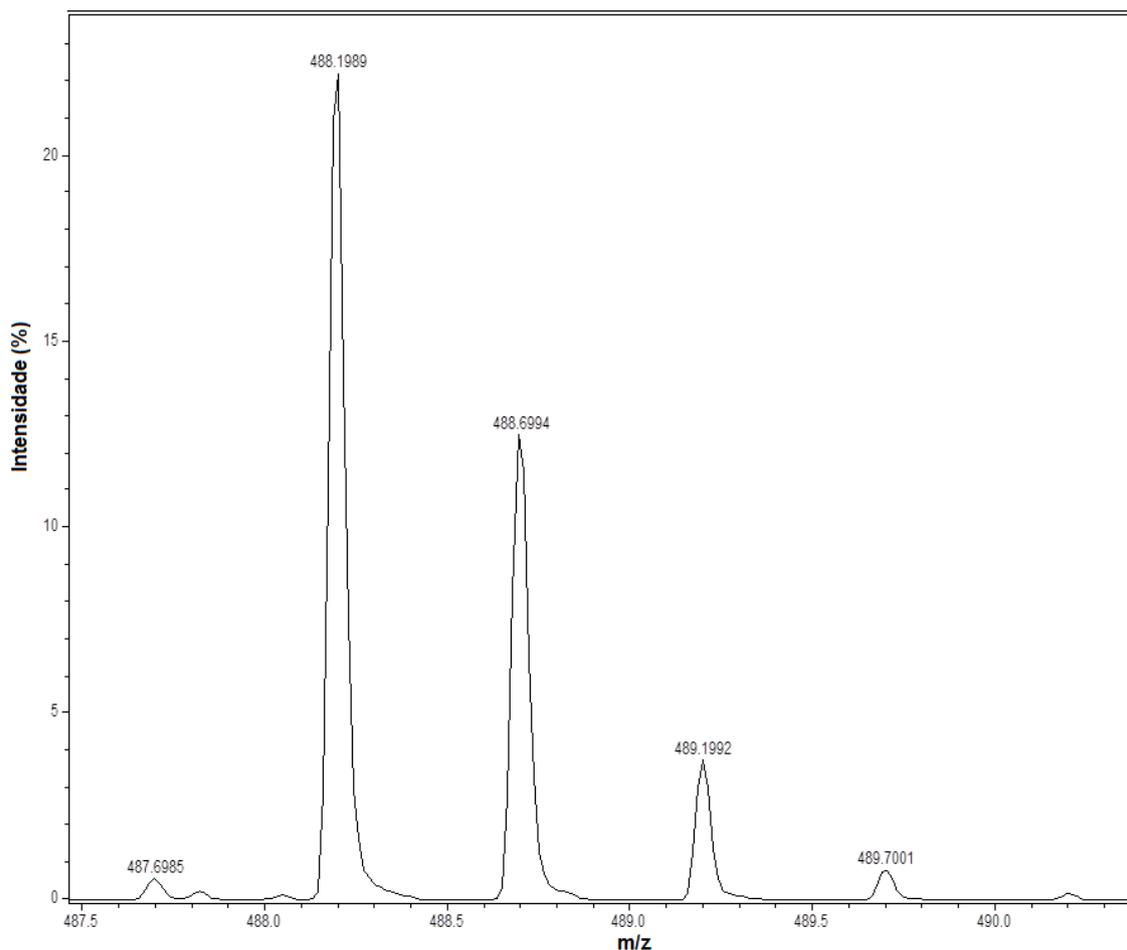


Figura 80: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + $^{113}\text{Cd}(\text{II})$ duplamente carregado ($[\text{M}+\text{Cd}]^{2+} = 488,1989 \text{ Da}$).

Similar ao que foi observado para o cádmio, pela análise por espectrometria de massa do peptídeo em contato com o zinco foi possível observar no espectro a massa do peptídeo acrescida da massa do Zn, o que indica possível interação do peptídeo com este metal. O espectro de massa do peptídeo com Zn(II) pode ser observado na Figura 81 e uma ampliação desse espectro, na Figura 82. A distribuição monoisotópica dos sinais referentes ao peptídeo e ao peptídeo + Zn(II) podem ser vistos nas Figuras 83 e 84, respectivamente.

Foi possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 432,7487 \text{ Da}$) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do Zinco ($[\text{M}+\text{Zn}]^{2+} = 463,7054$). O total da massa é de $927,4108 \text{ Da}$, sendo $863,50 \text{ Da}$ referente à massa do peptídeo e $63,91 \text{ Da}$ referente à massa do zinco. É possível observar no espectro a diferença de massa de $30,9568$ (este valor $\times 2$ pois é duplamente carregado) mais duas unidade de massa referente

a dois “H” pois o peptídeo não é mais ionizado pela protonação e sim pelo Zn^{2+} , totalizando a diferença de 63,91 Da, massa referente ao zinco.

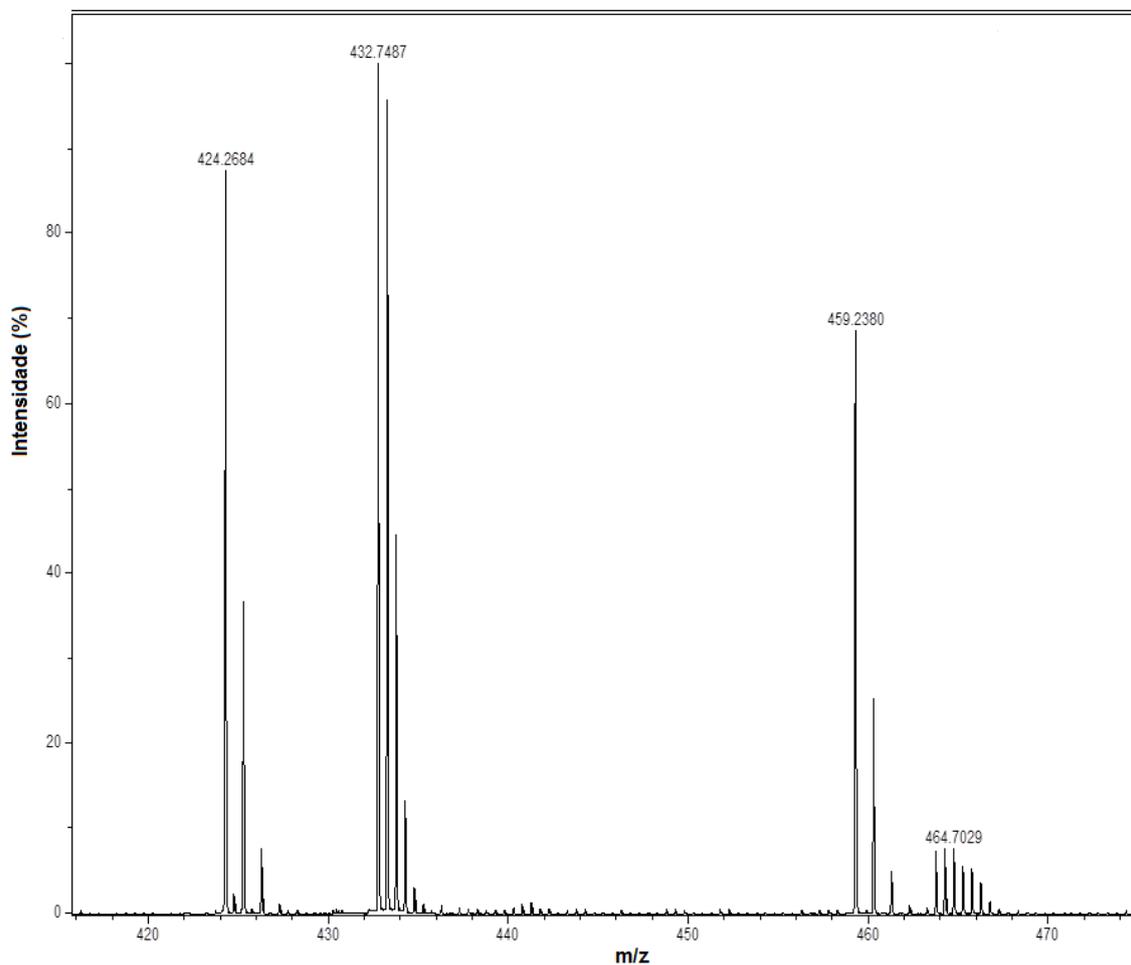


Figura 81: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + Zn(II), onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da.

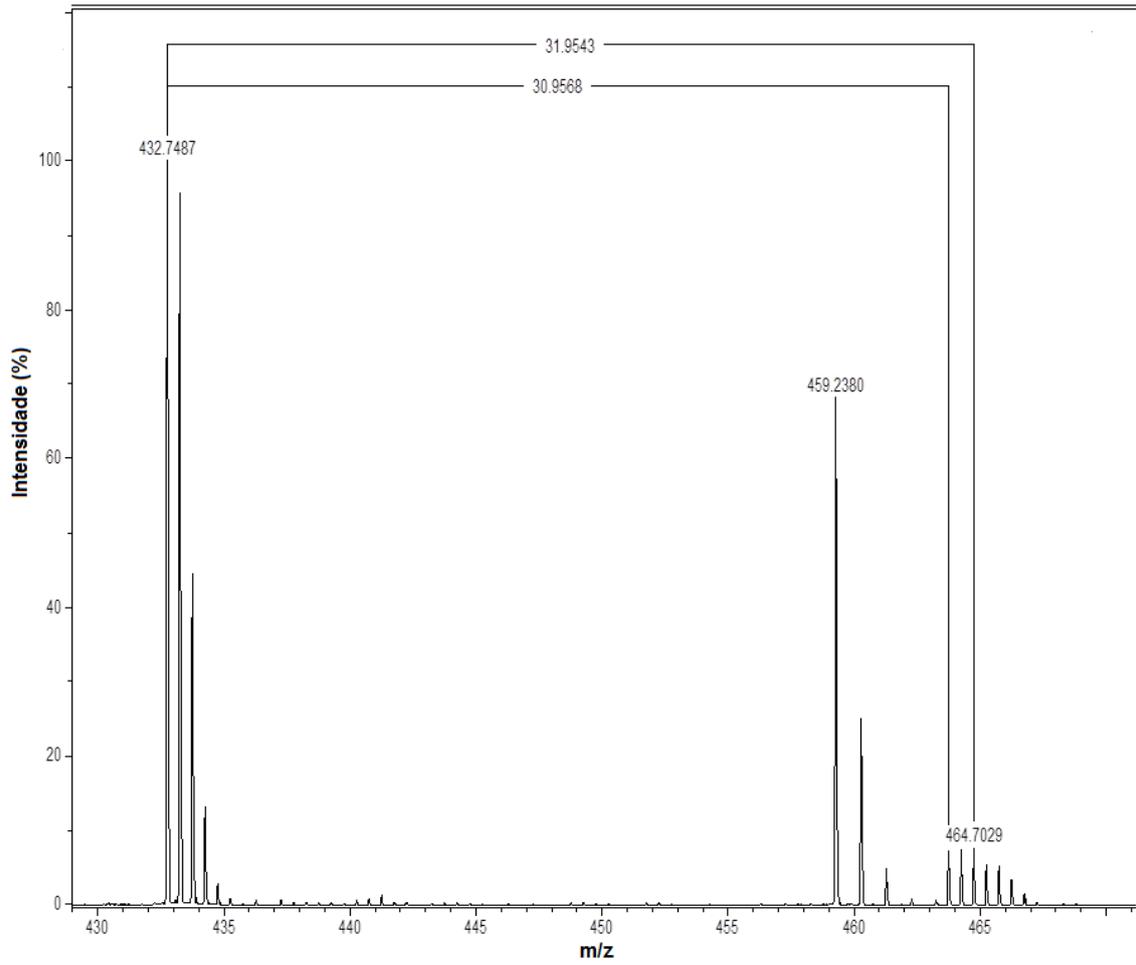


Figura 82: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo + Zn(II).

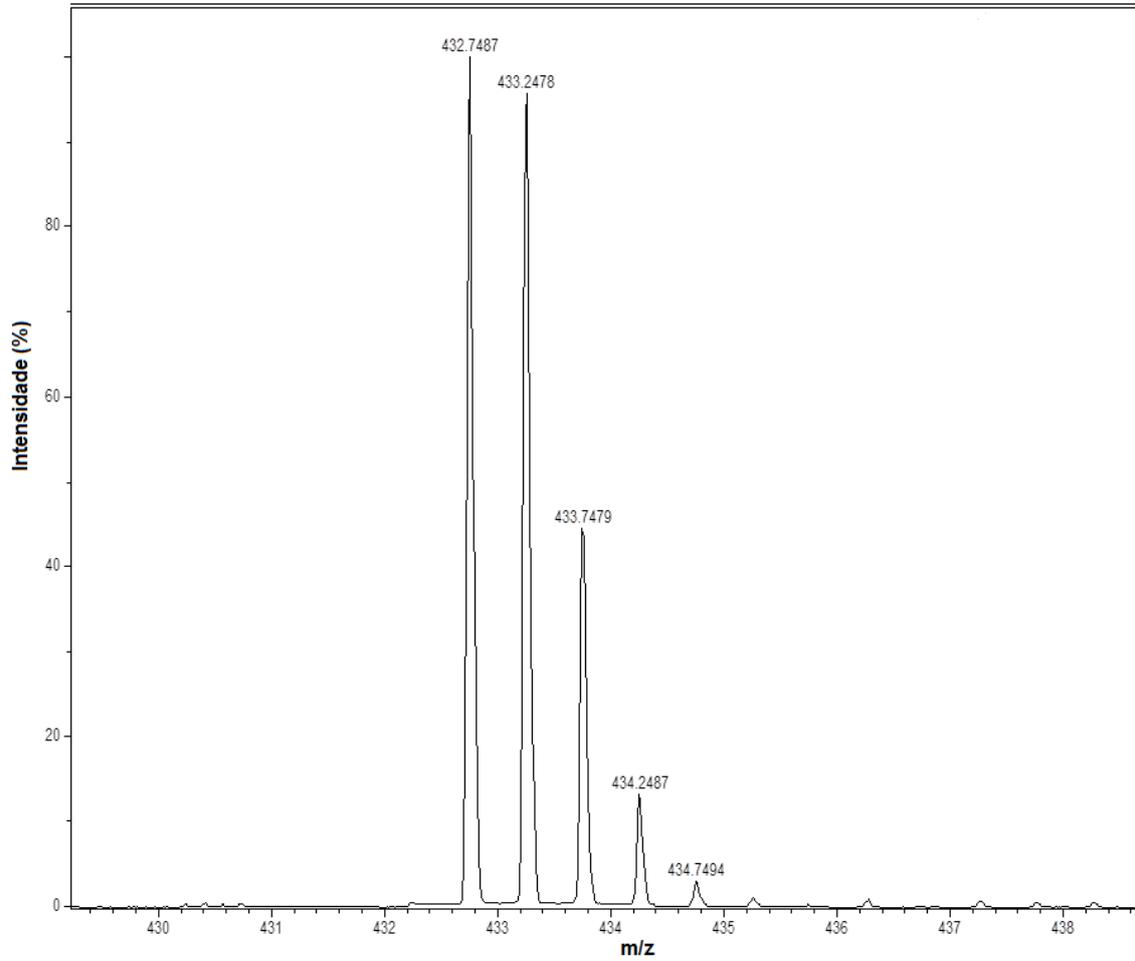


Figura 83: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da).

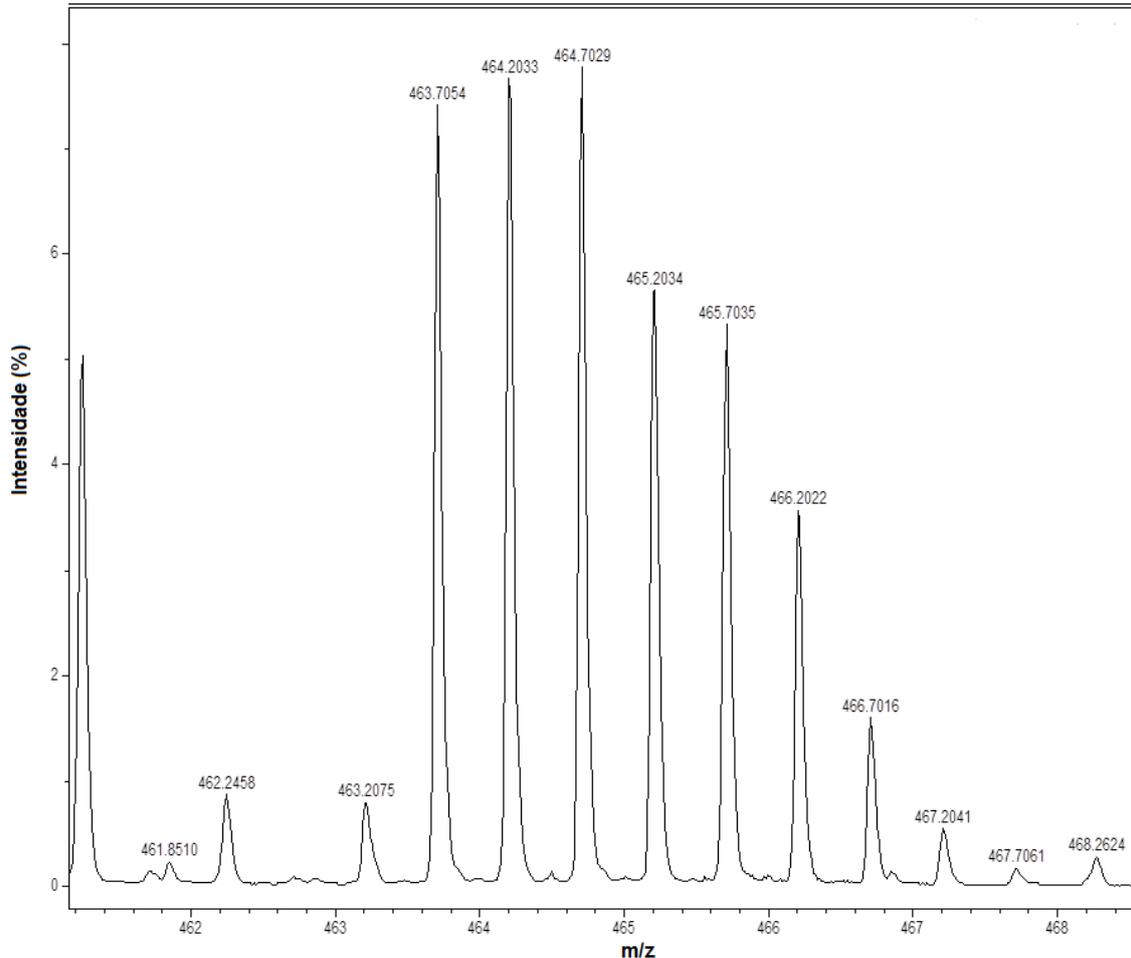


Figura 84: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + Zn(II) duplamente carregado ($[M+Zn]^{2+} = 463,7054$ Da).

Pela análise do peptídeo em contato com o dióxido de carbono foi possível observar no espectro a massa do peptídeo acrescida da massa do CO_2 . Entretanto, não foi possível concluir se há ou não interação do peptídeo com este gás, pois a massa observada pode ser também devida à formação de um aduto de sódio (ionização com duas moléculas de Na). O espectro de massa do peptídeo com CO_2 pode ser observado na Figura 85 e uma ampliação desse espectro na Figura 86. A distribuição monoisotópica dos sinais referentes ao peptídeo e ao peptídeo + CO_2 (ou peptídeo + $2Na$) podem ser vistos nas Figuras 87 e 88, respectivamente.

Foi possível observar a massa do peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7487$ Da) e também a massa do peptídeo acrescida da massa do CO_2 ou duas moléculas de sódio ($[M+2Na]^{2+} = [M+2H+CO_2]^{2+} = 454,7344$ Da). O total da massa é de $909,4688$ Da, podendo ser $863,50$ Da referente à

massa do peptídeo, dois prótons pois a massa é referente ao peptídeo duplamente carregado e 44,010 Da referente à massa do CO₂. Outra possibilidade é 863,50 Da referente ao peptídeo, e 45,98 Da referente massa de dois átomos de sódio (aduto de sódio).

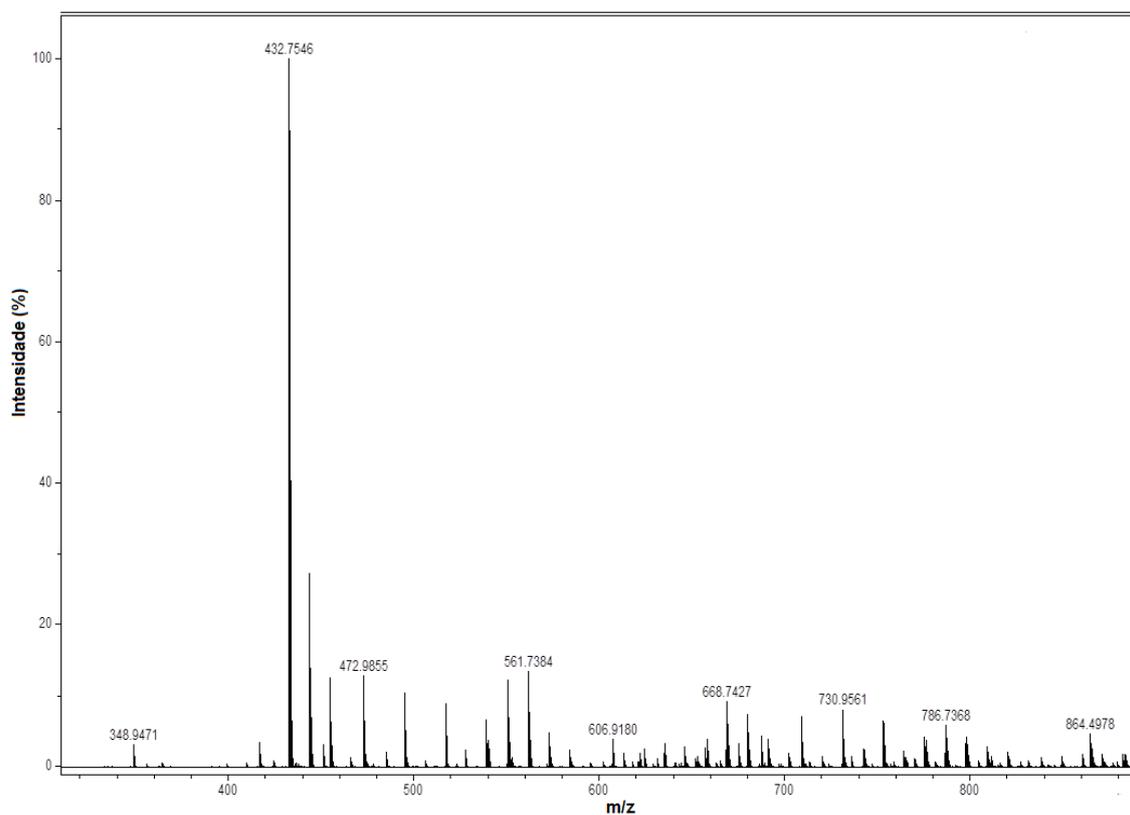


Figura 85: Espectro de Massa referente ao hexapeptídeo + CO₂, onde é possível observar a massa referente ao peptídeo duplamente carregado: $[M+2H]^{2+} = 432,7546$ Da.

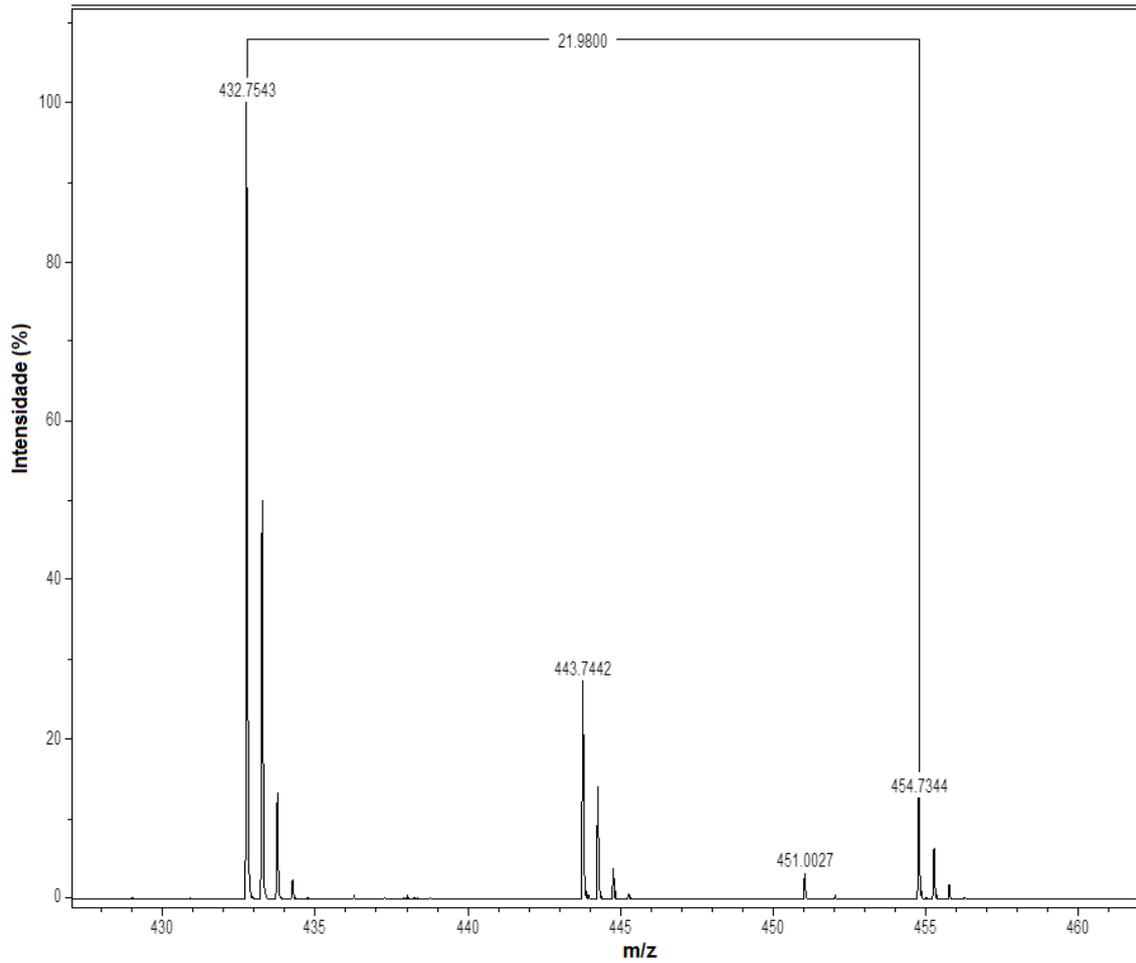


Figura 86: Espectro de Massa ampliado do hexapeptídeo em contato com CO₂.

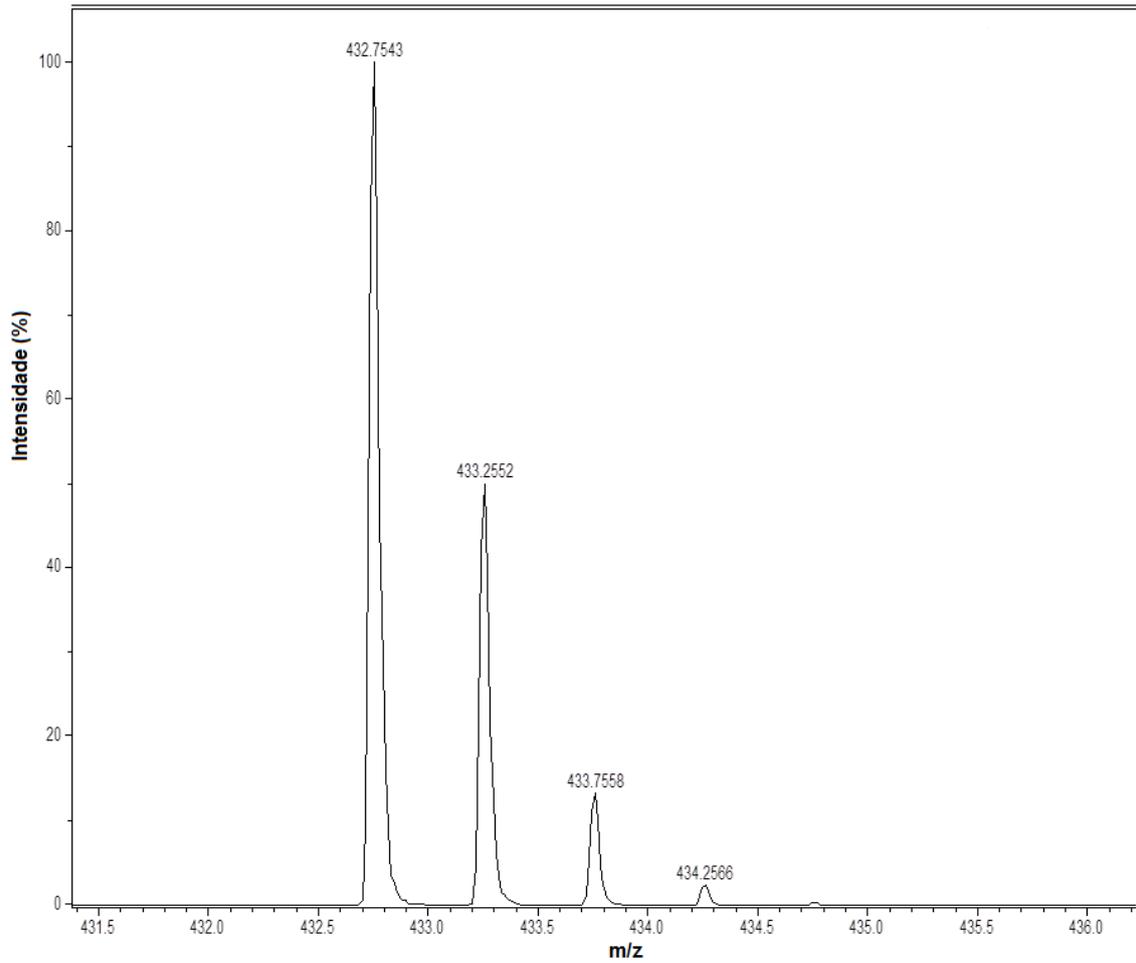


Figura 87: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo duplamente carregado ($[M+2H]^{2+} = 432,7543$ Da).

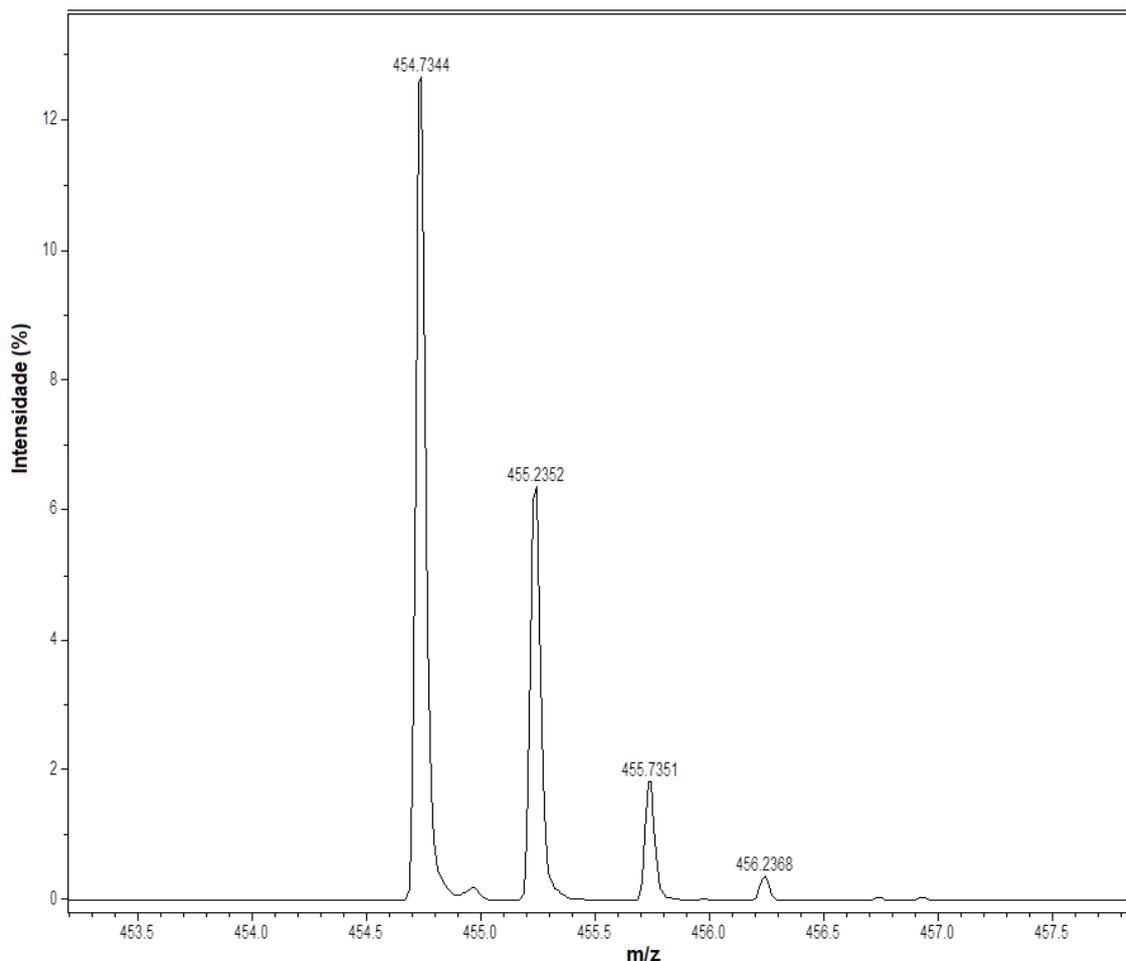


Figura 88: Distribuição monoisotópica da massa referente ao peptídeo + CO₂ ou peptídeo + 2Na, duplamente carregado ($[M+2H+CO_2]^{2+}$ ou $[M+2Na]^{2+} = 454,7344$ Da).

Pelo exposto, os experimentos realizados por Espectrometria de Massa mostram possíveis interações do peptídeo com o Zn(II) e o Cd(II). Entretanto, não é possível concluir acerca de interações do peptídeo com o CO₂. Isso não significa, no entanto, que a interação não ocorra, uma vez que a interação do peptídeo por este gás pode estar ocorrendo por ligações intermoleculares (ligação de hidrogênio) e não de modo covalente. Nesse caso, as interações poderiam ser facilmente rompidas na ionização por eletrospray, não sendo com isso observadas no espectro de Massa.

3.4.6 – Experimentos de RMN (1D)

O pH de todas as soluções preparadas de acordo com o que foi descrito no item 3.3.6 foi medido para observar possíveis variações causadas por esses

metais ou pelos gases na acidez ou basicidade dessas soluções. Os valores observados estão listados na Tabela 21.

Tabela 21: Valores de pH para a solução de peptídeo em diferentes condições.

Amostra	Valor do pH
Peptídeo Livre	4,1
Peptídeo + Cd(II)	4,3
Peptídeo + Zn(II)	4,2
Peptídeo + CO ₂	4,5
Peptídeo + O ₂	5,9

Pelos valores listados pode-se observar que a adição dos metais e gases deixou a solução do peptídeo mais básica. Esse fato que vai de encontro ao que era esperado para o CO₂, uma vez que, quando dissolvido em água, o CO₂ – que é um óxido ácido – forma ácido carbônico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$), o que diminuiria o pH da solução. Por esse motivo, evidencia-se que o CO₂ esteja interagindo com o peptídeo e não apenas dissolvido na solução. Foram adquiridos espectros de hidrogênio de todas as soluções e, para efeitos de comparação, foram preparadas soluções do peptídeo com os valores de pH ajustados para os seguintes valores: 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,8; 5,2; 5,5 e 5,9.

Os espectros de hidrogênio do peptídeo livre e do peptídeo + Cd(II) podem ser vistos na Figura 89. O espectro do peptídeo em pH 4,3 (solução do peptídeo livre com pH ajustado para o pH da solução peptídeo + Cd(II)) também pode ser observado na Figura 89. Foi possível observar mudanças no valor do deslocamento químico de alguns átomos de hidrogênio, principalmente nas regiões de hidrogênio aromático e HN, devido à presença do cádmio em solução. É também possível observar que a mudança em alguns deslocamentos químicos na presença do Cd foi diferente quando comparado com o peptídeo em pH 4,3, o que indica que o Cd de fato interfere no valor de deslocamento químico de alguns átomo de hidrogênio, principalmente da região aromática, evidenciando sua interação com o peptídeo.

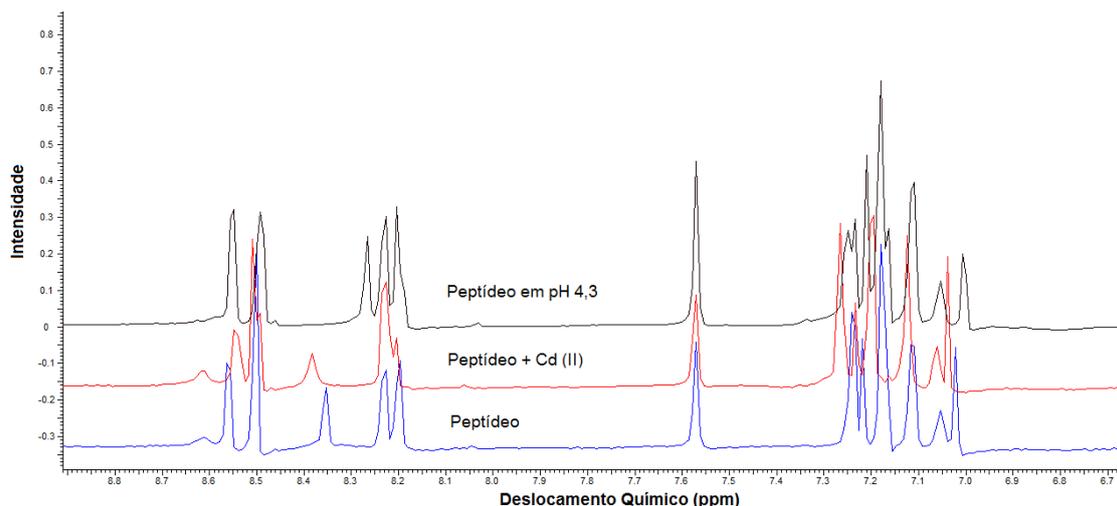


Figura 89: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Cd(II) e do peptídeo em pH 4,3.

Os espectros de hidrogênio do peptídeo livre e do peptídeo + Zn(II) podem ser vistos na Figura 90. O espectro do peptídeo em pH 4,2 (solução do peptídeo em pH ajustado para o pH medido da solução contendo peptídeo + Zn(II)) também pode ser observado na Figura 90. De forma análoga ao que foi observado com o cádmio, foi possível observar mudanças no valor do deslocamento químico de alguns átomos de hidrogênio do peptídeo quando na presença do zinco, principalmente nas regiões de hidrogênio aromático e HN. Notou-se também que na presença do Zn essas mudanças foram diferentes quando comparadas com o peptídeo em pH 4,2, o que indica que o zinco de fato interfere no valor de deslocamento químico de alguns átomo de hidrogênio, principalmente da região aromática, evidenciando também sua interação com o peptídeo.

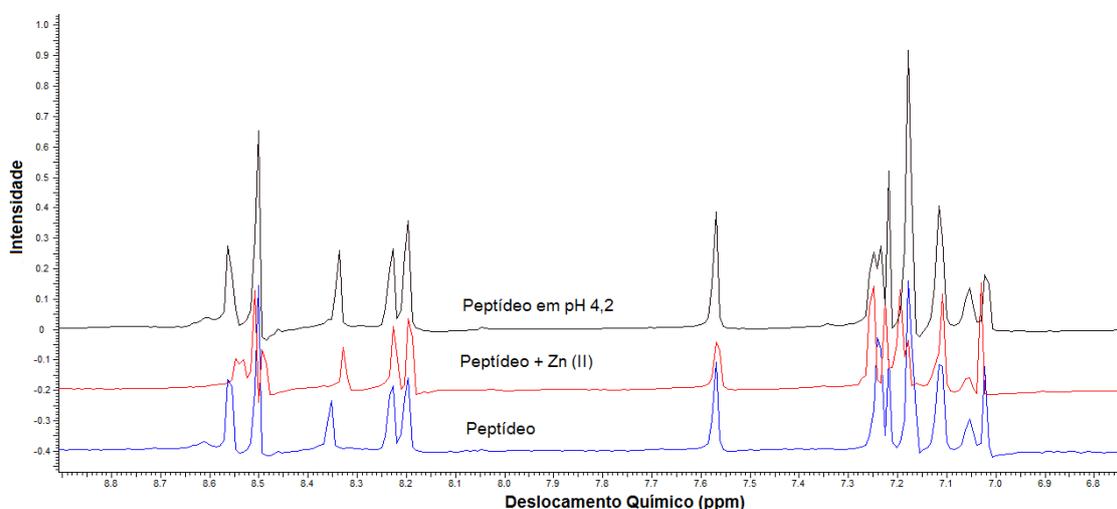


Figura 90: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Zn(II) e do peptídeo em pH 4,2.

Na Figura 91 é possível observar uma comparação dos espectros de RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Zn(II) e do peptídeo + Cd(II). Ao compararmos zinco e cádmio, pode-se observar que a variação em alguns deslocamentos químicos foi diferente, evidenciando diferente blindagem para metais diferentes. Por exemplo, o hidrogênio referente ao anel imidazólico da histidina-6 foi blindado na presença do cádmio e desblindado na presença do zinco.

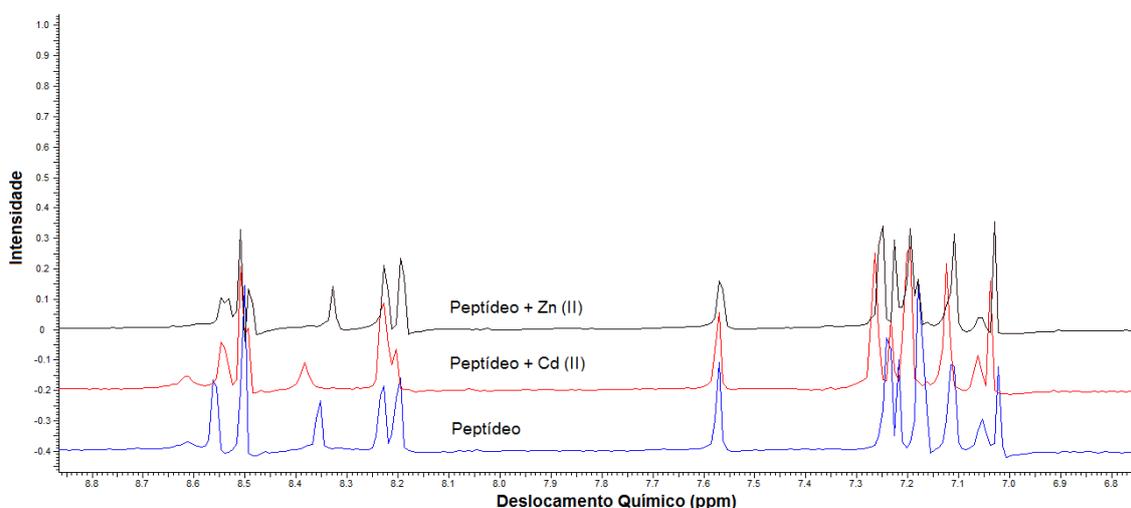


Figura 91: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + Cd(II) e do peptídeo + Zn(II).

Na Figura 92 podem ser vistos os espectros de hidrogênio do peptídeo livre e do peptídeo + CO₂. O espectro do peptídeo em pH 4,5 (solução do peptídeo livre em pH ajustado para o valor observado para a solução contendo CO₂) pode ser visto na Figura 92. Também é possível observar mudanças no valor do deslocamento químico de alguns átomos de hidrogênio e a diferença em certos valores quando comparados com o peptídeo em pH 4,5, o que indica que este gás de fato interfere no valor de deslocamento químico de átomos de hidrogênio, principalmente da região aromática. Essa diferença e o valor do pH encontrado para a solução peptídeo + CO₂ evidenciam a interação do peptídeo com o CO₂.

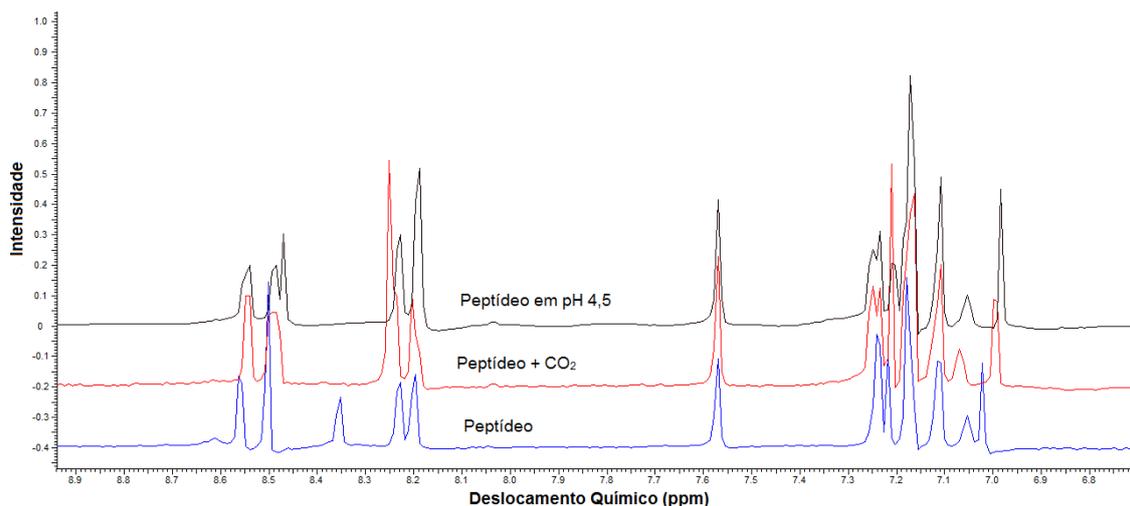


Figura 92: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + CO₂ e do peptídeo em pH 4,5.

Os espectros de hidrogênio do peptídeo livre e do peptídeo + O₂ podem ser vistos na Figura 93. O espectro do peptídeo em pH 5,9 (solução do peptídeo com pH ajustado para o pH da solução contendo o peptídeo + O₂) também pode ser observado na Figura 93. Foi possível observar mudanças do valor do deslocamento químico de alguns átomos de hidrogênio e que essas mudanças são diferentes quando comparadas com o peptídeo em pH 5,9, o que pode indicar que este gás de fato interfere no valor de deslocamento químico de alguns átomos de hidrogênio, principalmente da região aromática.

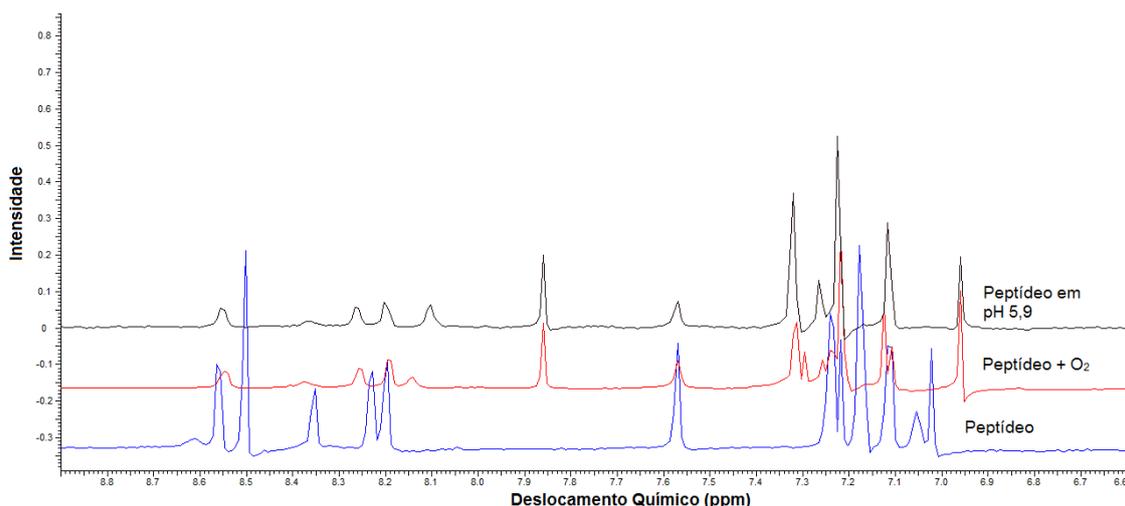


Figura 93: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + O₂ e do peptídeo em pH 5,9.

Na Figura 94, para comparação entre os espectros, estão representados os espectros de RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + CO₂ e do peptídeo +

O₂. É possível observar que a variação em alguns deslocamentos químicos foi diferente quando comparamos dióxido de carbono e oxigênio.

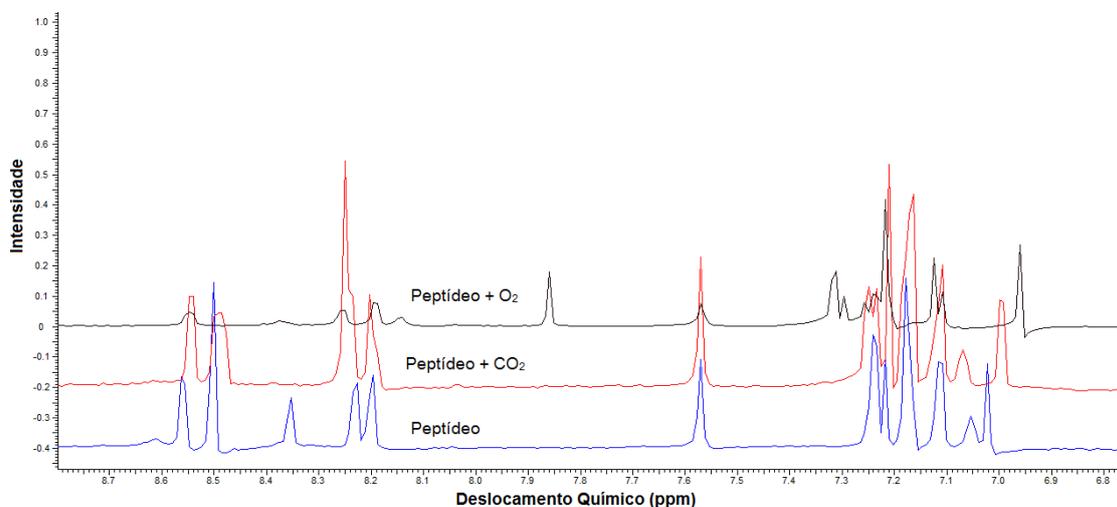


Figura 94: RMN-¹H do peptídeo livre, do peptídeo + CO₂ e do peptídeo + O₂.

Assim, foi possível observar que os metais e os gases causaram mudanças nos deslocamentos químicos de alguns átomos de hidrogênio, principalmente nas regiões de hidrogênio aromático e HN, o que envolve as cadeias laterais das histidinas e argininas, fato que sugere possíveis variações estruturais no peptídeo. Para verificar essa variação estrutural, as estruturas foram determinadas utilizando-se dados de RMN e cálculos estruturais.

3.4.7 – Experimentos de RMN (2D)

Todos os hidrogênios e carbonos foram assinalados utilizando-se os espectros obtidos pelos experimentos TOCSY, ROESY e HSQC (¹H-¹³C). Isso permitiu assinalar os átomos de hidrogênio do peptídeo que estão em contato com Zn, CO₂ e Cd, como observado nos espectros 1D.

Não foi possível realizar o assinalamento completo dos átomos de hidrogênio da solução do peptídeo + O₂. Os sinais obtidos no espectro a partir do experimento TOCSY não foram da mesma qualidade dos experimentos realizados com os metais e o dióxido de carbono, devido a presença do O₂. O espectro obtido a partir do experimento ROESY também apresentou uma quantidade menor de sinais, o que dificultou o assinalamento sequencial. Estes

problemas podem ter ocorrido devido à maior solubilidade deste gás em água e/ou também pelo fato do O₂ ser paramagnético, o que poderia levar a um alargamento dos sinais do espectro, o que é observado em alguns sinais no espectro 1D (Figura 93).

Pelos espectros ROESY foi possível observar a existência de diferentes ROEs quando comparado o peptídeo nos diferentes meios estudados, o que evidencia diferentes conformações do peptídeo nesses meios.

Os assinalamentos dos átomos de hidrogênio e carbono do peptídeo livre, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO₂ estão listados nos Anexos 21, 22, 23 e 24, respectivamente.

Algumas regiões dos espectros TOCSY, ROESY, HSQC (¹H-¹³C) das regiões alifática e aromática podem ser observados nos Anexos 25, 26, 27 e 28 para o peptídeo livre, nos Anexos 29, 30, 31 e 32 para o peptídeo + Cd(II), nos Anexos 33, 34, 35 e 36 para o peptídeo + Zn(II) e nos Anexos 37, 38, 39 e 40 para o peptídeo + CO₂.

Os valores de deslocamento químico de cada átomo de hidrogênio do peptídeo livre foram subtraídos do valor do deslocamento químico para os mesmos átomos quando em contato com cádmio, zinco e dióxido de carbono para observar as variações que esses metais e o CO₂ causaram nos valores de deslocamento químico, e qual resíduo de aminoácido sofreu maior variação. Os gráficos com os valores destas diferenças podem ser vistos nas Figuras 95, 96, 97, 98, 99 e 100 para os resíduos de aminoácidos histidina-1, arginina-2, fenilalanina-3, leucina-4, arginina-5 e histidina-6, respectivamente.

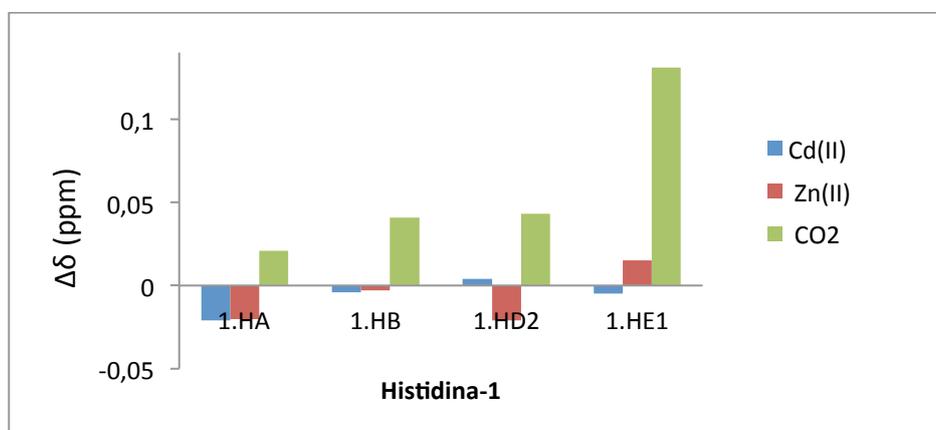


Figura 95: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da histidina-1 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂ para a Histidina-1.

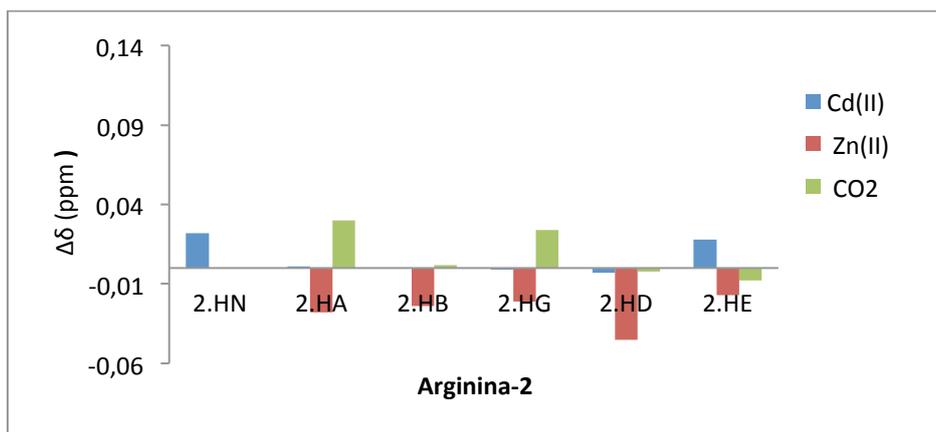


Figura 96: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da arginina-2 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂.

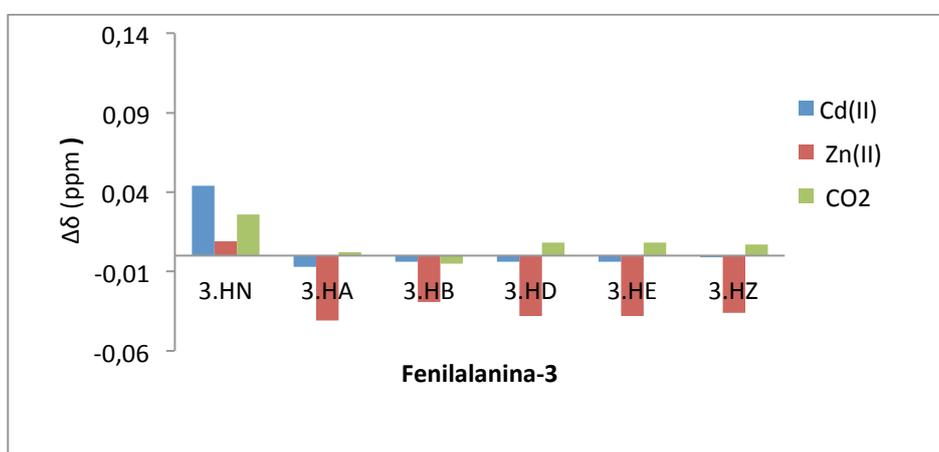


Figura 97: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da fenilalanina-3 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂.

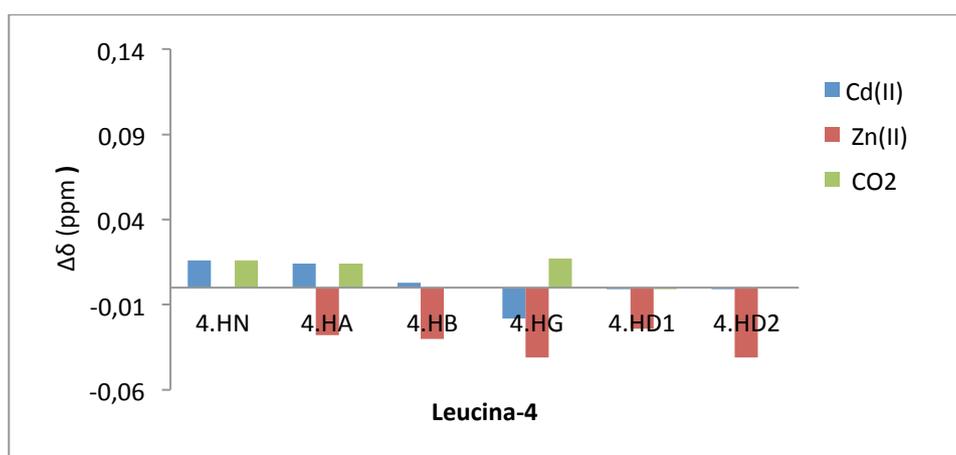


Figura 98: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da leucina-4 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂.

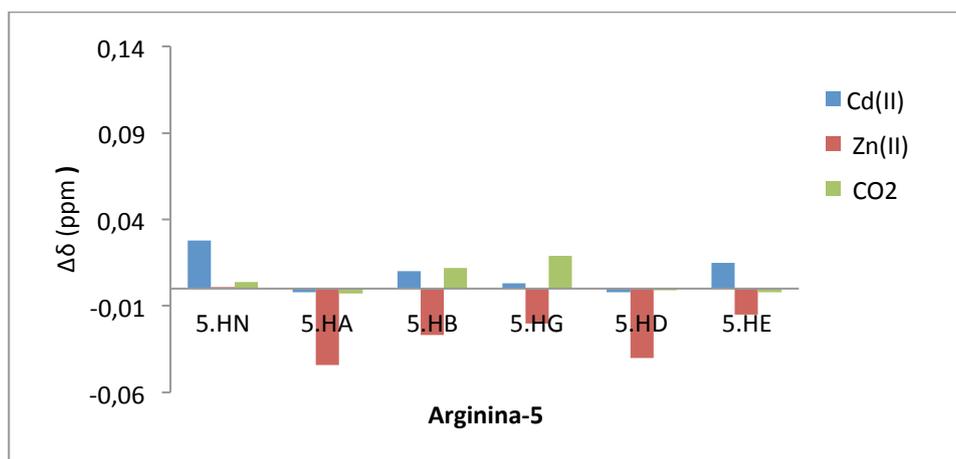


Figura 99: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da arginina-5 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂.

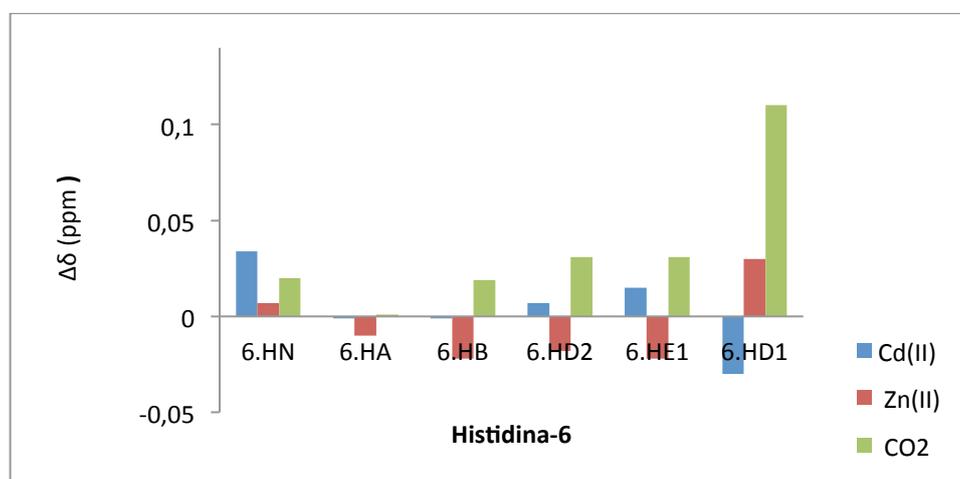


Figura 100: Diferença entre os valores de deslocamento químico dos átomos de hidrogênio da histidina-6 do peptídeo livre quando comparado com a presença de Cd(II), Zn(II) e CO₂.

Foi possível observar que a grande maioria dos átomos de hidrogênio do hexapeptídeo apresentou variação no deslocamento químico quando em presença dos metais e gás estudados. Pelos gráficos apresentados é também observado variações envolvendo as histidinas e argininas, possíveis aminoácidos envolvidos nas interações com os metais e o gás.

3.4.8 – Cálculo de Estrutura e Análise por RMN

Com os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H_α, H_β e H_N, juntamente com os assinalamentos dos carbonos C_α e C_β, foi possível calcular os ângulos diedro para o hexapeptídeo, assim como para o peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO₂, utilizando-se o programa TALOS. A

lista com os ângulos Φ e Ψ calculados para todas as condições estudadas encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22: Ângulos de diedros Φ e Ψ calculados para o peptídeo, peptídeo + Cd(II), peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO₂.

Aminoácido	Peptídeo		Peptídeo + Cd(II)		Peptídeo + Zn(II)		Peptídeo + CO ₂	
	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)	Φ (°)	Ψ (°)
1.H	-	-	-	-	-	-	-	-
2.R	-131	147	-97	131	-98	142	-103	133
3.F	-121	136	-106	125	-113	121	-105	126
4.L	-104	130	-94	127	-85	131	-94	131
5.R	-129	154	-88	142	-97	141	-84	138
6.H	-	-	-	-	-	-	-	-

Notou-se que o peptídeo nos diferentes meios apresentou diferentes valores para os ângulos Φ e Ψ , o que pode gerar uma possível confirmação de que a presença de cádmio, zinco e dióxido de carbono influenciaram na estrutura do hexapeptídeo em solução.

Os ROEs assinalados pelo espectro ROESY foram convertidos em restrições de distância. Estas restrições de distâncias, juntamente com os ângulos diedros foram os parâmetros utilizados para realizar os cálculos estruturais e determinar a estrutura do hexapeptídeo e também do hexapeptídeo nos diferentes meios.

A sobreposição das 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) calculadas referente ao hexapeptídeo livre pode ser vista na Figura 101. As estruturas calculadas foram obtidas com 127 restrições de distâncias, uma médias de 21,16 ROEs por resíduo de aminoácido, valor acima da média de 15 ROEs por resíduo para se obter uma estrutura de maior confiabilidade.⁴³ O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas, incluindo todos os átomos foi de 0,478.

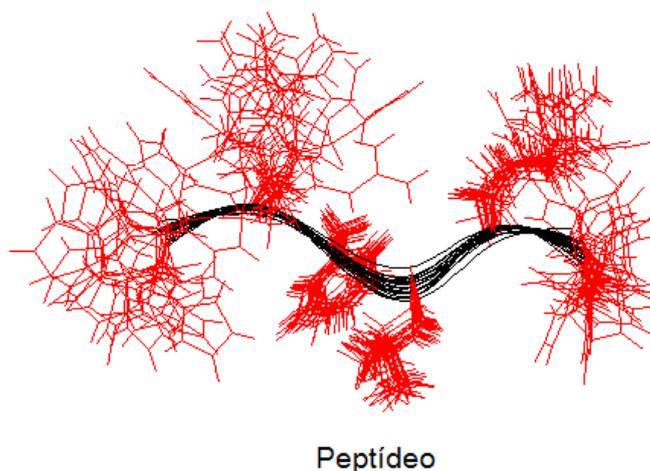


Figura 101: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo em solução.

Observou-se que o peptídeo não apresenta uma boa estruturação, e com isso, apresenta uma maior mobilidade, fato que já era esperado devido ao pequeno tamanho do peptídeo. Notou-se uma maior flexibilidade (menor estruturação) para os resíduos de aminoácidos próximos as extremidades como as histidinas e as argininas, o que também é esperado para aminoácidos terminais. Foi observada também uma melhor estruturação para os resíduos fenilalanina-3 e leucina-4 e também certa proximidade entre as cadeias laterais destes resíduos.

A sobreposição das 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) calculadas para o hexapeptídeo + Cd(II) pode ser vista na Figura 102. As estruturas calculadas foram obtidas com 136 restrições de distâncias, uma médias de 22,66 ROEs por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas, incluindo todos os átomos foi de 0,504.

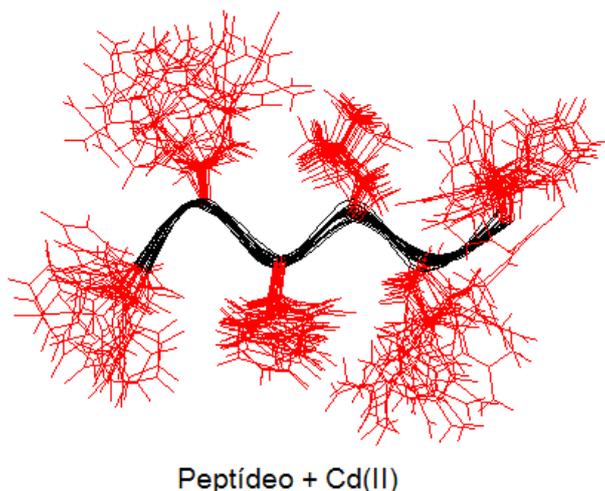


Figura 102: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + Cd(II) em solução.

Observou-se que o peptídeo continuou não apresentando uma boa estruturação, e com isso, também apresentou uma maior mobilidade. Análogo ao que foi observado anteriormente para o hexapeptídeo puro, notou-se uma maior flexibilidade (menor estruturação) para os resíduos de aminoácidos próximos às extremidades (histidinas e argininas) e uma melhor estruturação para os resíduos fenilalanina-3 e leucina-4. Entretanto, observou-se que as cadeias laterais da fenilalanina-3 e leucina-4 não se encontram mais próximas, como observado para o hexapeptídeo livre, fato que evidencia que a presença do Cd(II) de fato influencia na estrutura desse hexapeptídeo em solução. Outra diferença está no fato de as cadeias laterais das argininas se encontrarem em posições opostas quando o peptídeo está em contato com cádmio (para o peptídeo livre, as cadeias laterais das argininas encontram-se do mesmo lado), sendo esse mais um indício de que este metal influencia na estrutura do peptídeo em solução.

A sobreposição das 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) calculadas para o hexapeptídeo + Zn(II) pode ser vista na Figura 103. As estruturas calculadas foram obtidas com 139 restrições de distâncias, uma médias de 23,16 ROEs por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas, incluindo todos os átomos foi de 0,291.

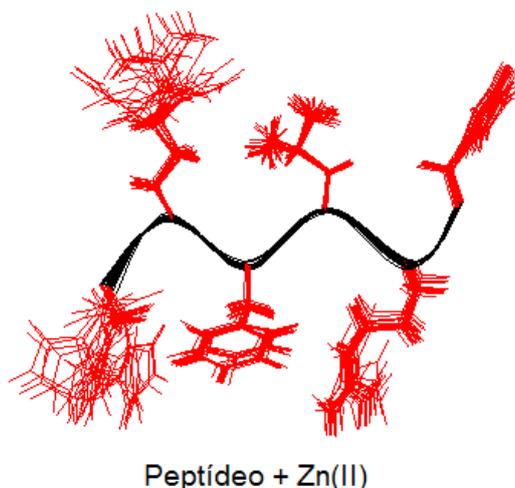


Figura 103: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + Zn(II) em solução.

Observou-se que o peptídeo apresentou uma melhor estruturação, e com isso, apresentou uma menor flexibilidade. Notou-se uma melhor estruturação dos resíduos, principalmente para a histidina-6. Observou-se que as cadeias laterais da fenilalanina-3 e leucina-4 também não se encontram próximas, como observado para o hexapeptídeo livre, mas se encontram em uma disposição semelhante àquela observada para o peptídeo em presença do Cd(II), fato que evidencia que a presença do zinco também influencia na estrutura desse hexapeptídeo em solução. Análogo ao que foi observado para o peptídeo em contato com o cádmio, as cadeias laterais das argininas também se encontram em posições opostas quando o peptídeo está em contato com zinco, diferentemente do que é observado para o peptídeo livre, em que as cadeias laterais das argininas se encontram do mesmo lado.

A estrutura do peptídeo em contato com o zinco é semelhante à estrutura do peptídeo em contato com o cádmio, o que vai de acordo com os dados encontrados na literatura, em que o Cd é utilizado para mimetizar modelos de estudos de interação de biomoléculas (peptídeo e proteínas) com zinco.^{120,121} Entretanto, o peptídeo apresenta uma melhor estruturação quando em contato com o zinco.

A sobreposição das 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) calculadas referente ao hexapeptídeo + CO₂ pode ser vista na Figura 104. As

estruturas calculadas foram obtidas com 112 restrições de distâncias, uma médias de 18,66 ROEs por resíduo de aminoácido, valor acima da média de 15 ROEs por resíduo para se obter uma estrutura de maior confiabilidade.⁴³ O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas, incluindo todos os átomos foi de 0,110.

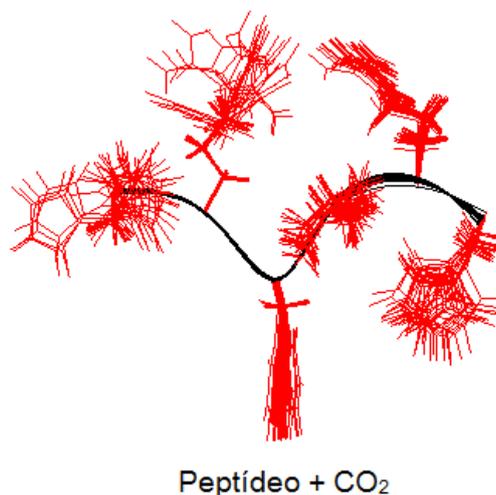


Figura 104: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis calculadas para o hexapeptídeo + CO₂ em solução.

Observou-se que o peptídeo apresentou uma melhor estruturação, e com isso, apresentou uma menor mobilidade (estrutura mais rígida). Notou-se grande diferença na estrutura do hexapeptídeo em contato com o CO₂ quando comparada com o peptídeo livre, fato que evidencia que este gás também influencia na estrutura do hexapeptídeo em solução. Observou-se também uma grande proximidade das cadeias laterais das argininas, em que os grupos guanidil, mesmo com cargas positivas, se encontram próximos. O dióxido de carbono pode ser o responsável pela aproximação dessas cadeias, mantendo-as próximas devido à interação do CO₂ com os hidrogênios dos grupos guanidil por ligações de hidrogênio. Um possível modelo para a interação do CO₂ com as argininas 2 e 5 pode ser visto na Figura 105.

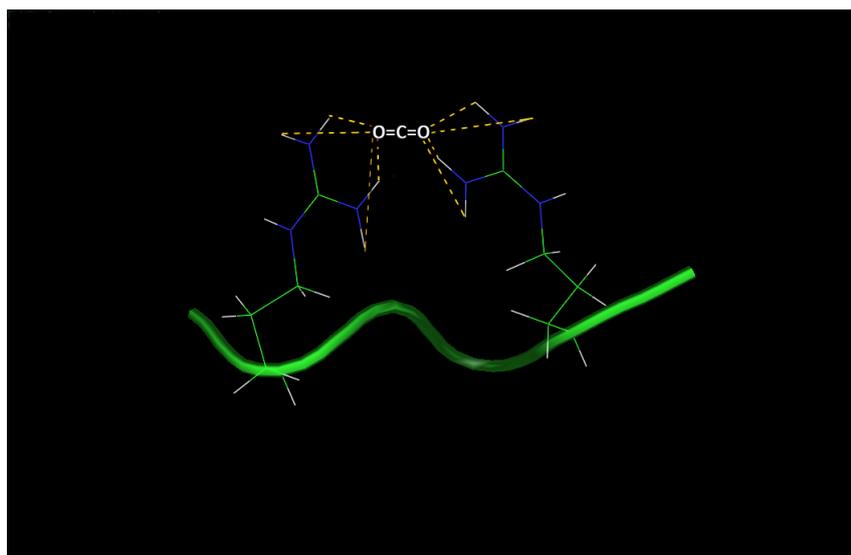


Figura 105: Modelo para a interação do CO_2 com peptídeo pelas argininas 2 e 5, proposto com base na estrutura calculada de menor energia para o peptídeo quando em contato com o gás.

A sobreposição das 20 estruturas mais estáveis para o peptídeo, peptídeo + Cd(II) , peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO_2 podem ser vistas na Figura 106.

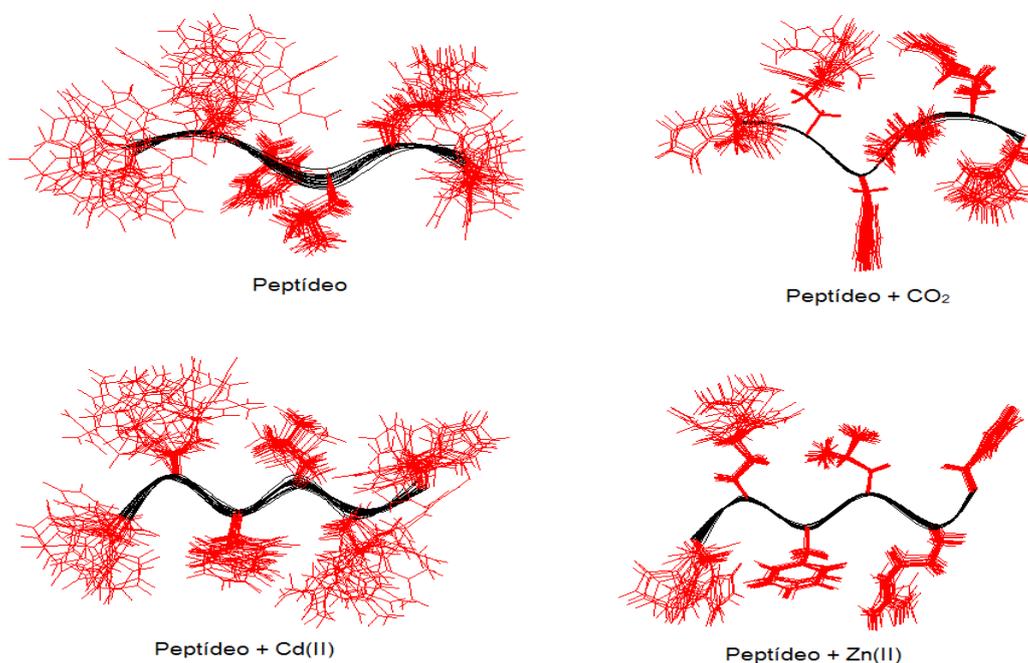


Figura 106: Sobreposição das 20 estruturas mais estáveis para o peptídeo, peptídeo + Cd(II) , peptídeo + Zn(II) e peptídeo + CO_2 .

Para verificar a afinidade dos metais (Cd e Zn) com o peptídeo foi realizada a titulação desses metais na solução do peptídeo e adquiridos

espectros de RMN de hidrogênio. Os espectros obtidos (Figuras 107 e 108) permitiram observar os sinais que mais variavam que o aumento da concentração desses metais e também calcular a constante de afinidade para cada metal.

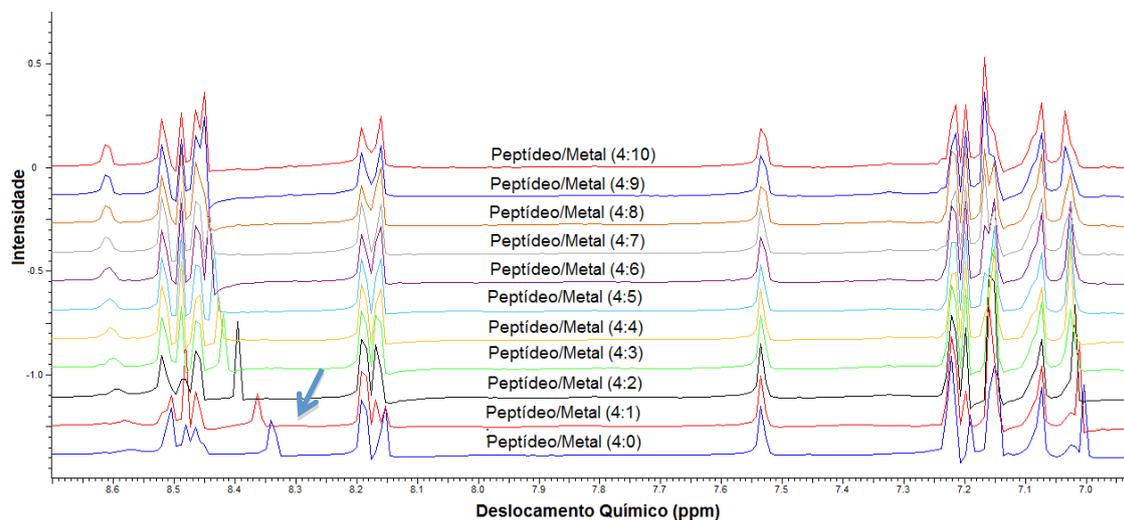


Figura 107: Espectros de RMN-¹H para o hexapeptídeo em diferentes concentrações de Cd(II).

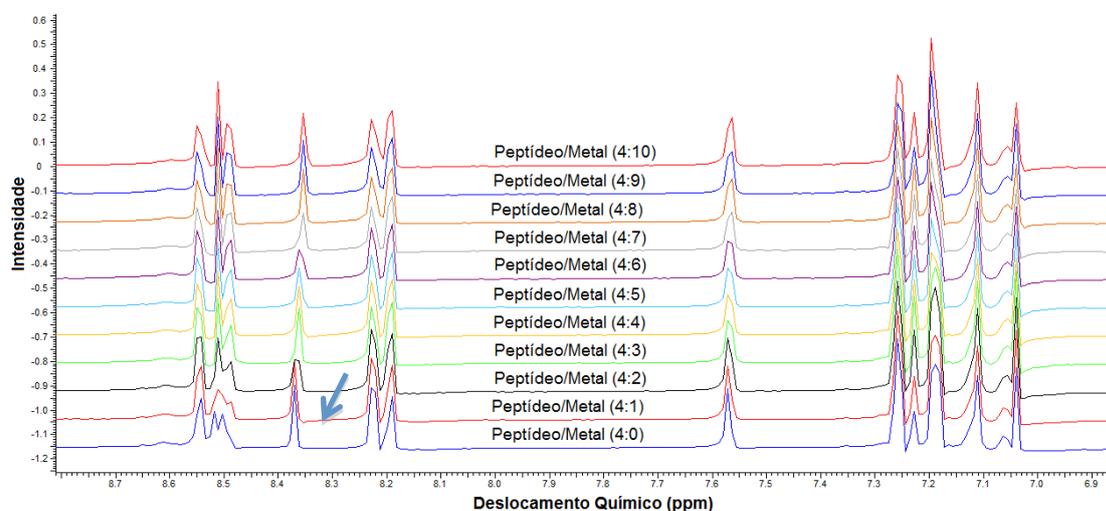


Figura 108: Espectros de RMN-¹H para o hexapeptídeo em diferentes concentrações de Zn(II).

Foi possível observar que o sinal que mais variou com a concentração dos metais foi o sinal próximo a 8,3 ppm (em destaque no espectro). Este sinal é referente ao hidrogênio HD1 (H_N do anel imidazólico) da histidina-6. Este fato ajuda a evidenciar a interação tanto do zinco como do cádmio pelo hexapeptídeo pela histidina-6, pois o hidrogênio do anel imidazólico deste resíduo foi o que mais sofreu variação com o aumento da concentração dos

metais. Este fato também vai de acordo com as estruturas calculadas (Figura 106), em que apesar da histidina-6 estar na extremidade da estrutura, apresentou uma grande estruturação quando em contato com o zinco, o que pode evidenciar a interação deste metal por esse resíduo de aminoácido.

Os sinais em destaque (indicado nas figuras 107 e 108 por uma seta) também foram utilizados para construir um gráfico deslocamento químico *versus* concentração do metal. O gráfico referente ao peptídeo em contato com o cádmio pode ser visto na Figura 109 e em contato com o zinco na Figura 110. Pelos gráficos foi possível tendenciar os pontos pela equação de Hill e com isso obter o coeficiente de Hill e o K_d (constante de afinidade) para o peptídeo quando em contato com os metais.

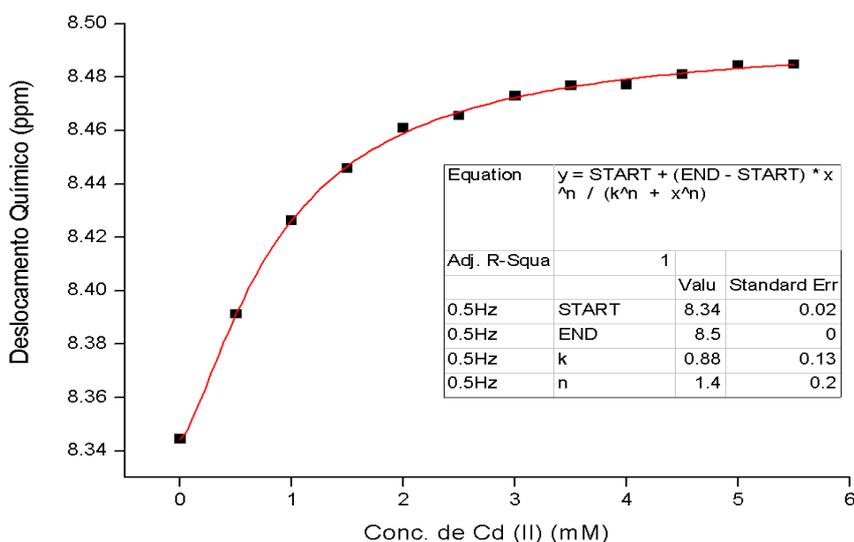


Figura 109: Gráfico Deslocamento Químico do H_N do anel imidazólico da histidina-6 *versus* Concentração de Cd(II).

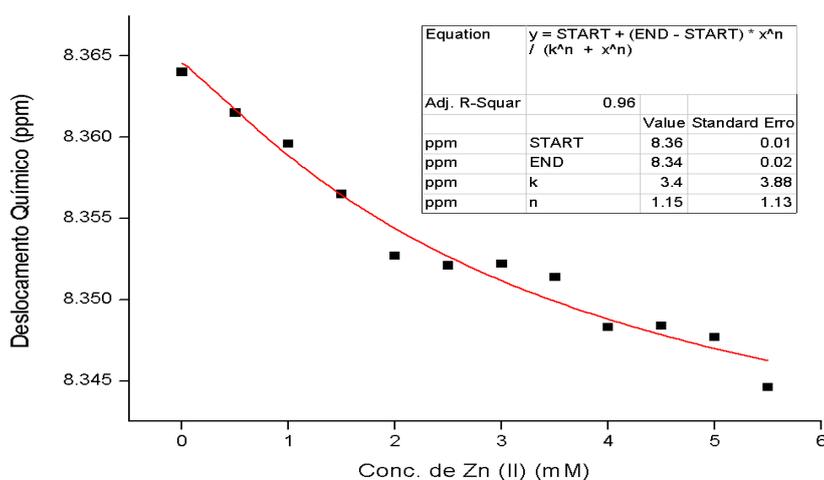


Figura 110: Gráfico Deslocamento Químico do H_N do anel imidazólico da histidina-6 *versus* Concentração de Zn(II).

Pelos gráficos, foi obtido um valor para K_d de $0,88 \cdot 10^{-3}$ M para cádmio e $3,4 \cdot 10^{-3}$ M para o zinco. Estes valores indicam um valor moderado de afinidade do peptídeo tanto pelo zinco, como pelo cádmio.^{129,130} Notou-se um valor para o coeficiente de Hill de 1,4 e 1,15 para o Cd(II) e o Zn(II) respectivamente. Apesar de ser pouco recomendado utilizar o valor de “n” para determinar a proporção,¹²⁸ observou-se que o peptídeo tende a ter uma proporção de 1:1 de peptídeo/metal, fato também observado pelos experimentos de Espectrometria de Massa

3.4.9 – Experimentos de Mobilidade Iônica

Os espectros de fragmentação (MS/MS) dos íons $[M+\text{Cd}]^{2+} = 488,7191$ Da e $[M+\text{Zn}]^{2+} = 463,7235$ Da podem ser vistos nas Figuras 111 e 112, respectivamente. Foi possível observar que a fragmentação do íon $[M+\text{Cd}]^{2+}$ gerou os íons $[M+2\text{H}]^{2+} = 432,7714$ Da e $[M+3\text{H}]^{3+} = 288,8480$ Da, fragmento referente a perda do cádmio. A fragmentação do íon $[M+\text{Zn}]^{2+}$ gerou o íon $[M+3\text{H}]^{3+} = 288,8406$ Da, fragmento referente a perda do zinco. Este fato indica que tanto o Cd como o Zn possivelmente estão ligados ao peptídeo.

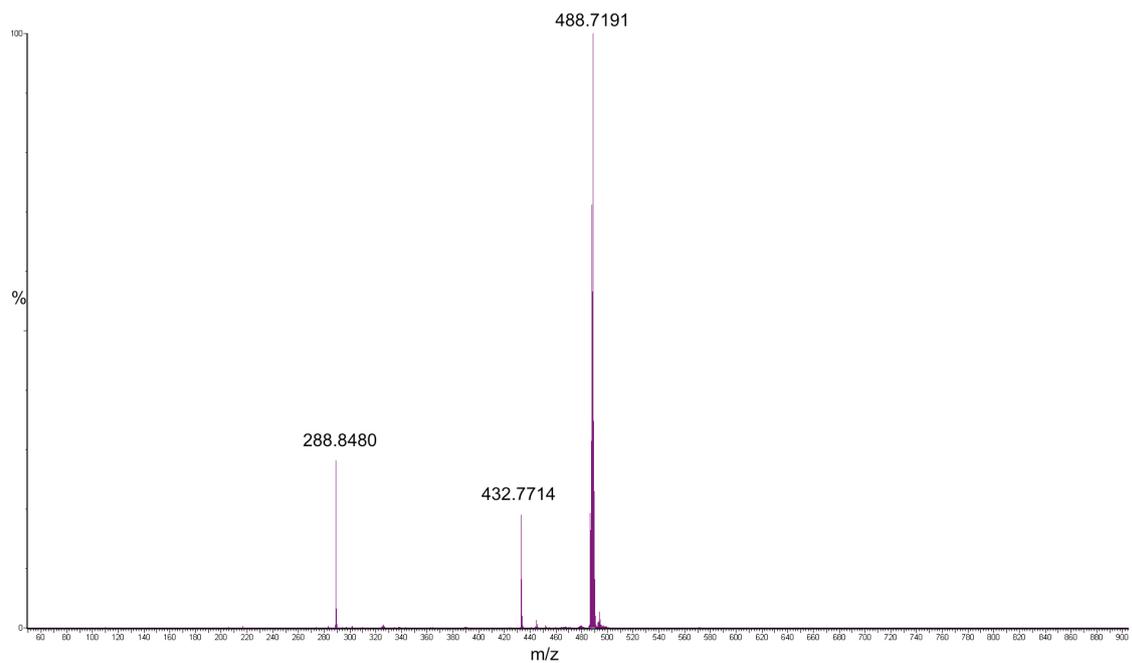


Figura 111: Espectro de MS/MS referente ao íon precursor $[M+Cd]^{2+} = 488,7191$ Da e os íons fragmentos gerados $[M+2H]^{2+} = 432,7714$ Da e $[M+3H]^{3+} = 288,8480$ Da.

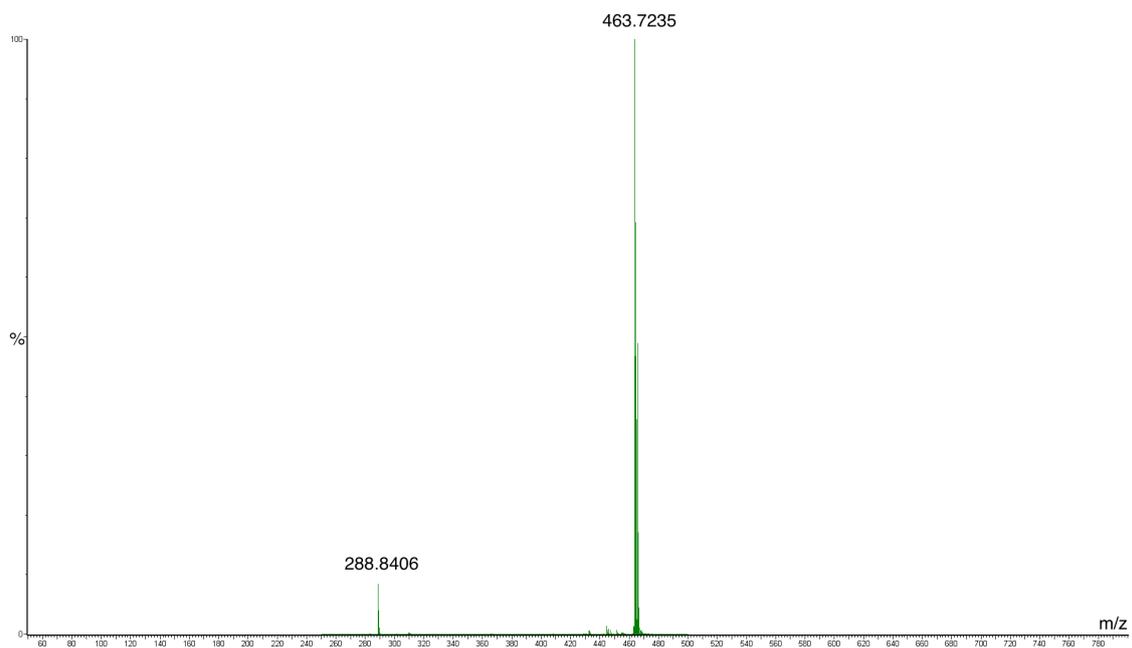


Figura 112: Espectro de MS/MS referente ao íon precursor $[M+Zn]^{2+} = 463,7235$ Da e o íon fragmento gerado $[M+3H]^{3+} = 288,8406$ Da.

Os espectros de Mobilidade Iônica referentes à massa do peptídeo livre ($[M+2H]^{2+} = 432,7714$ Da), peptídeo + Cd(II) ($[M+Cd]^{2+} = 488,7191$ Da) e peptídeo + Zn(II) ($[M+Zn]^{2+} = 463,7235$ Da), podem ser vistos nas Figuras 113, 114 e 115, respectivamente. Observou-se um *Drif Time* de 3,55, 3,85 e 3,82 ms

para o peptídeo, peptídeo + Cd(II) e peptídeo + Zn(II), respectivamente. O peptídeo na presença dos metais apresentou tempos semelhantes de separação, o que indica uma área de colisão semelhante para as duas estruturas, o que vai de acordo com as estruturas elucidadas por RMN. Entretanto, o peptídeo livre apresentou um menor tempo de separação quando comparado na presença dos metais, o que indica diferença nas áreas de colisão para as estruturas, sugerindo que o peptídeo na presença dos metais apresentariam uma conformação mais estendida do que o peptídeo livre. Este fato também vai de acordo com as estruturas elucidadas por RMN.

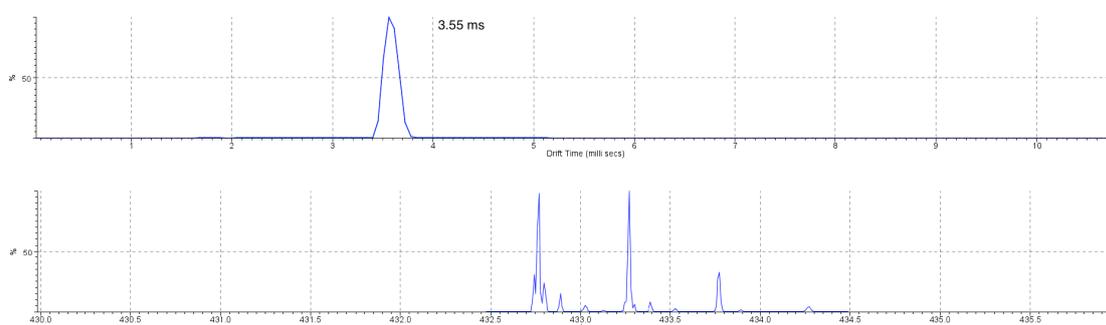


Figura 113: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo livre, mostrando um *Drift Time* de 3.55 ms.

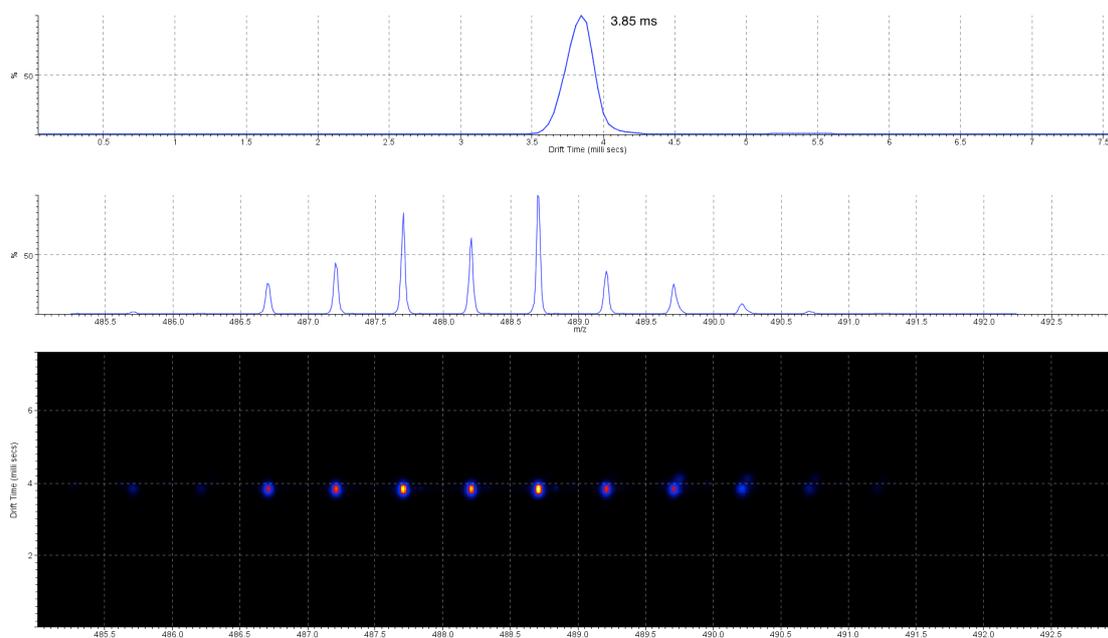


Figura 114: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo + cádmio, mostrando um *Drift Time* de 3.85 ms.

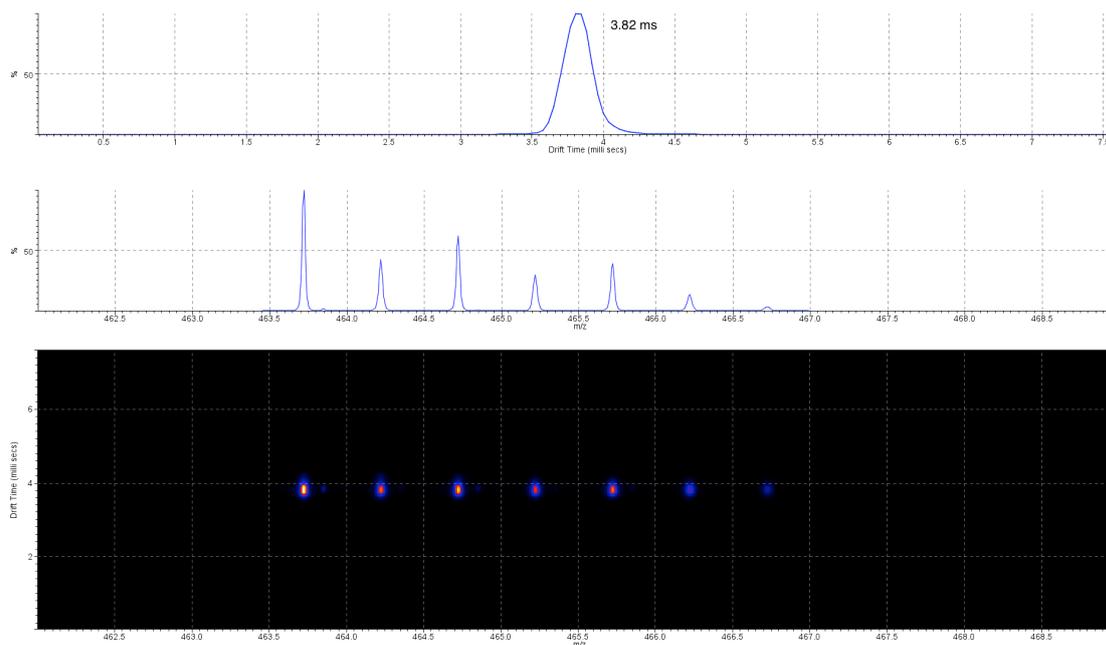


Figura 115: Espectro de Mobilidade Iônica para o peptídeo + zinco, mostrando um *Drift Time* de 3.82 ms.

As mobilidades iônicas para as fragmentações (MS/MS) dos íons $[M+Cd]^{2+} = 488,7191$ Da e $[M+Zn]^{2+} = 463,7235$ Da podem ser vistos nas Figuras 116 e 117, respectivamente. Foi possível observar grande diferença de mobilidade entre íons duplamente carregados e triplamente carregados. Íons com três cargas irão sofrer maior influência do campo elétrico do que os íons com duas cargas. Com isso, íons triplamente carregados apresentam menor *drift time*.

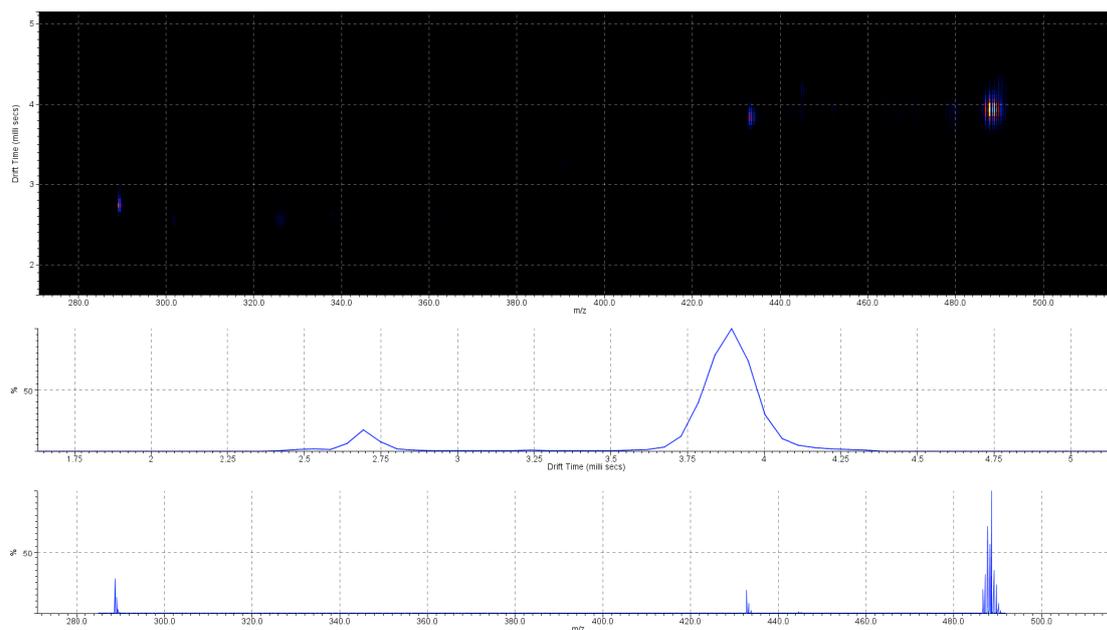


Figura 116: Espectro de Mobilidade Iônica para a fragmentação do íon $[M+Cd]^{2+} = 488,7191$ Da (próximo a 3,8 ms) em que é possível observar a mobilidade do íon $[M+3H]^{3+} = 288,8480$ Da (próximo a 2,7 ms).

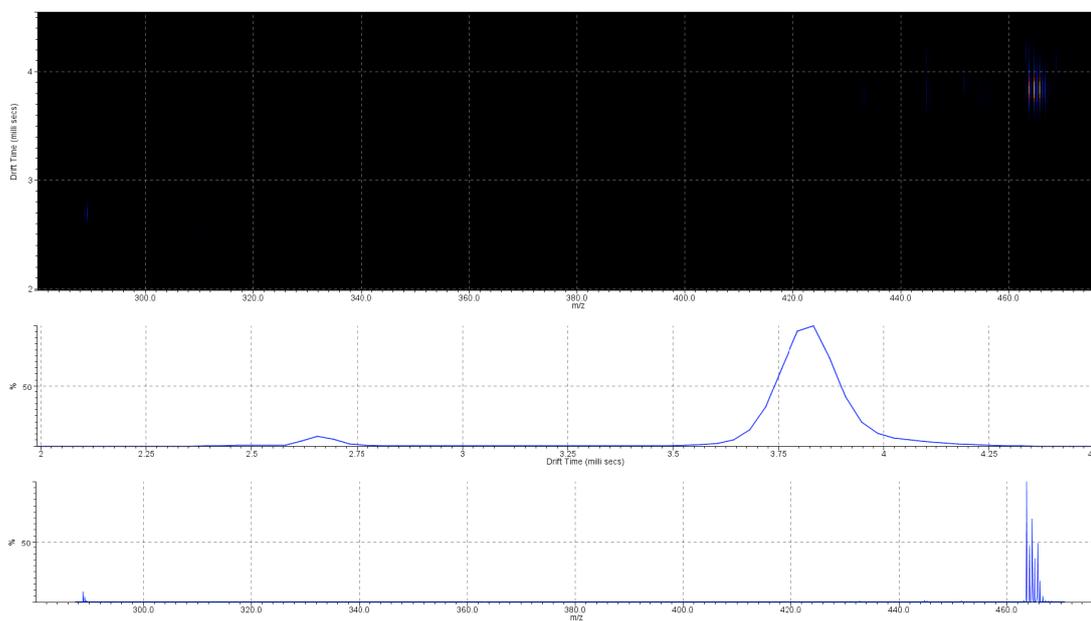


Figura 117: Espectro de Mobilidade Iônica para a fragmentação do íon $[M+Zn]^{2+} = 463,7235$ Da (próximo a 3,8 ms) em que é possível observar a mobilidade do íon $[M+3H]^{3+} = 288,8480$ Da (próximo a 2,7 ms).

3.5 – Conclusão

Pela síntese do peptídeo em fase sólida, juntamente com a etapa de purificação foi possível obter maiores quantidades desta biomolécula, o que viabilizou determinar sua estrutura tridimensional e também realizar estudos de interação com metais e gases.

A Espectrometria de Massa possibilitou caracterizar o peptídeo sintético, caracterizar as frações observadas no processo de purificação para identificar a fração de interesse e também observar possíveis interações do peptídeo com zinco e cádmio por espectros de MS e MS/MS. Entretanto, não foi possível concluir acerca de interações do peptídeo com o CO₂ por esta técnica.

Pelos experimentos de RMN-¹H do peptídeo, e também deste em contato com Cd(II), Zn(II) e CO₂, foi possível observar variações em alguns valores de deslocamento químico, o que sugere que estes metais e gás influenciam na estrutura deste hexapeptídeo em solução.

A Ressonância Magnética Nuclear 2D, juntamente com os cálculos de mecânica molecular, possibilitaram determinar a estrutura tridimensional do peptídeo livre e também do mesmo em contato com zinco, cádmio e dióxido de carbono. As estruturas elucidadas apresentaram diferenças entre si, indicando que tanto estes metais quanto o CO₂ influenciaram na estrutura do peptídeo em solução.

Pelas estruturas calculadas e pelas variações nos valores de deslocamento químico, foram observadas possíveis interações do peptídeo com o cádmio e com o zinco na cadeia lateral da histidina-6. Observou-se também interação do peptídeo com CO₂ pelas argininas-2 e 5.

Variações nos valores de deslocamento químico do peptídeo em diferentes concentrações de cádmio e zinco permitiram calcular a constante de afinidade do peptídeo por esses metais, mostrando afinidade moderada.

Os experimentos de Mobilidade Iônica acoplado a Espectrometria de Massa mostram que o peptídeo apresenta uma conformação mais estendida quando em contato com o zinco e o cádmio, e conformação semelhante na presença desses metais.

Referências

- [1] Hancock, R. E. W.; Scott, M. G.; *PNAS*, **2000**, 97, 8856.
- [2] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt in *Fundamentos de Bioquímica*, 2 ed., Artmed, Porto Alegre, **2008**.
- [3] D. L. Nelson, M. M. Cox in *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4 ed, Freeman, New York, **2004**.
- [4] Brogden, K. A.; *Nature Reviews*, **2005**, 2, 238.
- [5] Zasloff, M.; *Nature*, **2002**, 415, 389.
- [6] Menezes, M. C.; Oliveira, A. K.; Melo, R. L.; Ferreira, M. L.; Rioli, V.; Balan, A.; Leme, A. F. P.; Serrano, S. M. T.; *Biochimie*, **2011**, 93, 345.
- [7] Goldberg, J. S.; *Perspectives in Medical Chemistry*, **2010**, 4, 1.
- [8] Zhang, T.; Li, Y.; Miao, M.; Jiang, B.; *Food Chemistry*, **2011**, 128, 28.
- [9] Verly, R. M.; Moraes, C. M.; Resende, J. M.; Aisenbrey, C.; Bemquerer, M. P.; Veloso, D. P.; Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Bechinger, B.; *Biophysical Journal*, **2009**, 96, 2194.
- [10] C. Dass, in *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, 1 ed., Wiley, New Jersey, **2007**.
- [11] Finehout, E. J.; Lee, K. H.; *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **2004**, 32(2), 93.
- [12] Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A.; *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, 70, 437.
- [13] Karas, M.; Hillenkanp, F.; *Analytical Chemistry*, **1988**, 60, 2299.
- [14] Dekker, J. P.; Branda, J. A.; *Clinical Microbiology Newsletter*, **2011**, 33(12), 87.
- [15] Bateson, H.; Saleem, S.; Loadman, P. M.; Sutton, C. W.; *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **2011**, 64(3), 197.
- [16] E. Hoffmann, V. Stroobant, in *Mass spectrometry: principles and applications*, 3 ed, Wiley, London, **2007**.
- [17] Fen, J. B.; Man, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.; *Science*, **1989**, 246, 64.
- [18] R. B. Cole, in *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, 2 ed, Wiley, New Jersey, **2010**.

- [19] Biemann, K.; Papayannopoulos, I. A.; *Ace. Chem. Res.*, **1994**, 27, 370.
- [20] Cantu, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S.; *Quim. Nova*, **2008**, 31(3), 669.
- [21] Cuyckens, F.; Wassvik, C.; Mortishire-Smith, R. J.; Tresadern, G.; Campuzano, I.; Claereboudt, J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2011**, 25, 3497.
- [22] Bohrer, B. C.; Merenbloom, S. I.; Koeniger, S. L.; Hilderbrand, A. E.; Clemmer, D. E.; *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2008**, 1, 293.
- [23] Hana, F.; Dua, Y.; Chenga, S.; Zhoua, Q.; Chena, C.; Houa, K.; Wanga, W.; Lia, H.; *International Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 309,13.
- [24] Liu, Y.; Valentine, S. J.; Counterman, A. E.; Hoaglund, C. S.; Clemmer, D. E.; *Analytical Chemistry News & Features*, **1997**, 1, 728.
- [25] Harvey, S. R.; MacPhee, C. E.; Barran, P. E.; *Methods*, **2011**, 54, 454.
- [26] Ruotolo, B. T.; Tate, C. C.; Russell, D. H.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15, 870.
- [27] Williams, J. P.; Lough, J. A.; Campuzano, I.; Richardson, K.; Sadler, P. J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2009**, 23, 3563.
- [28] Kay, L. E.; *Journal of Magnetic Resonance*, **2011**, 213, 492.
- [29] Sugawara, M.; Resende, J. M.; Moraes, C. M.; Marquette, A.; Chich, J. F.; Metz-Boutigue, M. H.; Bechinger, B.; *The FASEB Journal*, **2010**, 24, 1737.
- [30] Bax, A.; Davis, D. G.; *J. Magn. Res.*, **1985**, 65, 355.
- [31] J. K. M. Sanders, B. K. Hunter, in *Modern NMR Spectroscopy*, 2 ed, Oxford, New York, **1993**.
- [32] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, in *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7 ed, LTC, Rio de Janeiro, **2007**.
- [33] K. Wuthrich, in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley Interscience Publication, New York, **1986**.
- [34] Wilker, W.; Leibfritz, D.; Kerssebaum, R.; Bernel W.; *Magn. Reson. Chem.*, **1993**, 31, 287.
- [35] A. M. R. Gonsalves, T. M. V. D. Pinho e Melo, in *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, Universidade de Coimbra, Coimbra, **2007**.
- [36] Dorome, A. E.; Williamson, M. P.; *J. Magn. Reson.*, **1990**, 88, 177,

- [37] Piantini, U.; Sorensen, O. W.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1982**, 104, 6800.
- [38] A. E. Derome, in *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*, Pergamon, Oxford, **1987**.
- [39] Kumar, A.; Ernst, R. R.; Wuthrich, K.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1980**, 95, 1.
- [40] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan, in *Introdução à Espectroscopia*, 4 ed, Cengage Learning, São Paulo, **2010**.
- [41] R. K. Harris, in *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Longman Scientific & Technical, New York, **1986**.
- [42] G. S. Rule, T. K. Hitchens, in *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, Springer, Dordrecht, **2006**.
- [43] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, M. Rance, N. J. Skelton, in *Protein NMR Spectroscopy*. 2 ed, Elsevier, London, **2007**.
- [44] Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M.; *Biochemistry*, **1992**, 31, 1647.
- [45] Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D.; *Journal of Biomolecular NMR*, **1995**, 5, 67.
- [46] Hung, L. H.; Samudrala, R.; *Protein Sci.*, **2003**; 12, 288.
- [47] Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M.; *J Mol Biol.*, **1991**, 222.
- [48] Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornileseu, G.; *J. Biomol NMR*, **2009**, 44, 213.
- [49] G. S. Rule, T. K. Hitchens, in *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*, 1 ed, Springer, Dordrecht, **2006**.
- [50] Son, W.; Jang, S.; Shin, S.; *J. Mol. Model.*, **2012**, 18, 213.
- [51] Kannan, S.; Zacharias, M.; *Journal of Structural Biology*, **2009**, 166, 288.
- [52] Mori, T.; Okamoto, Y.; *J. Chem. Phys.*, **2009**, 131, 165103.
- [53] Bruschiweiler, R.; *Proteins: Structure, Function, and Genetics*; **2003**, 50, 26.
- [54] Wermelinger, L. S.; Geraldo, R. B.; Frattani, F. S.; Rodrigues, C. R.; Juliano, M. A.; Castro, H. C.; Zingali, R. B.; *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2009**, 482, 25.
- [55] Ruoslahti, E.; *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1996**, 12, 697.

- [56] Casa, M. S. D.; Azevedo, I. J.; Butera, D.; Clissa, P. B.; Lopes, D. S.; Serrano, S. M. T.; Pimenta, D. C.; Magalhães, G. S.; Ho, L. P.; Silva, A. M. M; *Toxicon*, **2011**, 57, 125.
- [57] Chen, C. Y.; Shiu, J. H.; Hsieh, Y. H.; Liu, Y. C.; Chen, Y. C.; Chen, Y. C.; Jeng, W. Y.; Tang, M. J.; Lo, S. J.; Chuang, W. J.; *Proteins*, **2009**, 76, 808.
- [58] Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D.; *Science*, **1987**, 238, 491.
- [59] Hantgan, R. R.; Stahle, M. C.; *Biochemistry*, **2009**, 48, 8355.
- [60] Oyama, E.; Furudate, N.; Senuki, K.; Takahashi, H.; *Toxicon*, **2009**, 53, 706.
- [61] Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; *The Journal of Biological Chemistry*, **1987**, 262, 17294.
- [62] Liu, L.; Yang, X. W.; Chen, W. Q.; Tang, J. G.; *Letters in Peptide Science*, **2002**, 9, 179.
- [63] Silva, M. C.; Sousa, E.; Duarte, B.; Marques, F. Ribeiro, L. M. C.; Pinto, M. M. M.; *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46, 2347.
- [64] Ghatak, S. B.; Dhamacha, P. S.; Bhadada, S. V.; Panchal, S. J.; *European Journal of Pharmacology*, **2011**, 659, 213.
- [65] Gonzalez, J. F. V.; Fuster, V.; Badimon, J. J.; *European Heart Journal*, **2004**, 25, 1197.
- [66] Klomkloa, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H.; Chaijan, M.; *Food Chemistry*, **2011**, 129, 1348.
- [67] Pereira, K. R. B.; Botelho-Júnior, S.; Domingues, D. P.; Machado, O. L. T.; Oliveira, A. E. A.; Fernandes, K. V. S.; Madureira, H. C.; Pereira, T. N. S.; Jacinto, T.; *Phytochemistry*, **2011**, 72, 1955.
- [68] Swedberg, J. E.; Veer, S. J.; Sit, K. C.; Reboul, C. F.; Buckle, A. M.; Harris, J. M.; *Plos one*, **2011**, 6(4), 19302.
- [69] Luckett, S.; Garcia, R. S.; Barker, J. J.; Konarev, A. V.; Shewry, P. R.; Clarke, A. R.; Brady, R. L.; *J. Mol. Biol.*, **1999**, 290, 525.
- [70] Lee, K. J.; Kim, J. B.; Ha, B. K.; Kim, S. H.; Kang, S. Y.; Lee, B. M., Kim, D. S.; *Amino Acids*, **2011**, 15, 1.
- [71] Adachi, K.; Fukumorita, K.; Araki, M.; Zaima, N.; Chiba, S.; Kishimura, H.; Saeki, H.; *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 9001.
- [72] Ruan, J. J.; Zhou, M. L.; Chen, H.; Shao, J. R.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2011**, 0, 1.

- [73] W. C. Chan, P. D. White, in *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, 1 ed., PAS, Oxford, **2000**.
- [74] N. L. Benoiton, in *Chemistry of Peptide Synthesis*, 1 ed., Taylor and Francis, Boca Raton, **2005**.
- [75] Fields, G. B.; Noble, R. L.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, 35, 161.
- [76] Carpino, L. A.; Han, G. Y.; *J. Org. Chem.*; **1972**, 37(22), 3404.
- [77] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.; *Analytical Biochemistry*, **1970**, 34, 595.
- [78] Troll, W.; Cannan, R. K.; *The Journal of Biological Chemistry*, **1952**, 1, 803.
- [79] Marquardt, M.; Eifler-Lima, V. L.; *Química Nova*, **2001**, 24(6), 846.
- [80] N. C. C. R. Mundim, *Prospecção de Bradicinina de anfíbio do gênero Phyllomedusa*, Dissertação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, **2008**.
- [81] Brand, G. D.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Albuquerque, S.; Prates, M. V.; Azevedo, R. B.; Carregaro, V.; Silva, J. S.; Sa, V. C. L.; Branda, R. A.; Bloch Jr, C.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277(51), 49332.
- [82] Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Rodrigues, M. I. S.; Prates, M. V.; Brand, G. D.; Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Bocca, A. L.; Albuquerque, S.; Bloch Jr, C.; *Peptides*, **2005**, 26, 565.
- [83] Finkina, E. I.; Balandin, S. V.; Serebryakova, M. V.; Potapenko, N. A.; Tagaev, A. A.; Ovchinnikova, T. V.; *Biochemistry (Moscow)*, **2007**, 72(4), 430.
- [84] Neves-Ferreira, A. G. C.; Perales, J.; Fox, J. W.; Shannon, J. D.; Makino, D. L.; Garratt, R. C.; Domont, G. B.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277(15), 13129.
- [85] Levitt, M. H.; *Progress in NMR Spectroscopy*, **1986**, 18, 61.
- [86] Hwang, T. L.; Shaka, A. J.; *J. Magn. Reson.*, **1995**, 112, 275.
- [87] Delaglio, F.; Grzesiek, S.; G. W. Vuister; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A.; *Journal of Biomolecular NMR*, **1995**, 6, 277.
- [88] Kirby, N. I.; DeRose, E. F.; London, R. E.; Mueller, G. A.; *Bioinformatics*, **2004**, 20(7),1.
- [89] Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren G. L.; *Acta Cryst.*, **1998**, 54, 905.

- [90] Brunger, A. T.; Nat. Protoc.; **2007**, 2, 2728.
- [91] Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A.; *J. Biomol. NMR*, **2009**, 44, 213.
- [92] Koradi, R.; Billeter, M.; Wuthrich, K.; *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14(1), 51.
- [93] Jung, A.; Bamann, C.; Kremer, W.; Kalbitzer, H. R.; Brunner, E.; *Protein Science*, **2004**, 13, 342.
- [94] Kim, J.; Hong, S. Y.; Park, H.; Kim, D.; Lee, W.; *Mol. Cells*, **2005**, 19,(2), 205.
- [95] Welsh, D. J.; Smith, D. K.; *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9(13), 4795.
- [96] Plow, E. F.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; Marguerie, G. A.; Ginsberg, M. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1985**, 82, 8057.
- [97] Scarborough, R. M.; Naughton, M. A.; Teng, W.; Rose, J. W.; Phillips, D. R.; Nannizzi, L.; Arfsten, A.; Campbell, A. M.; Charo, I. F.; *The Journal Biological Chemistry*, **1993**, 268(2), 1066.
- [98] Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M.; *Química nova*, **2004**, 37(5), 781.
- [99] Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F.; *Chemical Reviews*, **2009**, 109, 2455.
- [101] Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 385.
- [100] Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
- [102] McCaldin, D. J.; *Chemical Reviews*, **1959**, 1, 39.
- [103] Montalbetti, C. G. N.; Falque, V.; *Tetrahedron*, **2005**, 740, 10827.
- [104] Najera, C.; *Synlett*, **2002**, 9, 1388.
- [105] H. H. Jensen, in *Lecture Notes on Peptide Synthesis*. Disponível em: <http://www.chem.au.dk/~www/weeknotes/week_3251.pdf>, acesso em 08 de Abril de **2011**.
- [106] Brady, S. F.; Hirschmann, R.; Veber, D. F.; *J. Org. Chem.*, **1977**, 42(1), 143.
- [107] Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F.; *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34(49), 7829.
- [108] Shibue, M.; Mant, C. T.; Hodges, R. S.; *Journal of Chromatography*, **2005**, 1080, 58.

- [109] F. M. Lanças, in *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*, 1 ed., Átomo, São Paulo, **2009**.
- [110] C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato. in *Fundamentos de Cromatografia*, 1 ed., Unicamp, São Paulo, **2009**.
- [111] Conlon, J. M.; *Nature Protocols*, **2007**, 2(1), 191.
- [112] Yan, X.; Liu, H.; Yang, X.; Che, Q.; Liu, R.; Yang, H.; Liu, X.; You, D.; Wang, A.; Li, J.; Lai, R.; *Amino Acids*, **2011**, 17, 1.
- [113] Li, J.; Zhang, C.; Xu, X.; Wang, J.; Yu, H.; Lai, R.; Gong, W.; *FASEB J.*, **2007**, 21(10), 2466.
- [114] Wang, M.; Wang, L.; Chen, T.; Walker, B.; Zhou, M.; Sui, D.; Conlon, J. M.; Shaw, C.; *Peptides*, **2012**, 33(2), 245.
- [115] Malvin, G. M.; Hlastala, M. P.; *American Journal of Physiology*, **1986**, 251(5), 20.
- [116] Simmaco, M.; Mignogna, G.; Barra, D.; *Biopolymers*, **1998**, 47, 435.
- [117] Chanana, M.; Correa-Duarte, M. A.; Liz-Marzán, L. M.; *Small*, **2011**, 7(18), 2650.
- [118] Shin, B.; Saxena, S.; *J. Phys. Chem. A.*, **2011**, 115(34), 9590.
- [119] Palmieri, L. C.; Lima, L. M. T. R.; Freire, J. B. B.; Bleicher, L.; Polikarpov, I.; Almeida, F. C. L.; Foguel, D.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285(41), 31731.
- [120] Syme, C. D.; Viles, J. H.; *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1764, 246.
- [121] Dunn, M. F.; *BioMetals*, **2005**, 18, 295.
- [122] Jancsó, A.; Kolozsi, A.; Gyurcsik, B.; Nagy, N. V.; Gajda, T.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2009**, 103, 1634.
- [123] Chaikittisilp, W.; Lunn, J. D.; Shantz, D. F.; Jones, C. W.; *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 10556.
- [124] Cotelesage, J. J. H.; Puttick, J.; Goldie, H.; Rajabi, B.; Novakovski, B.; Delbaere, L. T. J.; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2007**, 39, 1204.
- [125] Cundari, T. R.; Wilson, A. K.; Drummond, M. L.; Gonzalez, H. E.; Jorgensen, K. R.; Payne, S.; Braunfeld, J.; De Jesus, M.; Johnson, V. M.; *J. Chem. Inf. Model.*, **2009**, 49(9), 2111.

- [126] Magyar, J. S.; Godwina, H. A.; *Analytical Biochemistry*, **2003**, 320, 39.
- [127] Goutelle S.; Maurin M.; Rougier F.; Barbaut X.; Bourguignon L.; Ducher M.; Maire P.; *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2008**, 22(6), 633.
- [128] Weiss, J. N.; *FASEB J.*, **1997**, 11(11), 835.
- [129] Paksi, Z.; Jancsó, A.; Pacello, F.; Nagy, N.; Battistoni, A.; Gajda, T.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2008**, 102, 1700.
- [130] Mekmouche, Y.; Coppel, Y.; Hochgräfe, K.; Guilloreau, L.; Talmard, C.; Mazarguil, H.; Faller, P.; *ChemBioChem*, **2005**, 6(9), 1663.
- [131] Magalhães, B. S.; Melo, J. A. T.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Vinecky, F.; Barbosa, E. A.; Verly, R. M.; Mehta, A.; Nicoli, J. R.; Bemquerer, M. P.; Andrade, A. C.; Bloch Jr, C.; *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008**, 377, 1057.
- [132] Prates, M. V.; Sforca, M. L.; Regis, W. C. B.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Pertinhez, T. A.; Araujo, A. L. T.; Azevedo, R. B.; Spisni, A.; Bloch Jr, C.; *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(13), 13018.
- [133] Brand, G. D.; Krause, F. C.; Silva, L. P.; Leite, J. R. S. A.; Melo, J. A. T.; Prates, M. V.; Pesquero, J. B.; Santos, E. L.; Nakaie, C. R.; Costa-Neto, C. M.; Bloch Jr.C.; *Peptides*, **2006**, 27, 2137.
- [134] Langsdorf, M.; Ghassempour, A.; Rompp, A.; Spengler, B.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**, 24, 2885
- [135] M. T. Q. Magalhães, *Caracterização Estrutural e Funcional de Fenilseptinas: Peptídeos com atividades antimicrobiana e químico-sensorial presentes na secreção cutânea de *Hypsiboas punctatus**. Tese de Doutorado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, **2011**.

Anexos

Anexo 1

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanina - A</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginina - R</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagina - N</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Ácido Aspártico - D</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cisteína - C</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Ácido Glutâmico - E</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamina - Q</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glicina - G</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N} \end{array}$ <p>Histidina - H</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucina - I</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucina - L</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Lisina - K</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Metionina - M</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Fenilalanina - F</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7\text{N} \end{array}$ <p>Prolina - P</p>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Serina - S</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Tirosina - T</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} \end{array}$ <p>Triptofano - W</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valina - V</p>	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tirosina - Y</p>

Anexo 1 – Estruturas e nomenclaturas para os vinte diferentes aminoácidos.

Anexo 2

Construção de bibliotecas de cDNAs codificadores de peptídeos antimicrobianos¹³⁵

Extração do RNA total e síntese da cDNA

Amostras (10 mg) do tecido dorsal de *H. punctatus* contendo as glândulas granulares foram pulverizadas com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo. O tecido animal em pó foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL com 4 mL de solução de Trizol® (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade de RNA total foi determinada em espectrofotômetro e a integridade avaliada em gel de agarose desnaturante com formaldeído. Uma fração enriquecida com poli-A+ foi obtida por RT-PCR a partir de 200 µg de RNA total, utilizando uma resina associada a oligo-dT do kit Oligotex® (QIAGEN®), conforme recomendações do fabricante. Foram utilizados 4 µg do RNA-poliA+ resultando na construção da biblioteca de cDNAs, utilizando a técnica de RT-PCR. A síntese de cDNA a partir de mRNA foi feita utilizando-se um oligonucleotídeo oligo-dT e uma transcriptase reversa (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante.

Amplificação dos cDNAs por PCR

Para identificar os genes codificadores dos peptídeos presentes em *H. punctatus* foi utilizada a técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia). Os cDNAs gerados foram submetidos a uma reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos. As reações foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 2 µg de cDNA, 10 mM de Tris- HCl pH 8,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 mM de cada dNTP, 500 nM de cada oligonucleotídeo e 0,1 U·µL⁻¹ de Taq DNA polimerase, para cada amostra de DNA.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf®) sob as seguintes condições: desnaturação prévia a 94°C por 2 min; repetição de 30 ciclos a 94°C por 45 s (desnaturação); anelamento dos oligonucleotídeos por 45 s; 72°C por 2 min (extensão da DNA polimerase) e ao final uma extensão a 72°C por 5 min.

Clonagem dos produtos de PCR, transformação dos clones e purificação dos plasmídeos.

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados e visualizados por eletroforese em gel 0,8% (p/v) de agarose. Os fragmentos de DNA excisados do gel foram purificados utilizando-se o kit "GeneClean" (Bio 101 System). Os fragmentos purificados foram então ligados a 50 ng de vetor comercial pGEM-T easy (Promega), na razão molar de 3:1 (inserto:vetor), com 4 U/µL T4 DNA ligase e tampão 1×. Para a transformação do sistema de ligação em *Escherichia coli* por eletroporação foram utilizados tubos com alíquotas de 40 µL de células competentes de *E. coli* linhagem DH5a. O sistema de ligação foi adicionado às células e o conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta de eletroporação estéril de 0,1 cm e aplicou-se a corrente em um eletroporador Bio-Rad Gene Pulser TM com os seguintes parâmetros: 1,8 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 µF de capacitância.

Clones positivos foram inoculados em tubos de vidro contendo 3,5 mL de meio LB-amp e incubados por 16 h a 37°C em estufa a 300 rpm. Todo o material foi centrifugado e o DNA plasmidial foi extraído conforme protocolos padrões em biologia molecular e posteriormente armazenado a - 20°C.

Análise e alinhamento de sequências nucleotídicas e peptídicas.

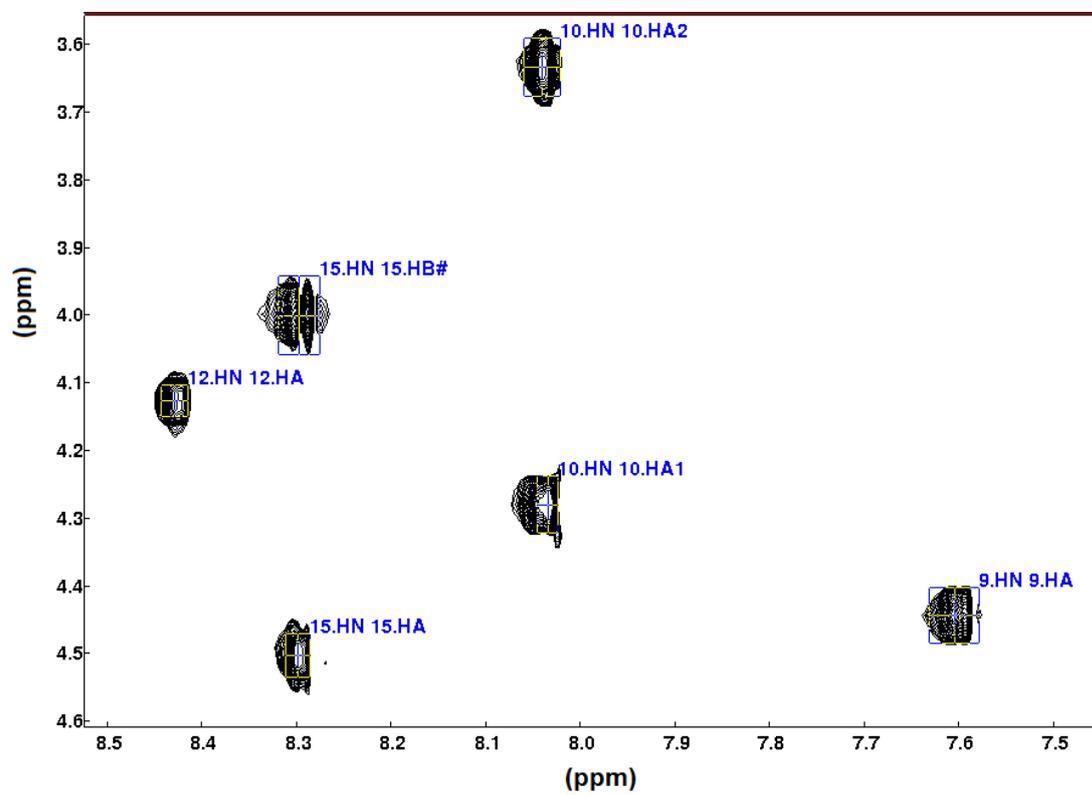
Os fragmentos clonados (500 ng de vetor) foram sequenciados em um sequenciador automático ABI, utilizando-se 4 pmols de oligonucleotídeos gerais T7, SP6, reverso e universal. As sequências obtidas foram submetidas a um banco dados de dados do GeneBank e SwissProt pelos programas “BLASTn” e “BLASTp”, pelo endereço eletrônico do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). A sequência consenso foi obtida pela análise dos alinhamentos múltiplos das sequências dos fragmentos gênicos, por meio dos programas “gelassemble” e “pileup” do GCG (Universtiy of Wisconsin), para determinação da sequência completa dos genes. A análise de domínios dos genes foi feita pelo programa “CDD-Search” utilizando-se o banco de domínios conservados (Conserved Domain Database), também do NCBI. As sequências de aminoácidos obtidas para os peptídeos foram submetidas ao banco dados do GeneBank e SwissProt pelo programa “BLASTp”. A massa molecular e ponto isoelétrico das proteínas preditas foram determinados por programas do “Expasy” (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html e <http://www.up.univ-mrs.fr/cgi-wabim/acompo-p.pl>).

Anexo 3

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.HN	7,083	6.HN	8,493	11.HN	7,449
1.CA	-	6.CA	57,128	11.CA	-
1.HA	4,230	6.HA	5,43	11.HA	4,716
1.CB	30,740	6.CB	40,787	11.CB	41,517
1.HB2	3,107	6.HB2	2,777	11.HB2	2,524
1.HB1	3,107	6.HB1	2,884	11.HB1	2,524
		6.CD1	139,719		
2.HN	-	6.HD1	6,938	12.HN	8,419
2.CA	62,047	6.CD2	139,719	12.CA	54,428
2.HA	4,463	6.HD2	6,938	12.HA	4,117
2.CB	69,959	6.CE1	109,851	12.CB	42,769
2.HB	4,216	6.HE1	6,74	12.HB2	1,114
2.CG2	21,532	6.CE2	109,851	12.HB1	1,62
2.HG21	1,182	6.HE2	6,74	12.CG	26,454
				12.HG	1,025
3.HN	8,807	7.HN	9,053	12.CD1	25,687
3.CA	45,558	7.CA	-	12.HD11	0,53
3.HA2	4,030	7.HA	4,875	12.CD2	22,523
3.HA1	4,189	7.CB	-	12.HD21	0,603
		7.HB	4,75		
4.HN	8,221	7.CG2	22,084	13.HN	8,821
4.CA	56,242	7.HG2	1,337	13.CA	59,211
4.HA	5,574			13.HA	4,058
4.CB	48,009	8.HN	9,269	13.CB	38,784
4.HB2	2,566	8.CA	61,061	13.HB	0,736
4.HB1	2,977	8.HA	4,293	13.CG1	26,429
		8.CB	62,655	13.HG1	0,784
5.HN	9,134	8.HB2	4,052	13.CD1	11,805
5.CA	-	8.HB1	4,052	13.HD1	0,571
5.HA	4,795			13.CG2	17,273
5.CB	31,012	9.HN	7,602	13.HG2	0,438
5.HB2	3,238	9.CA	55,914		
5.HB1	3,266	9.HA	4,433	14.HN	8,200
5.CD1	127,97	9.CB	32,705	14.CA	54,608
5.HD1	6,923	9.HB2	1,707	14.HA	5,056
5.CZ2	101,888	9.HB1	1,96	14.CB	46,400
5.HZ2	7,293	9.CG	24,954	14.HB2	2,726
5.CH2	116,72	9.HG1	1,431	14.HB1	2,967
5.HH2	6,919	9.HG2	1,494		
5.CZ3	120,725	9.CD	28,774	15.HN	8,297
5.HZ3	7,002	9.HD	1,687	15.CA	58,047
5.CE3	116,095	9.CE	41,915	15.HA	4,491
5.HE3	7,279	9.HE	3,003	15.CB	64,263
				15.HB2	3,977
		10.HN	8,033	15.HB1	3,977
		10.CA	45,277		
		10.HA2	3,623		
		10.HA1	4,272		

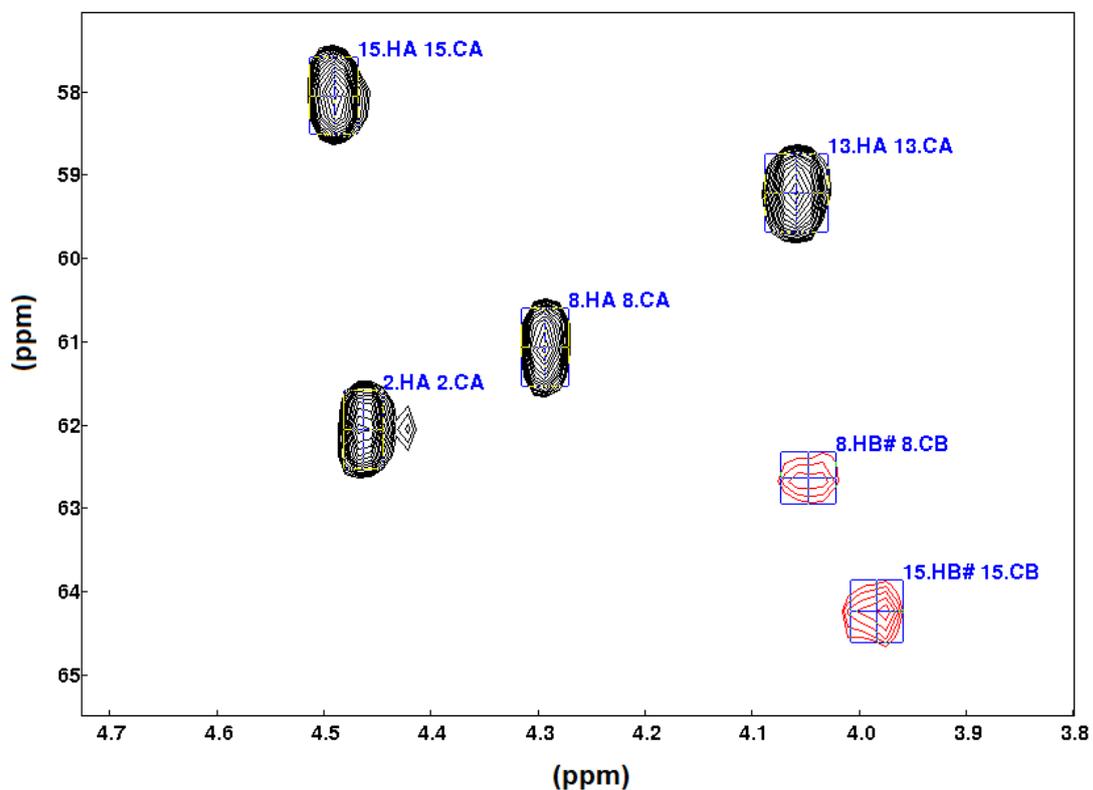
Anexo 3: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o peptídeo KGD.

Anexo 4



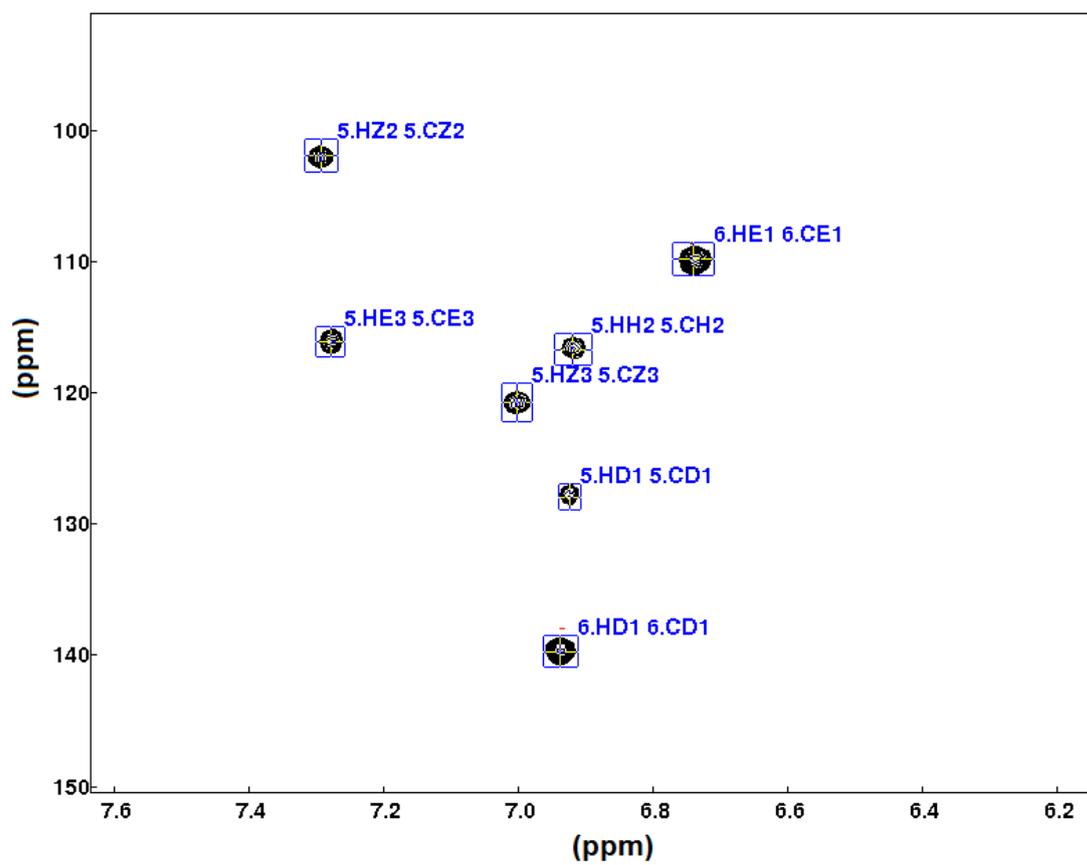
Anexo 4: Espectro TOCSY do peptídeo KGD, mostrando os sistemas de spins da glicina-10 e serina-15, além dos sinais referentes aos hidrogênios amídicos da lisina-9 e da leucina-12.

Anexo 5



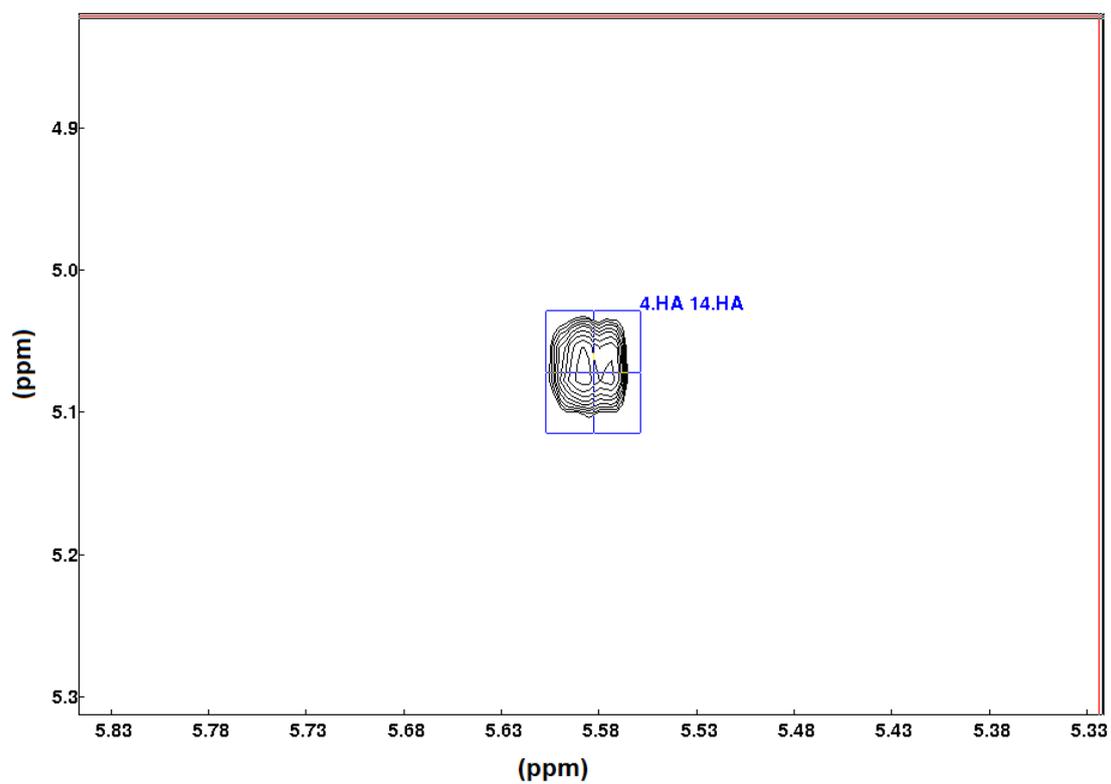
Anexo 5: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática referente ao peptídeo KGD. A cor vermelha representa sinal com valor de intensidade negativo no espectro (CH₂) e a cor preta representa sinal com valor positivo. Isso possibilita identificar os, por exemplo, os hidrogênios β (grupo CH₂) referente aos resíduos serina-8 e serina-15, observados no espectro acima.

Anexo 6

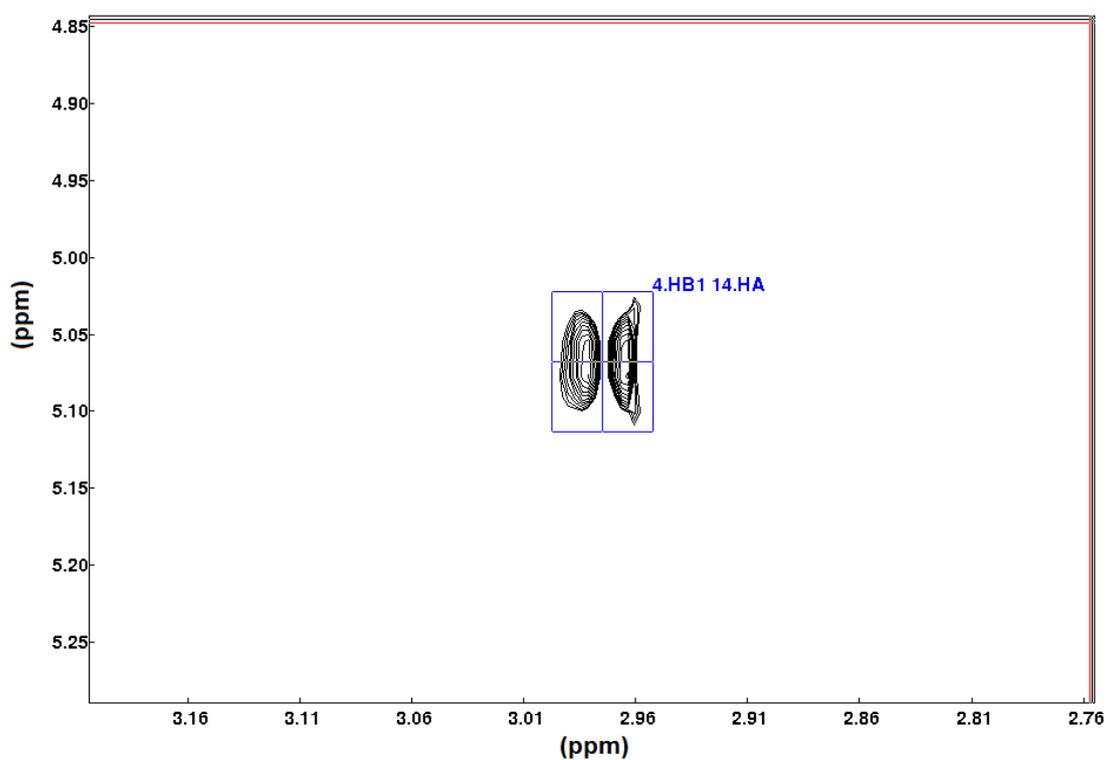


Anexo 6: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) referente à região aromática para o peptídeo KGD.

Anexo 7

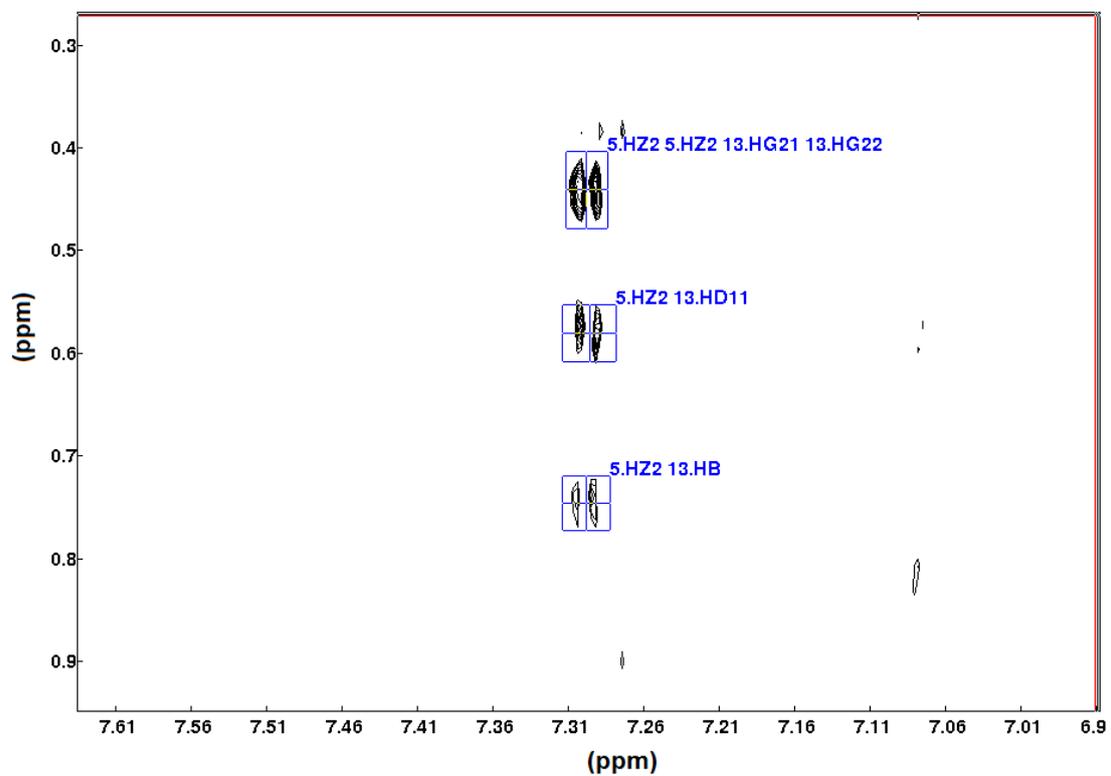


Anexo 7: Espectro de NOESY referente ao peptídeo KGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos cisteína-4 com cisteína-14.



Anexo 7: Espectro de NOESY referente ao peptídeo KGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos cisteína-4 com cisteína-14

Anexo 8



Anexo 8: Espectro NOESY referente ao peptídeo KGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos triptofano-5 com isoleucina-13.

Anexo 9

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.HN	-	6.HN	8,494	11.HN	7,482
1.CA	53,22	6.CA	50,943	11.CA	52,929
1.HA	4,297	6.HA	5,397	11.HA	4,730
1.CB	-	6.CB	41,154	11.CB	41,302
1.HB1	-	6.HB2	2,885	11.HB2	2,587
1.HB2	-	6.HB1	2,782	11.HB1	2,536
1.CD2	119,921	6.CD1	134,391		
1.HD2	7,197	6.HD1	6,949	12.HN	8,45
1.CE1	139,118	6.CD2	134,391	12.CA	49,337
1.HE1	8,441	6.HD2	6,949	12.HA	4,109
		6.CE1	116,687	12.CB	32,597
2.HN	8,684	6.HE1	6,75	12.HB2	1,100
2.CA	53,846	6.CE2	116,687	12.HB1	1,044
2.HA	4,500	6.HE2	6,75	12.CG	42,31
2.CB	58,700			12.HG	1,606
2.HB	4,206	7.HN	9,014	12.CD1	30,26
2.CG2	29,684	7.CA	-	12.HD11	0,125
2.HG21	1,234	7.HA	4,851	12.CD2	30,26
		7.CB	-	12.HD21	0,125
3.HN	8,722	7.HB	4,741		
3.CA	43,976	7.CG2	30,001	13.HN	8,799
3.HA2	4,054	7.HG2	1,337	13.CA	52,177
3.HA1	4,206			13.HA	4,063
		8.HN	9,253	13.CB	40,027
4.HN	8,270	8.CA	49,496	13.HB	0,740
4.CA	50,411	8.HA	4,294	13.CG1	27,144
4.HA	5,596	8.CB	54,24	13.HG1	0,436
4.CB	45,361	8.HB2	4,057	13.CD1	23,928
4.HB2	2,592	8.HB1	4,057	13.HD1	0,566
4.HB1	3,000			13.CG2	27,128
		9.HN	7,626	13.HG2	0,432
5.HN	9,16	9.CA	50,184		
5.CA	-	9.HA	4,428	14.HN	8,200
5.HA	4,79	9.CB	35,046	14.CA	-
5.CB	35,360	9.HB2	1,851	14.HA	5,088
5.HB2	3,267	9.HB1	1,851	14.CB	44,579
5.HB1	3,267	9.CG	33,21	14.HB2	2,757
5.CD1	127,382	9.HG	1,691	14.HB1	2,986
5.HD1	6,922	9.CD	35,33		
5.CZ2	111,99	9.HD	3,215	15.HN	8,310
5.HZ2	7,283			15.CA	51,454
5.CH2	120,757	10.HN	8,061	15.HA	4,501
5.HH2	6,912	10.CA	43,831	15.CB	55,172
5.CZ3	123,233	10.HA2	4,259	15.HB2	4,005
5.HZ3	6,997	10.HA1	3,643	15.HB1	4,005

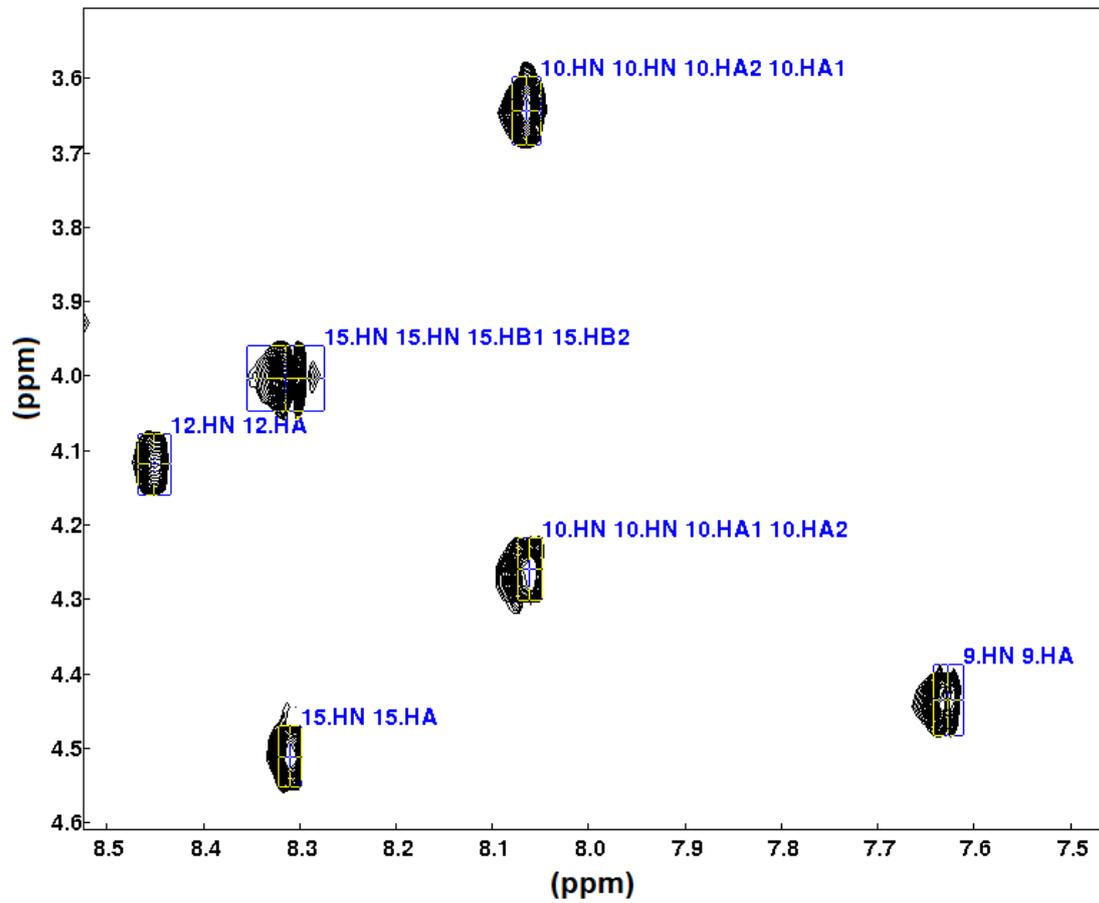
Anexo 9: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o peptídeo RGD.

Anexo 10

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.HN	-	6.HN	8,500	11.HN	7,579
1.CA	54,740	6.CA	57,199	11.CA	-
1.HA	4,294	6.HA	5,383	11.HA	4,77
1.CB	-	6.CB	40,810	11.CB	41,14
1.HB1	-	6.HB2	2,885	11.HB2	2,585
1.HB2	-	6.HB1	2,786	11.HB1	2,635
1.CD2	115,367	6.CD1	139,381		
1.HD2	7,205	6.HD1	6,933	12.HN	8,509
1.CE1	147,557	6.CD2	139,381	12.CA	54,533
1.HE1	8,44	6.HD2	6,933	12.HA	4,104
		6.CE1	110,027	12.CB	42,645
2.HN	8,684	6.HE1	6,736	12.HB2	1,618
2.CA	62,013	6.CE2	110,027	12.HB1	1,618
2.HA	4,500	6.HE2	6,736	12.CG	26,508
2.CB	70,112			12.HG	1,07
2.HB	4,205	7.HN	9,043	12.CD1	25,709
2.CG2	21,585	7.CA	-	12.HD11	0,63
2.HG21	1,235	7.HA	4,880	12.CD2	25,709
		7.CB	-	12.HD21	0,63
3.HN	8,720	7.HB	4,749		
3.CA	45,511	7.CG2	22,11	13.HN	8,806
3.HA2	4,203	7.HG2	1,357	13.CA	59,235
3.HA1	4,052			13.HA	4,069
		8.HN	9,252	13.CB	38,894
4.HN	8,277	8.CA	60,732	13.HB	0,750
4.CA	56,255	8.HA	4,297	13.CG1	-
4.HA	5,595	8.CB	62,641	13.HG1	-
4.CB	47,889	8.HB2	3,974	13.CD1	11,925
4.HB2	3,003	8.HB1	3,974	13.HD1	0,584
4.HB1	2,596			13.CG2	17,296
		9.HN	7,876	13.HG2	0,447
5.HN	9,159	9.CA	-		
5.CA	-	9.HA	4,78	14.HN	8,207
5.HA	4,793	9.CB	29,026	14.CA	54,639
5.CB	31,057	9.HB2	3,149	14.HA	5,083
5.HB2	3,243	9.HB1	3,410	14.CB	46,507
5.HB1	3,243	9.CD2	112,824	14.HB2	2,98
5.CD1	127,829	9.HD2	7,336	14.HB1	2,98
5.HD1	6,921	9.CE1	145,333		
5.CZ2	102,112	9.HE1	8,579	15.HN	8,309
5.HZ2	7,294			15.CA	58,014
5.CH2	116,717	10.HN	8,122	15.HA	4,501
5.HH2	6,913	10.CA	45,487	15.CB	64,248
5.CZ3	120,844	10.HA2	3,655	15.HB2	3,999
5.HZ3	7,001	10.HA1	4,200	15.HB1	3,999
5.CE3	116,24				
5.HE3	7,271				

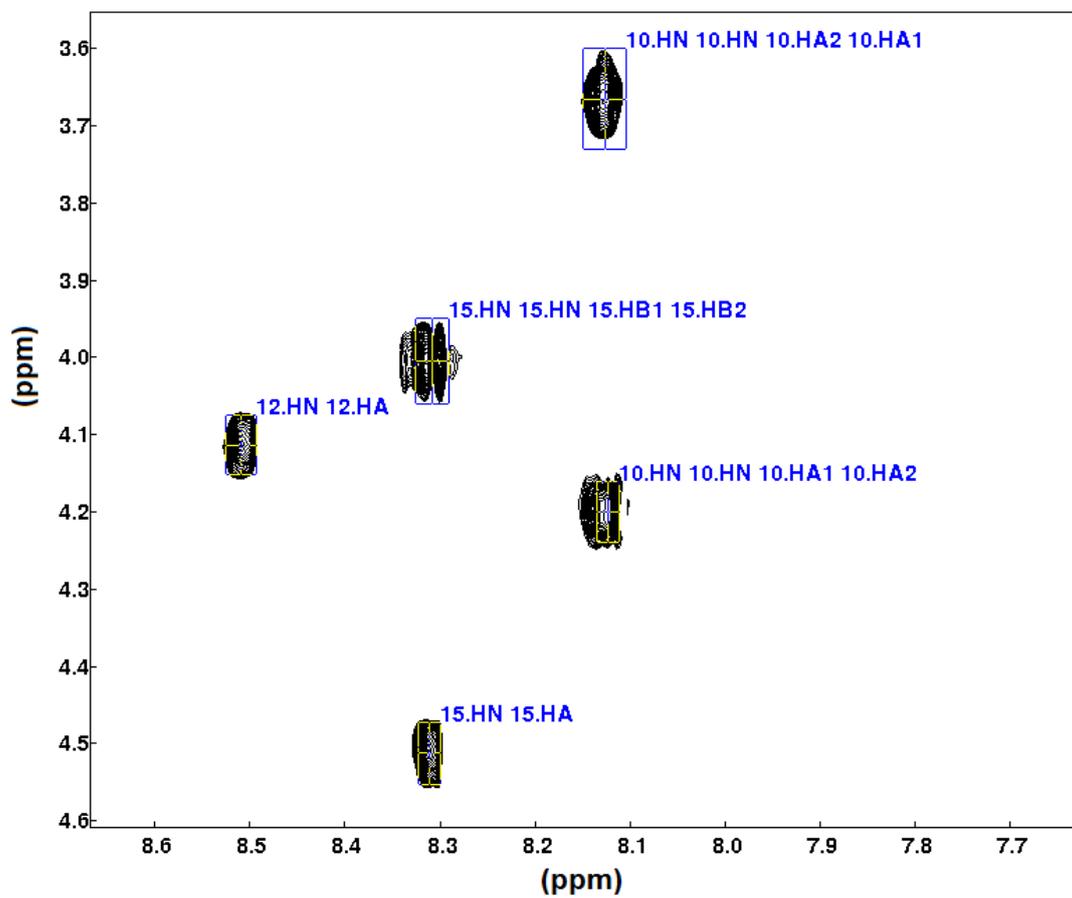
Anexo 10: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o peptídeo HGD.

Anexo 11



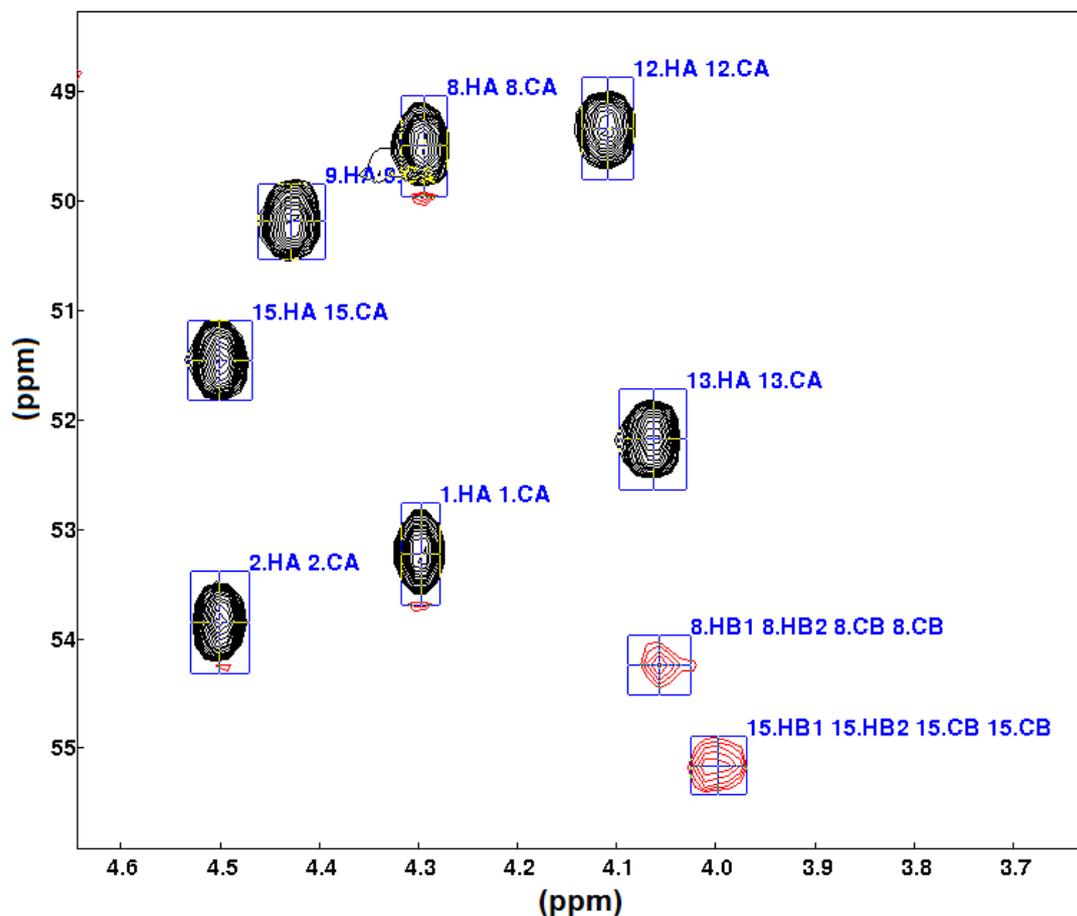
Anexo 11: Espectro TOCSY do peptídeo RGD, mostrando os sistemas de spins da glicina-10 e serina-15, além dos sinais referentes aos hidrogênios amídicos da lisina-9 e da leucina-12..

Anexo 12



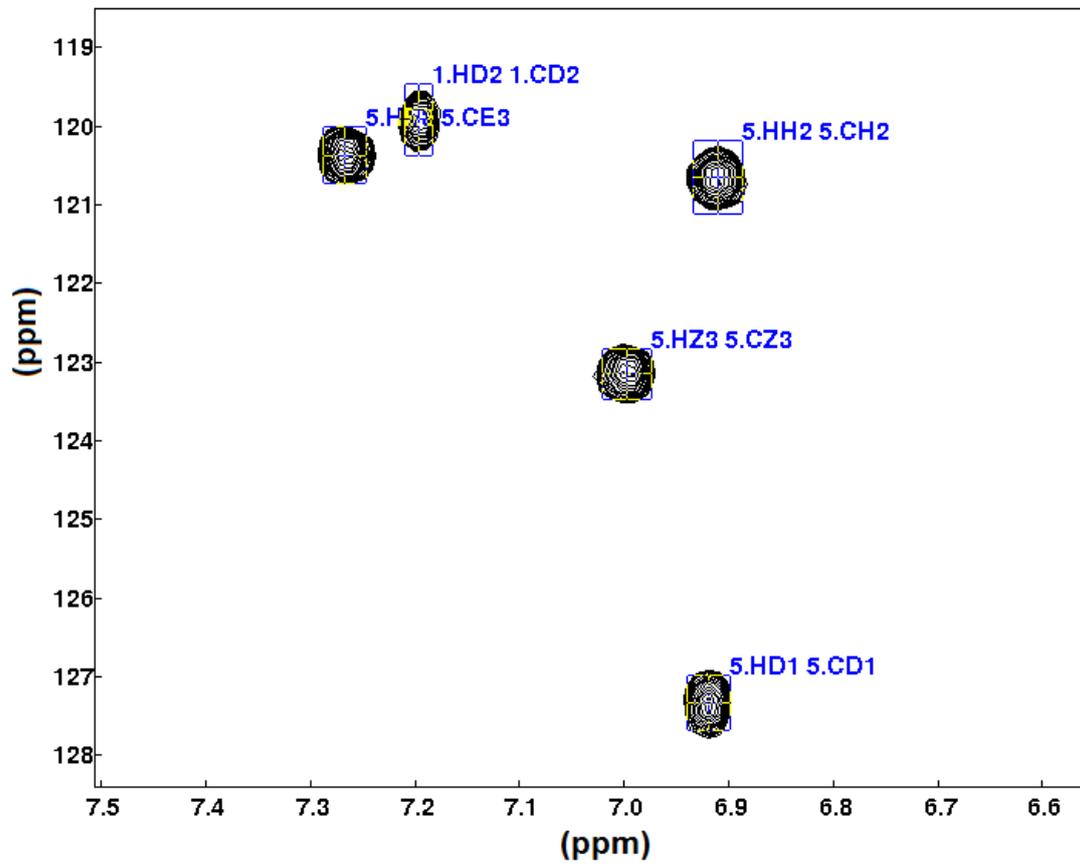
Anexo 12: Espectro TOCSY do peptídeo HGD, mostrando os sistemas de spins da glicina-10 e serina-15, além dos sinais referentes aos hidrogênios amídicos da lisina-9 e da leucina-12.

Anexo 13



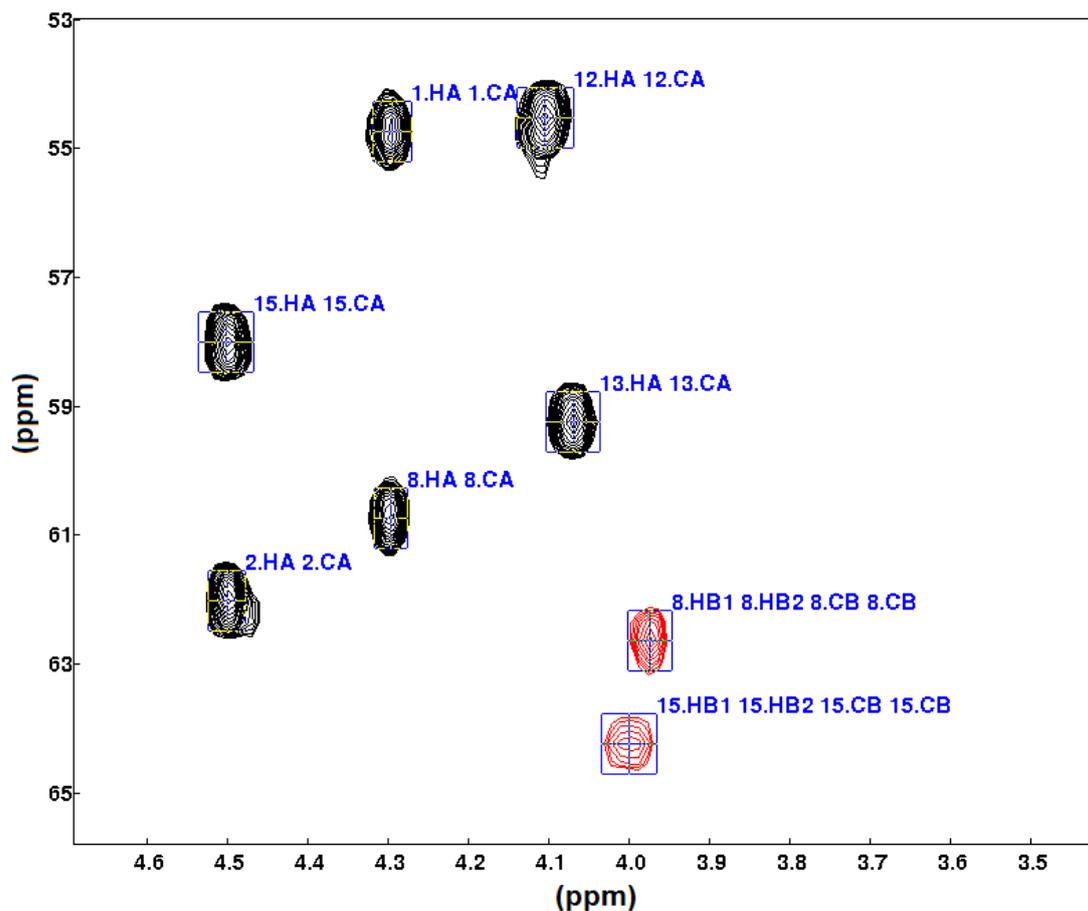
Anexo 13: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática referente ao peptídeo RGD. A cor vermelha representa sinal com valor de intensidade negativo no espectro (CH_2) e a cor preta representa sinal com valor positivo. Isso possibilita identificar os, por exemplo, os hidrogênios β (grupo CH_2) referente aos resíduos serina-8 e serina-15, observados no espectro acima.

Anexo 14



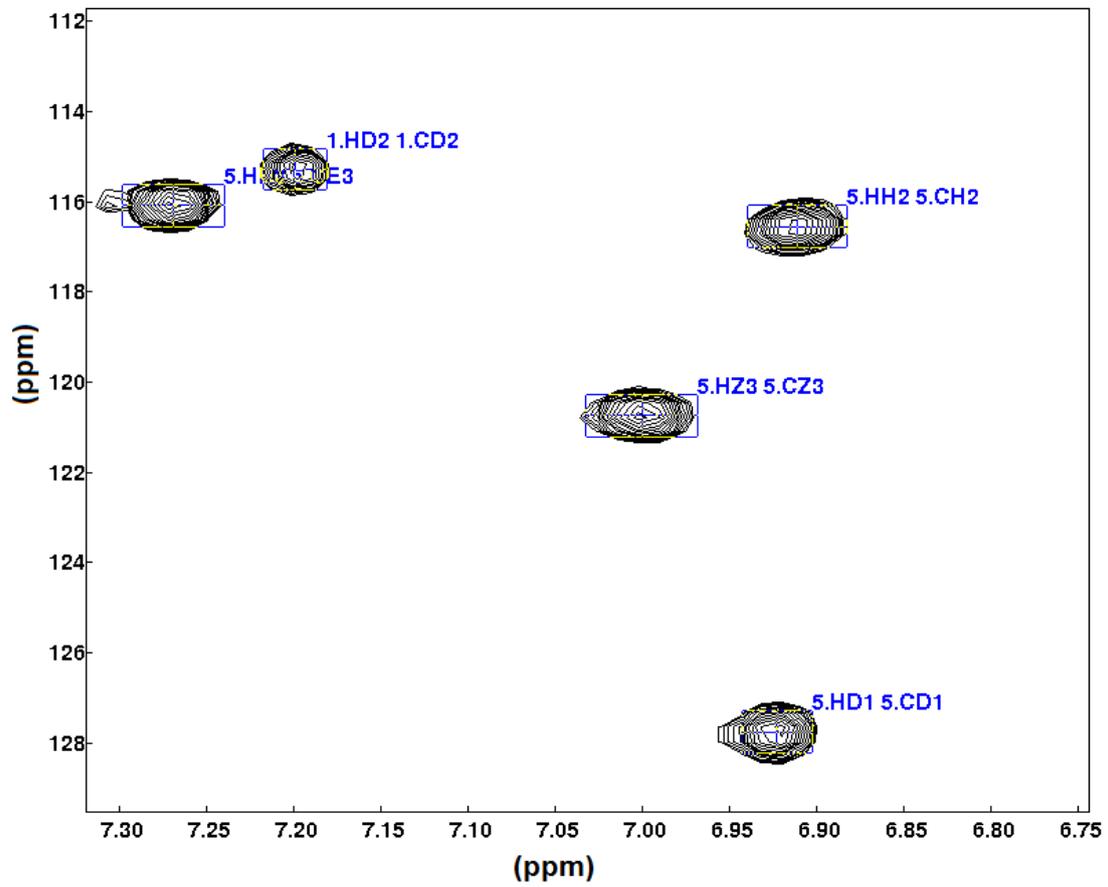
Anexo 14: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) referente à região aromática para o peptídeo RGD.

Anexo 15



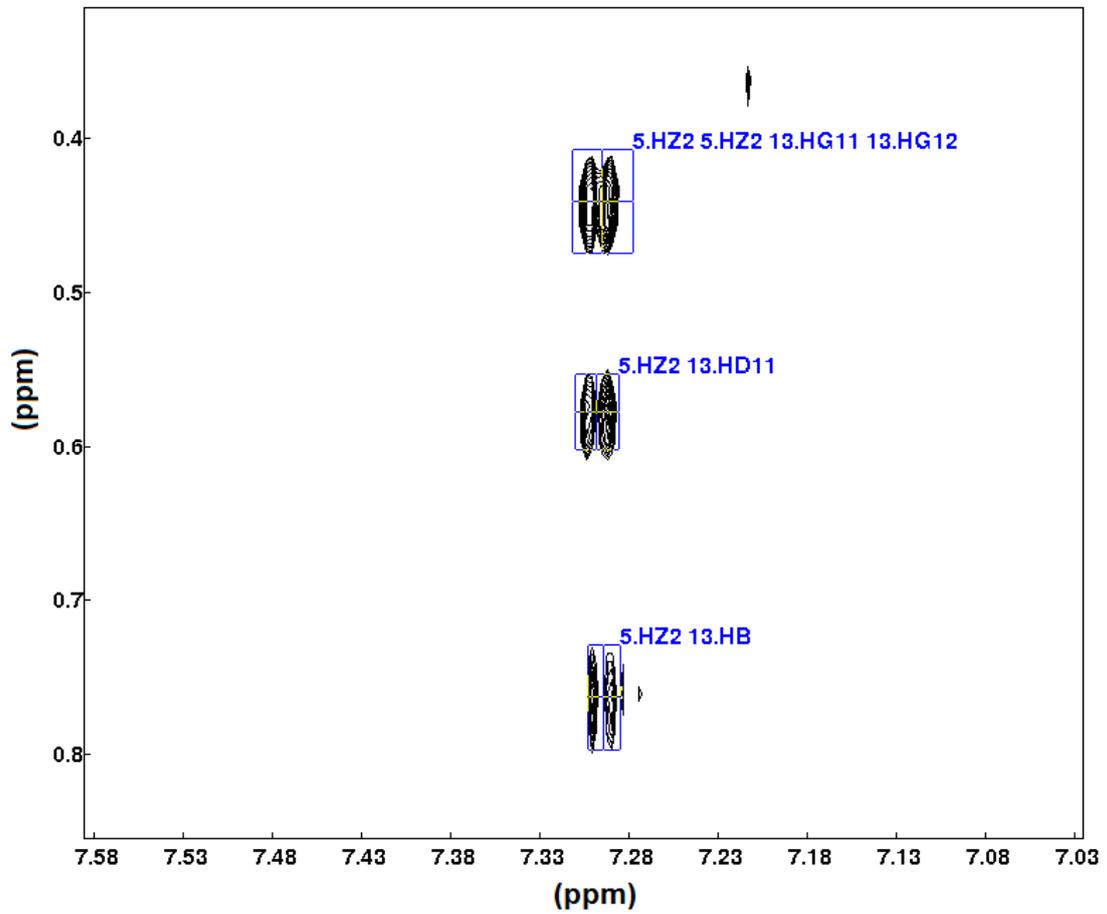
Anexo 15: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática referente ao peptídeo HGD. A cor vermelha representa sinal com valor de intensidade negativo no espectro (CH_2) e a cor preta representa sinal com valor positivo. Isso possibilita identificar os, por exemplo, os hidrogênios β (grupo CH_2) referente aos resíduos serina-8 e serina-15, observados no espectro acima.

Anexo 16



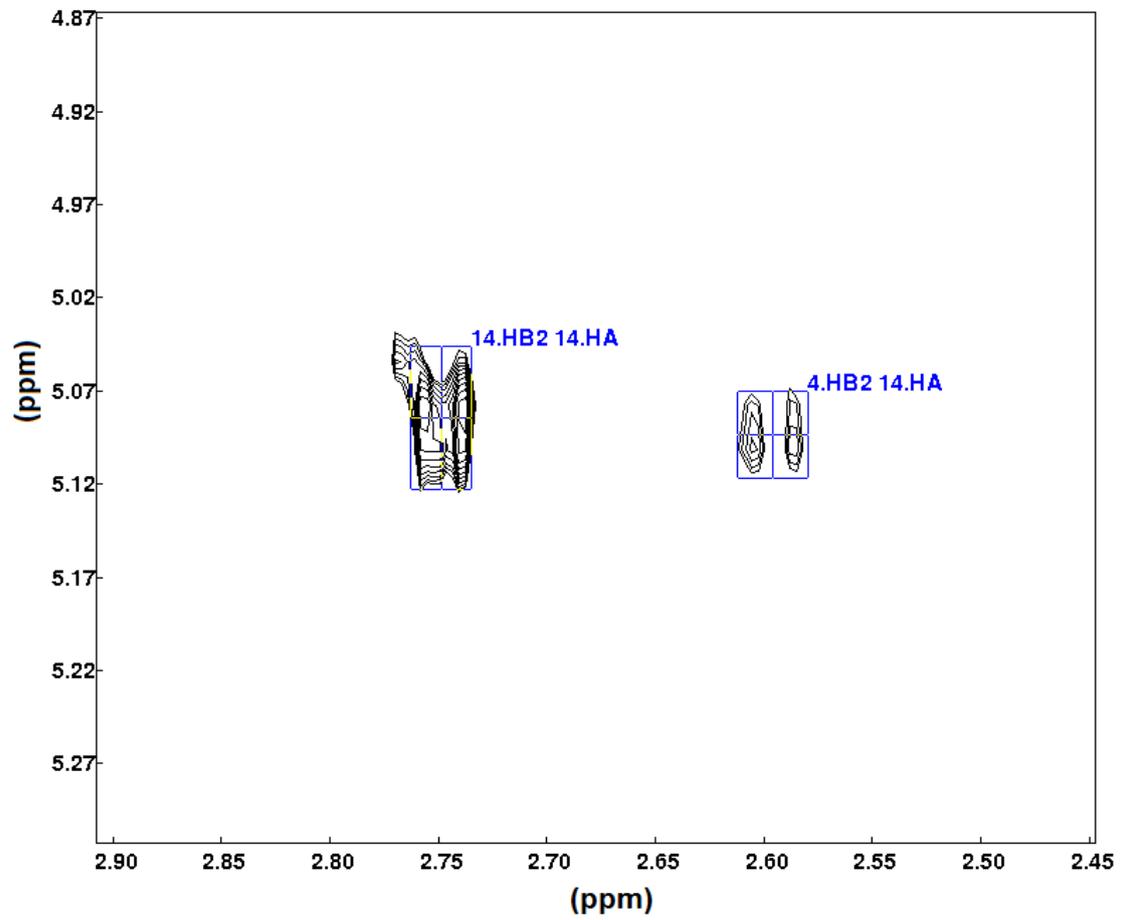
Anexo 16: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) referente à região aromática para o peptídeo HGD.

Anexo 17



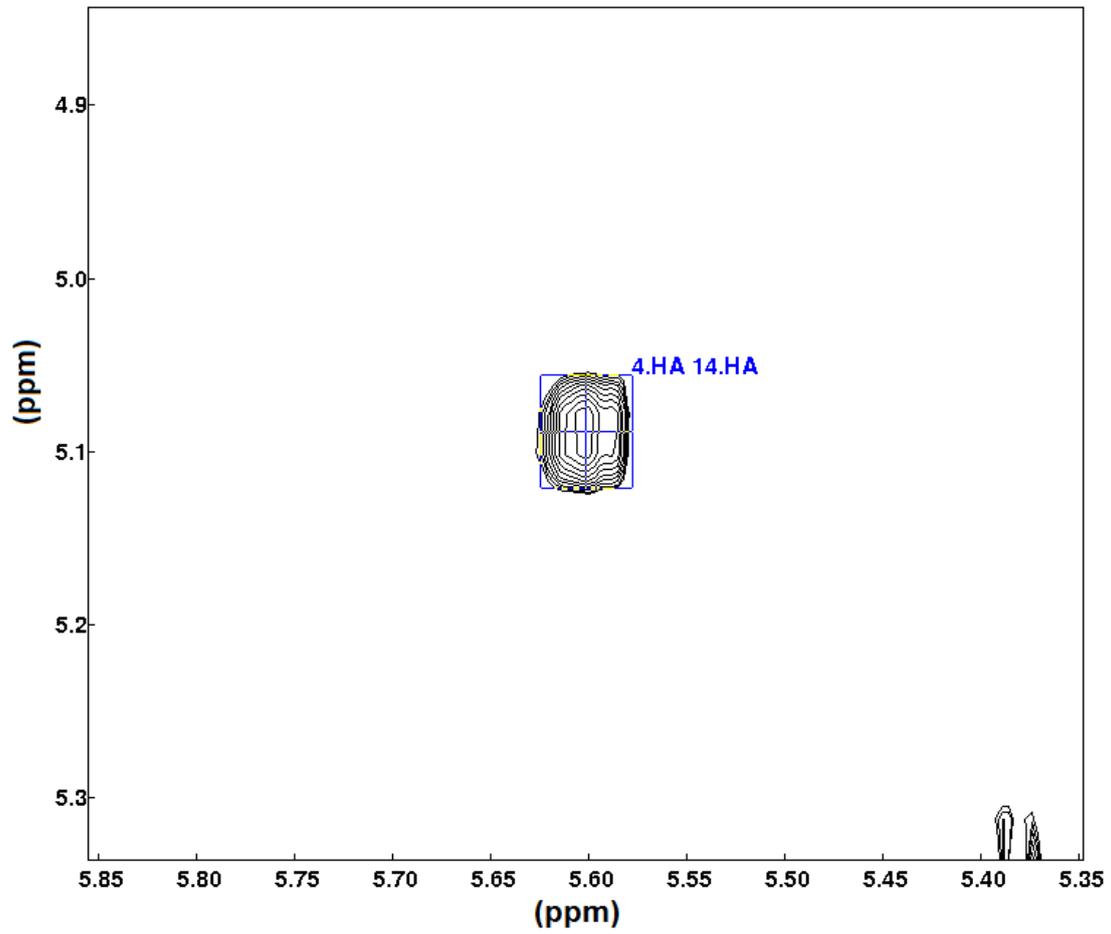
Anexo 17: Espectro NOESY referente ao peptídeo RGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos triptofano-5 com isoleucina-13.

Anexo 18



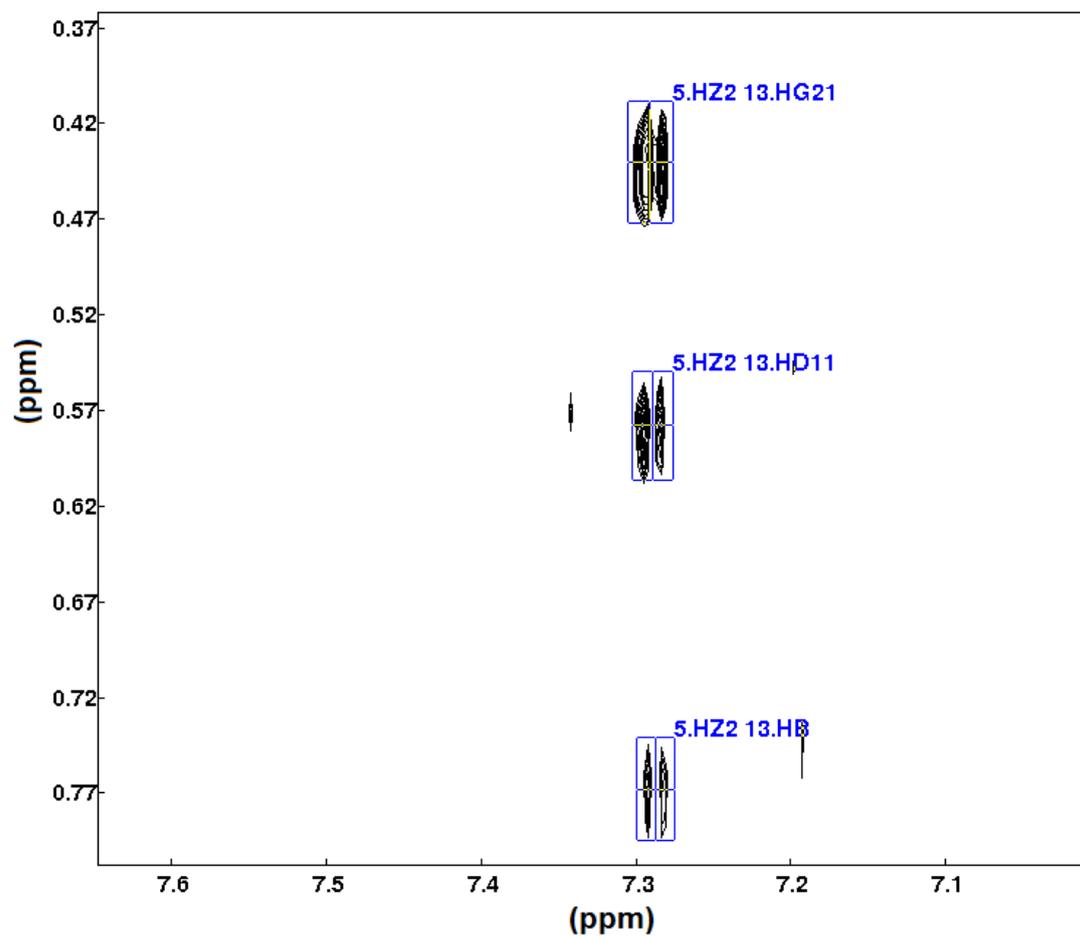
Anexo 18: Espectro NOESY referente ao peptídeo RGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos cisteína-4 com cisteína-14.

Anexo 19



Anexo 19: Espectro NOESY referente ao peptídeo HGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos cisteína-4 com cisteína-14.

Anexo 20



Anexo 20: Espectro NOESY referente ao peptídeo HGD, em que é possível observar a existência de NOE entre os resíduos triptofano-5 com isoleucina-13.

Anexo 21

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.CA	48.922	4.HN	8.262
1.HA	4.213	4.CA	48.744
1.CB	34.957	4.HA	4.315
1.HB2	3.224	4.CB	42.405
1.HB1	3.224	4.HB2	1.446
1.CD2	115.636	4.HB1	1.446
1.HD2	7.085	4.CG	33.567
1.CE1	139.555	4.HG	1.489
1.HE1	8.417	4.CD1	31.832
2.HN	8.674	4.HD11	0.778
2.CA	49.593	4.CD2	32.515
2.HA	4.335	4.HD21	0.841
2.CB	35.927	5.HN	8.294
2.HB2	1.681	5.CA	49.592
2.HB1	1.681	5.HA	4.190
2.CG	42.388	5.CB	35.878
2.HG2	1.550	5.HB2	1.757
2.HG1	1.550	5.HB1	1.702
2.CD	42.577	5.CG	33.720
2.HD2	3.116	5.HG2	1.591
2.HD1	3.116	5.HG1	1.531
2.HE	7.116	5.CD	42.585
3.HN	8.620	5.HD2	3.162
3.CA	50.341	5.HD1	3.162
3.HA	4.603	5.HE	7.179
3.CB	40.705	6.HN	8.567
3.HB2	3.048	6.CA	48.955
3.HB1	2.991	6.HA	4.623
3.CD1	131.360	6.CB	34.908
3.HD1	7.229	6.HB2	3.225
3.CE1	128.625	6.HB1	3.134
3.HE1	7.229	6.CD2	114.267
3.CZ	130.706	6.HD2	7.286
3.HZ	7.298	6.CE1	138.183
3.CE2	128.625	6.HE1	8.562
3.HE2	7.229	6.HD1	8,355
3.CD2	131.360		
3.HD2	7.229		

Anexo 21: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o hexapeptídeo.

Anexo 22

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.CA	54.856	4.HN	8.247
1.HA	4.234	4.CA	54.834
1.CB	29.232	4.HA	4.301
1.HB2	3.229	4.CB	42.516
1.HB1	3.229	4.HB2	1.443
1.CD2	121.201	4.HB1	1.443
1.HD2	7.082	4.CG	26.758
1.CE1	137.413	4.HG	1.507
1.HE1	8.422	4.CD1	23.614
2.HN	8.652	4.HD11	0.779
2.CA	56.117	4.CD2	24.872
2.HA	4.332	4.HD21	0.842
2.CB	31.110	5.HN	8.266
2.HB2	1.684	5.CA	56.117
2.HB1	1.684	5.HA	4.193
2.CG	42.922	5.CB	30.802
2.HG2	1.550	5.HB2	1.747
2.HG1	1.487	5.HB1	1.702
2.CD	43.572	5.CG	27.163
2.HD2	3.127	5.HG2	1.589
2.HD1	3.127	5.HG1	1.529
2.HE	7.098	5.CD	43.306
3.HN	8.579	5.HD2	3.161
3.CA	57.633	5.HD1	3.161
3.HA	4.610	5.HE	7.164
3.CB	39.866	6.HN	8.532
3.HB2	3.052	6.CA	54.878
3.HB1	2.991	6.HA	4.624
3.CD1	131.792	6.CB	29.240
3.HD1	7.233	6.HB2	3.226
3.CE1	129.902	6.HB1	3.140
3.HE1	7.233	6.CD2	120.078
3.CZ	131.334	6.HD2	7.279
3.HZ	7.299	6.CE1	136.478
3.CE2	129.902	6.HE1	8.547
3.HE2	7.233	6.HD1	8,385
3.CD2	131.792		
3.HD2	7.233		

Anexo 22: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o hexapeptídeo + Cd(II).

Anexo 23

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.CA	55.381	4.HN	8.263
1.HA	4.233	4.CA	54.807
1.CB	29.240	4.HA	4.343
1.HB2	3.227	4.CB	42.980
1.HB1	3.227	4.HB2	1.476
1.CD2	121.007	4.HB1	1.476
1.HD2	7.110	4.CG	26.776
1.CE1	137.585	4.HG	1.530
1.HE1	8.399	4.CD1	23.619
2.CA	56.117	4.HD11	0.819
2.HA	4.363	4.CD2	24.867
2.CB	31.078	4.HD21	0.865
2.HB2	1.705	5.HN	8.292
2.HB1	1.705	5.CA	55.381
2.CG	27.233	5.HA	4.229
2.HG2	1.571	5.CB	31.110
2.HG1	1.508	5.HB2	1.785
2.CD	43.621	5.HB1	1.723
2.HD2	3.161	5.CG	27.338
2.HD1	3.161	5.HG2	1.613
2.HE	7.135	5.HG1	1.571
3.HN	8.611	5.CD	43.452
3.CA	54.939	5.HD2	3.202
3.HA	4.644	5.HD1	3.202
3.CB	39.866	5.HE	7.194
3.HB2	3.077	6.HN	8.559
3.HB1	3.012	6.CA	57.491
3.CD1	131.793	6.HA	4.663
3.HD1	7.268	6.CB	29.853
3.CE1	129.909	6.HB2	3.247
3.HE1	7.268	6.HB1	3.162
3.CZ	131.343	6.CD2	120.063
3.HZ	7.336	6.HD2	7.306
3.CE2	129.909	6.CE1	136.453
3.HE2	7.268	6.HE1	8.583
3.CD2	131.793	6.HD1	8,325
3.HD2	7.268		

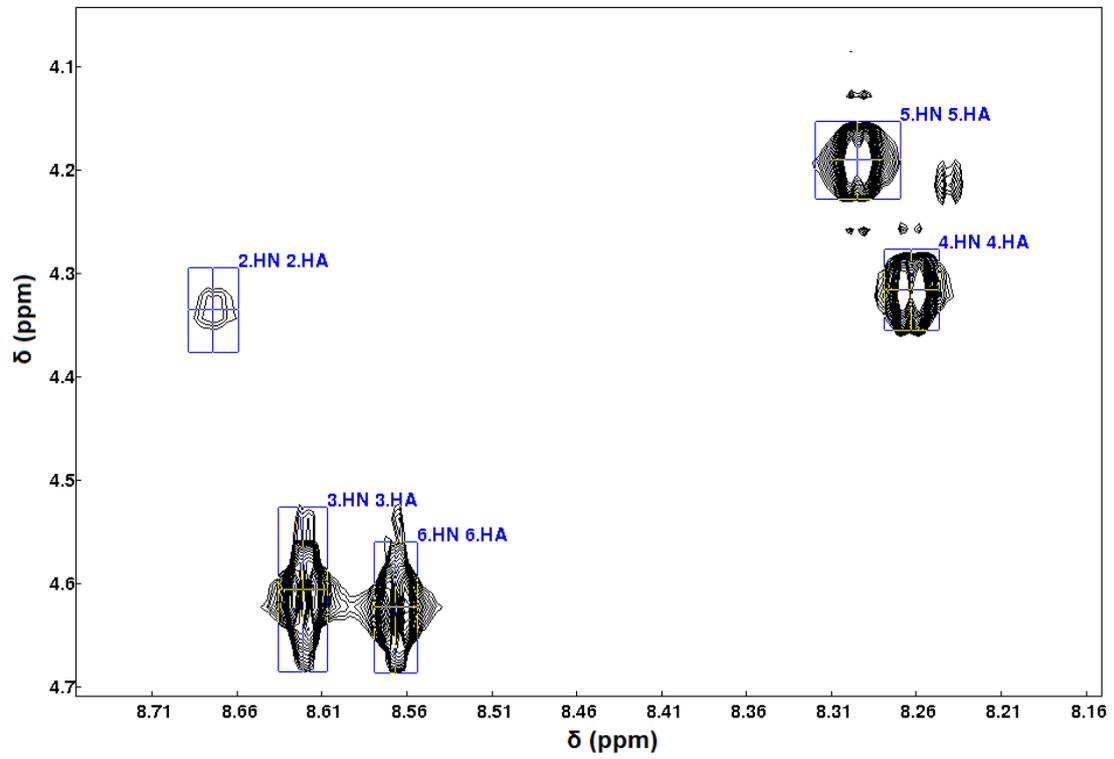
Anexo 23: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o hexapeptídeo + Zn(II).

Anexo 24

Átomo	δ (ppm)	Átomo	δ (ppm)
1.CA	55.493	4.HN	8.247
1.HA	4.192	4.CA	54.855
1.CB	29.866	4.HA	4.301
1.HB2	3.183	4.CB	42.916
1.HB1	3.183	4.HB2	1.446
1.CD2	120.605	4.HB1	1.446
1.HD2	7.043	4.CG	26.740
1.CE1	137.871	4.HG	1.494
1.HE1	8.296	4.CD1	23.615
2.CA	56.114	4.HD11	0.778
2.HA	4.305	4.CD2	24.865
2.CB	31.116	4.HD21	0.842
2.HB2	1.679	5.HN	8.044
2.HB1	1.679	5.CA	55.493
2.CG	27.026	5.HA	4.193
2.HG2	1.526	5.CB	30.989
2.HG1	1.466	5.HB2	1.745
2.CD	43.563	5.HB1	1.701
2.HD2	3.118	5.CG	27.366
2.HD1	3.118	5.HG2	1.572
2.HE	7.125	5.HG1	1.551
3.HN	8.594	5.CD	43.221
3.CA	57.369	5.HD2	3.161
3.HA	4.602	5.HD1	3.161
3.CB	39.827	5.HE	7.179
3.HB2	3.053	6.HN	8.546
3.HB1	2.970	6.CA	54.890
3.CD1	131.792	6.HA	4.622
3.HD1	7.221	6.CB	29.241
3.CE1	129.894	6.HB2	3.206
3.HE1	7.221	6.HB1	3.121
3.CZ	131.323	6.CD2	120.058
3.HZ	7.291	6.HD2	7.255
3.CE2	129.894	6.CE1	136.473
3.HE2	7.221	6.HE1	8.531
3.CD2	131.792	6.HD1	8,245
3.HD2	7.221		

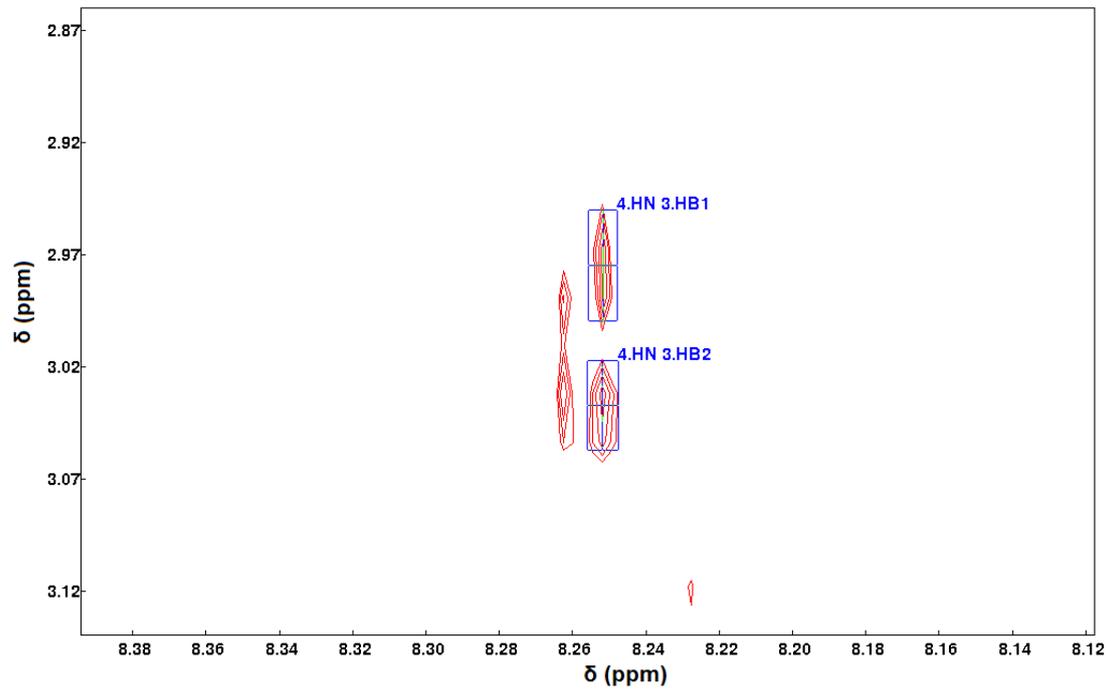
Anexo 24: Assinalamento dos átomos de hidrogênio e carbono para o hexapeptídeo + CO₂.

Anexo 25



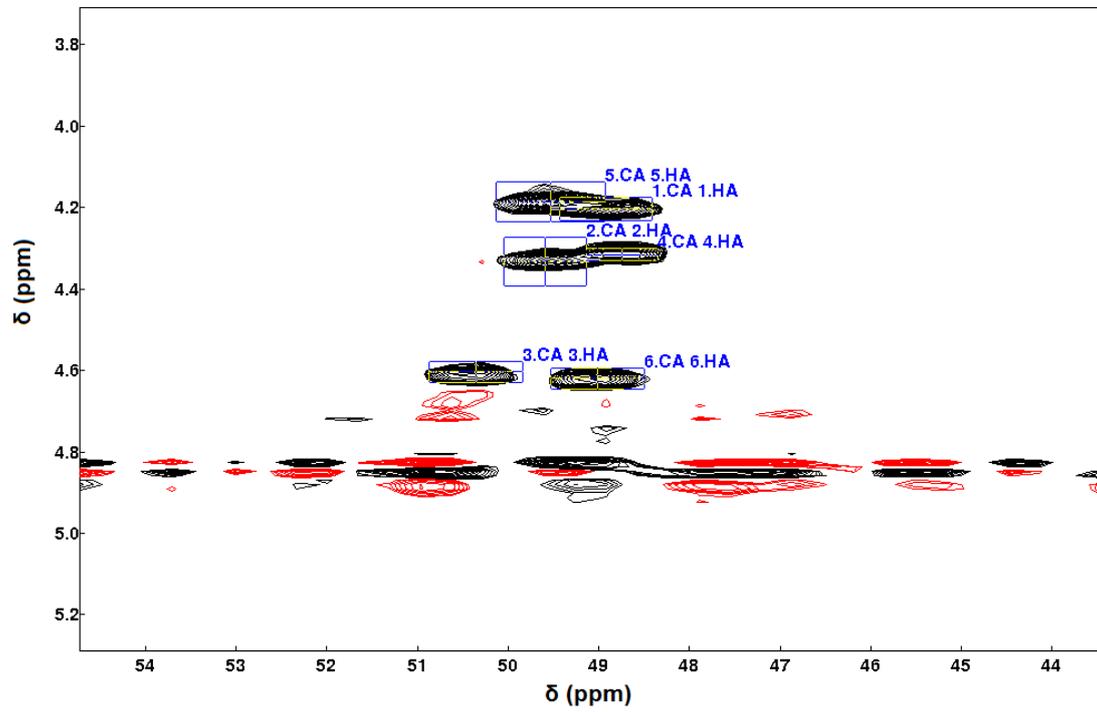
Anexo 25: Espectro TOCSY do hexapeptídeo mostrando a região de hidrogênio amídico.

Anexo 26



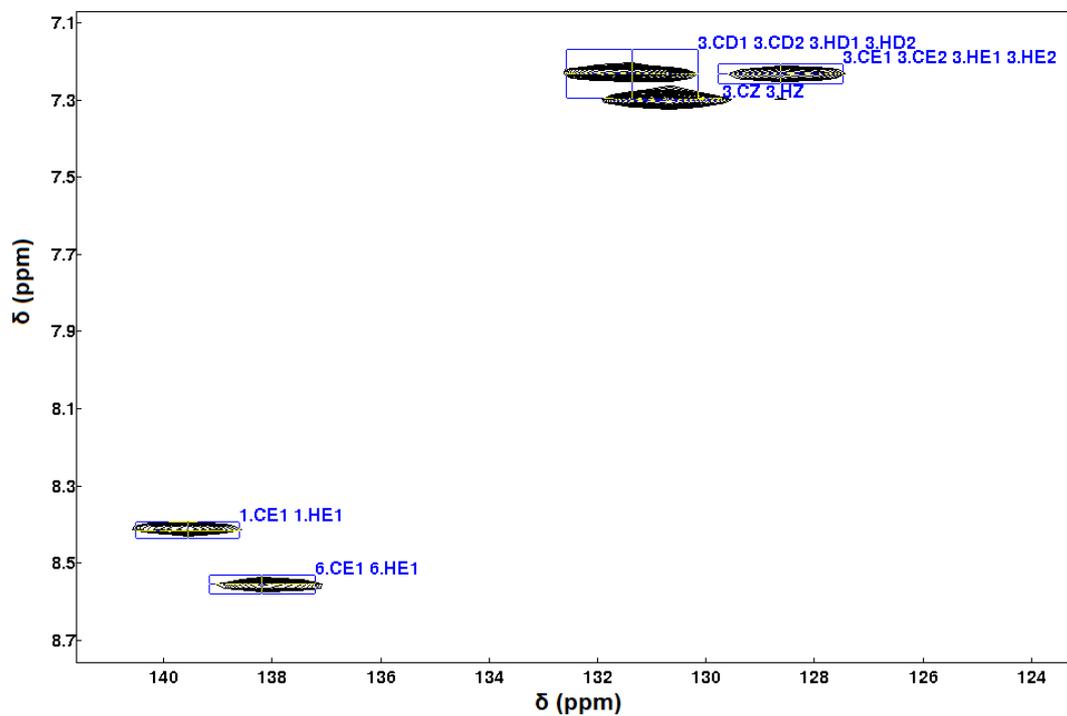
Anexo 26: Espectro ROESY do hexapeptídeo, mostrando ROE entre os resíduos fenilalanina-3 e leucina-4.

Anexo 27



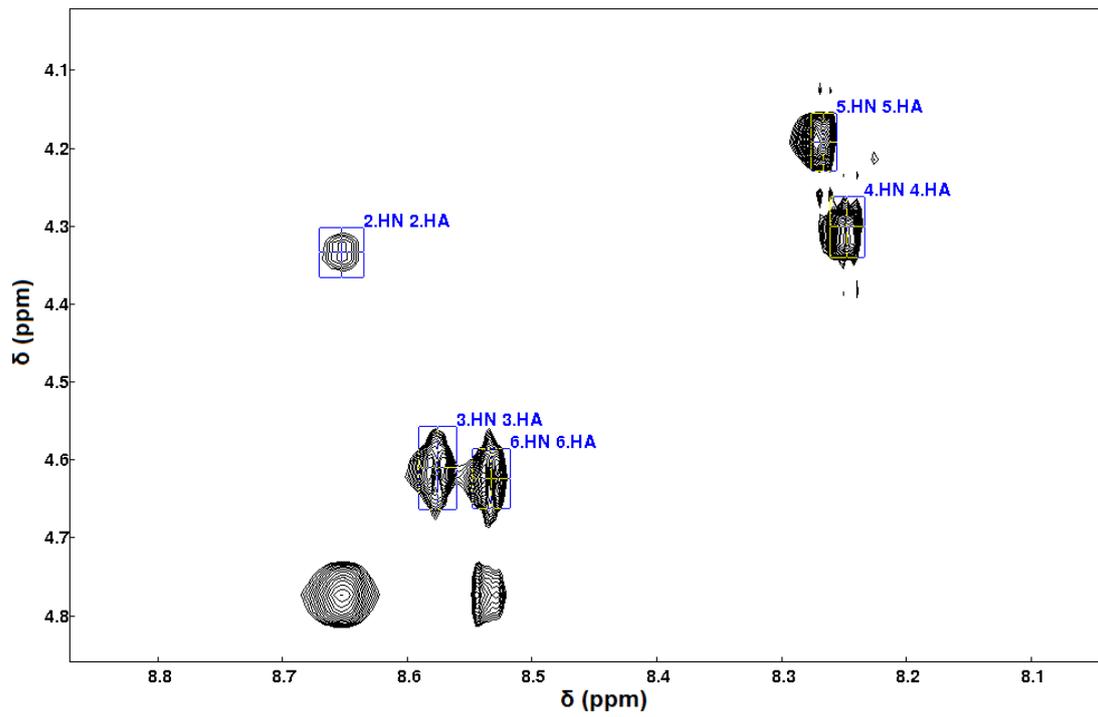
Anexo 27: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática do hexapeptídeo, mostrando a região de $\text{C}\alpha$.

Anexo 28



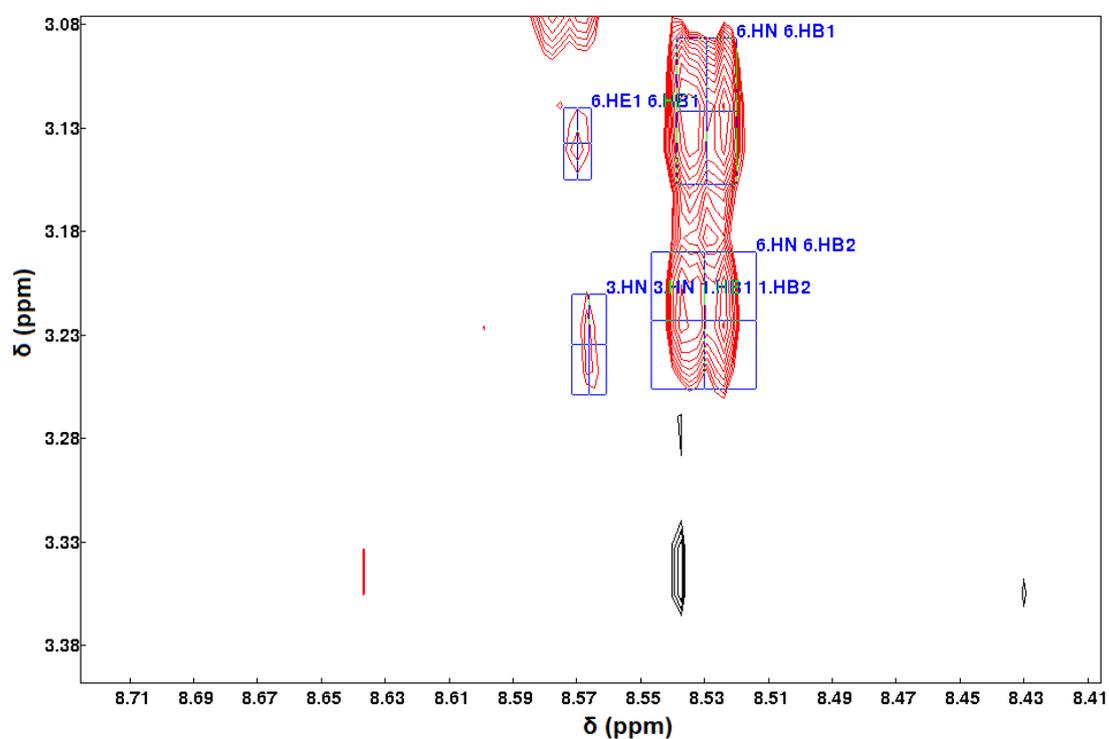
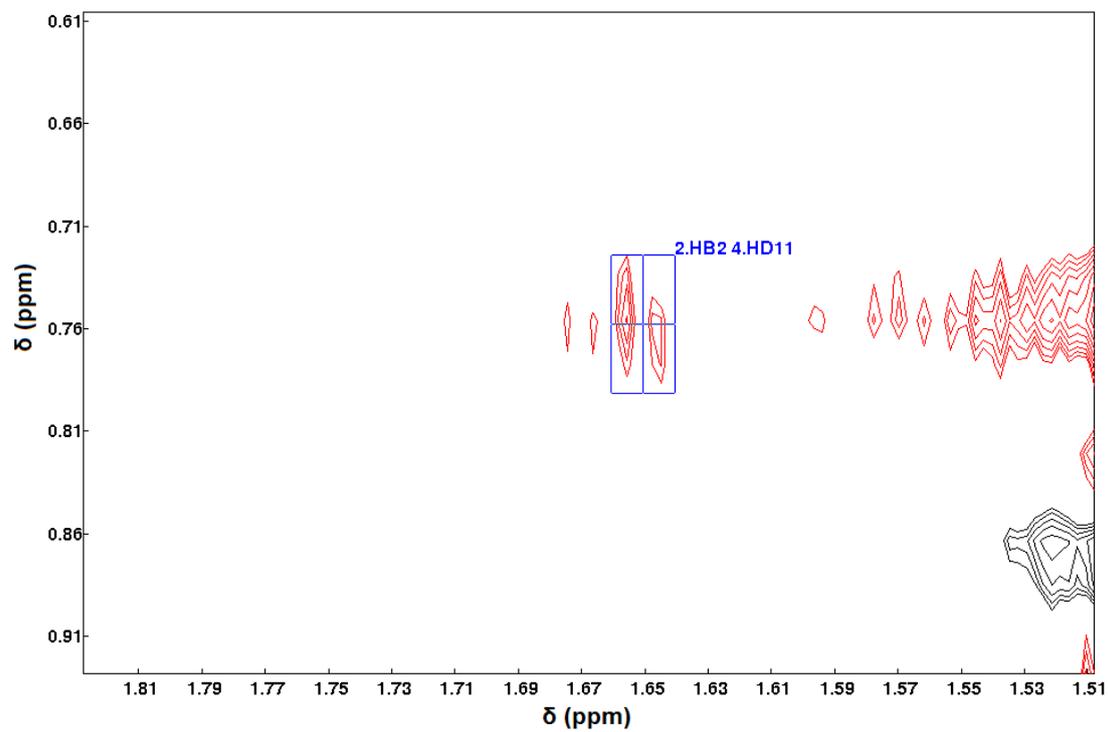
Anexo 28: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região aromática referente ao hexapeptídeo.

Anexo 29



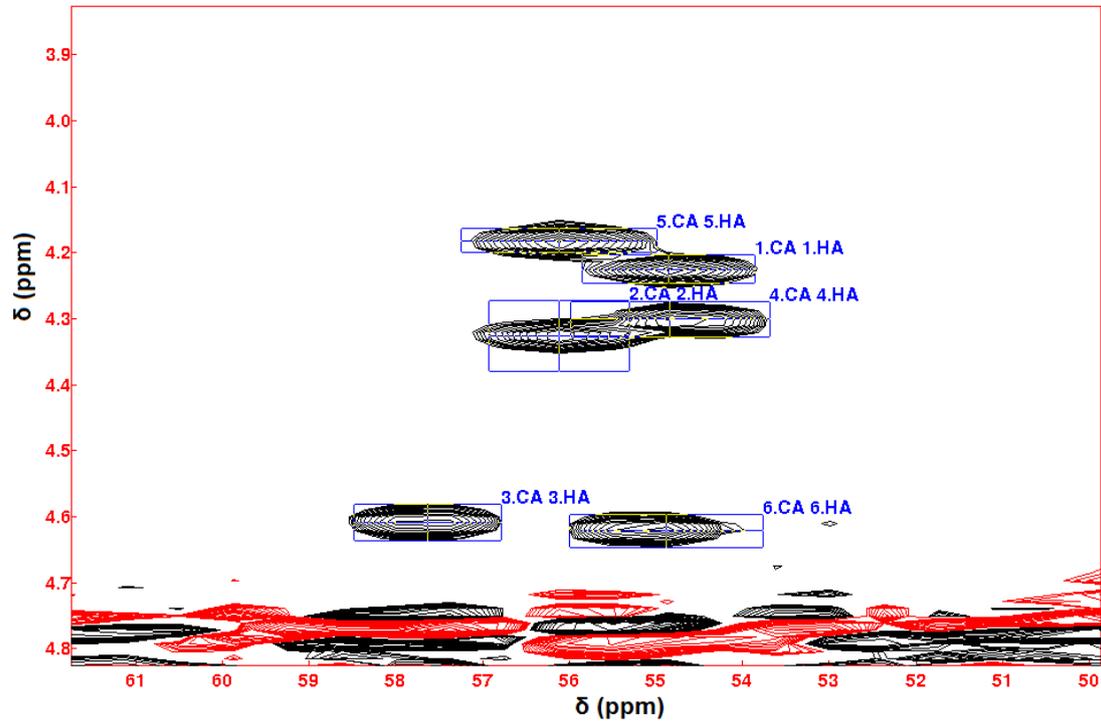
Anexo 29: Espectro TOCSY do hexapeptídeo + Cd(II), mostrando a região de hidrogênio amídico.

Anexo 30



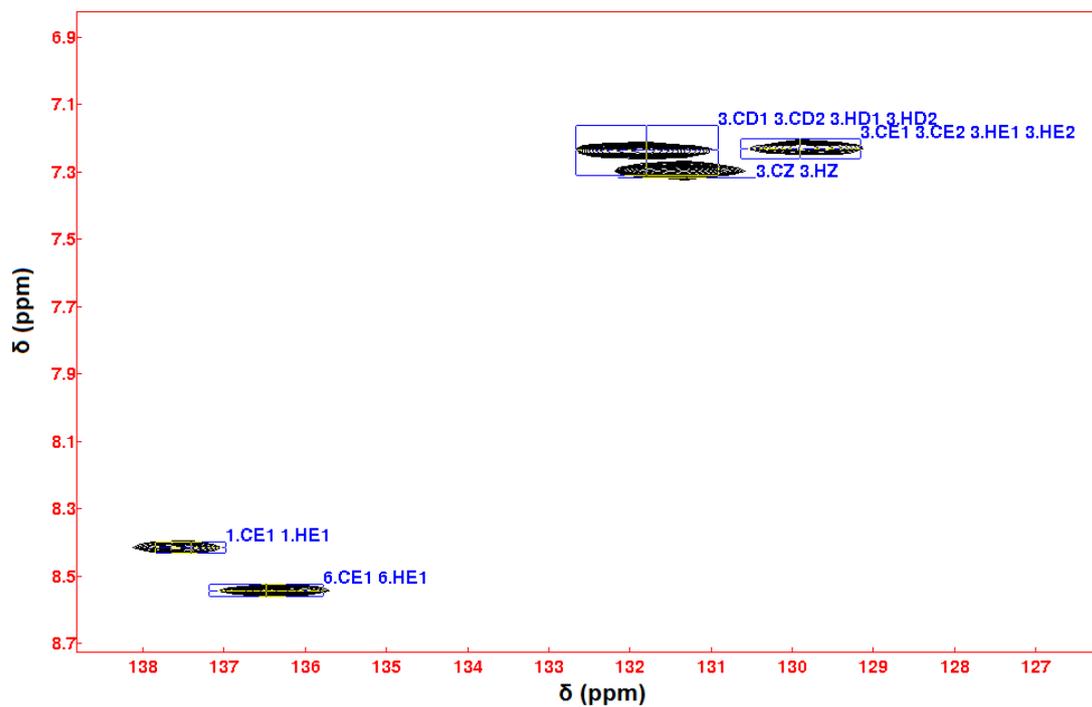
Anexo 30: Espectro ROESY do hexapeptídeo + Cd(II), mostrando ROE entre os resíduos arginina-2 e leucina-4 (espectro superior) e histidina-1 e fenilalanina-3 (espectro inferior).

Anexo 31



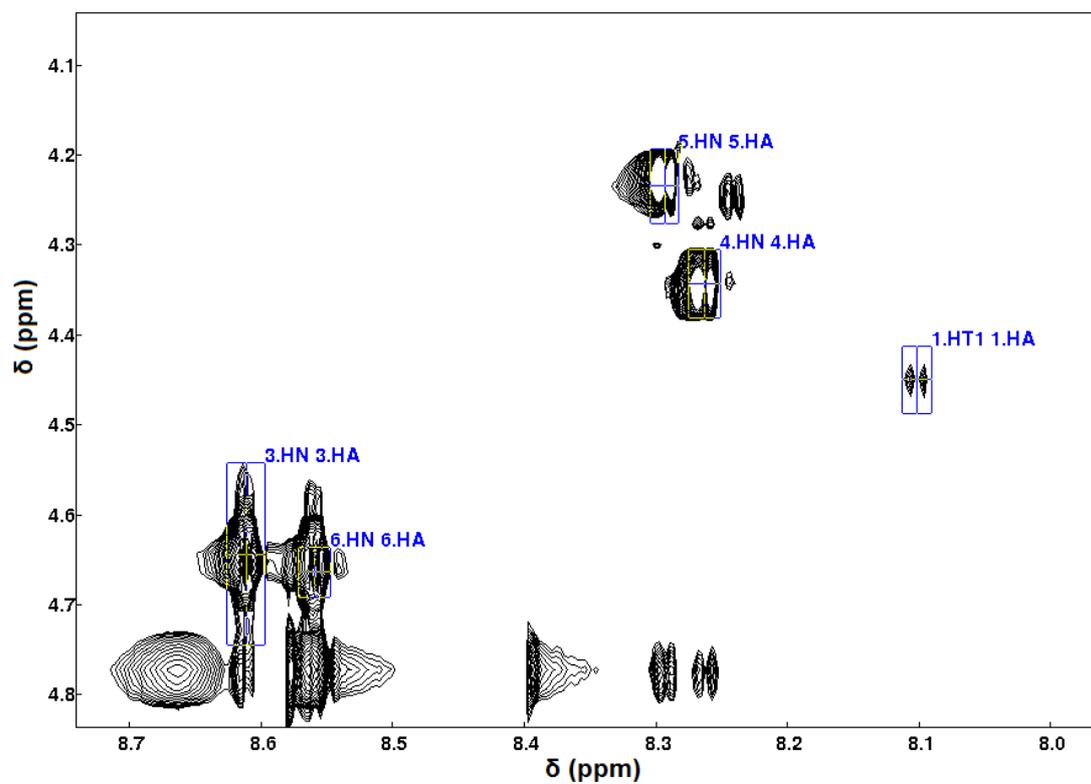
Anexo 31: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática referente ao peptídeo + Cd(II), mostrando a região de Ca.

Anexo 32



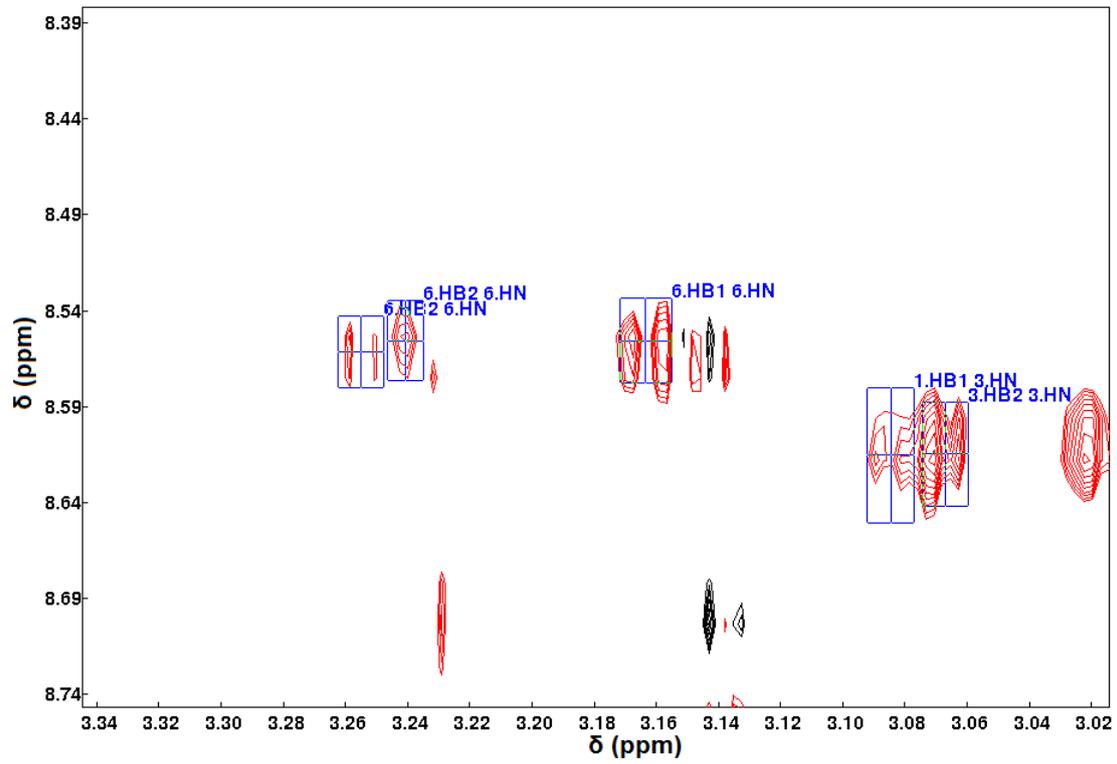
Anexo 32: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região aromática referente ao hexapeptídeo + Cd(II).

Anexo 33



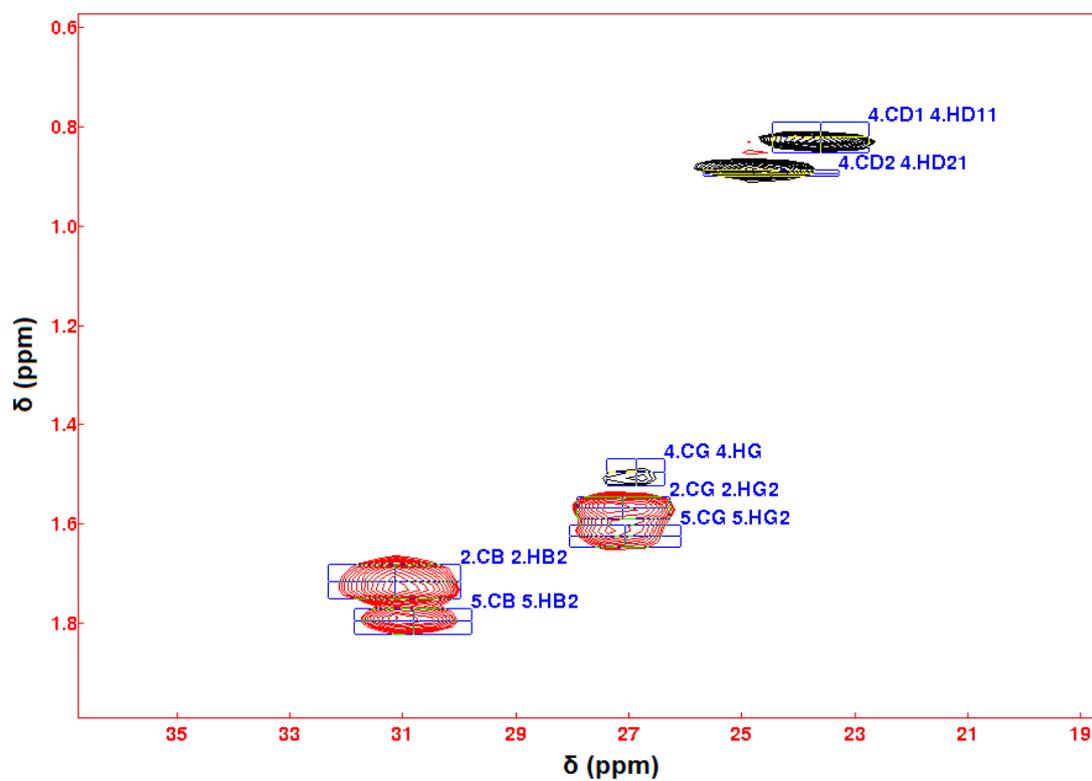
Anexo 33: Espectro TOCSY do hexapeptídeo + Zn(II) mostrando a região de hidrogênio amídico.

Anexo 34



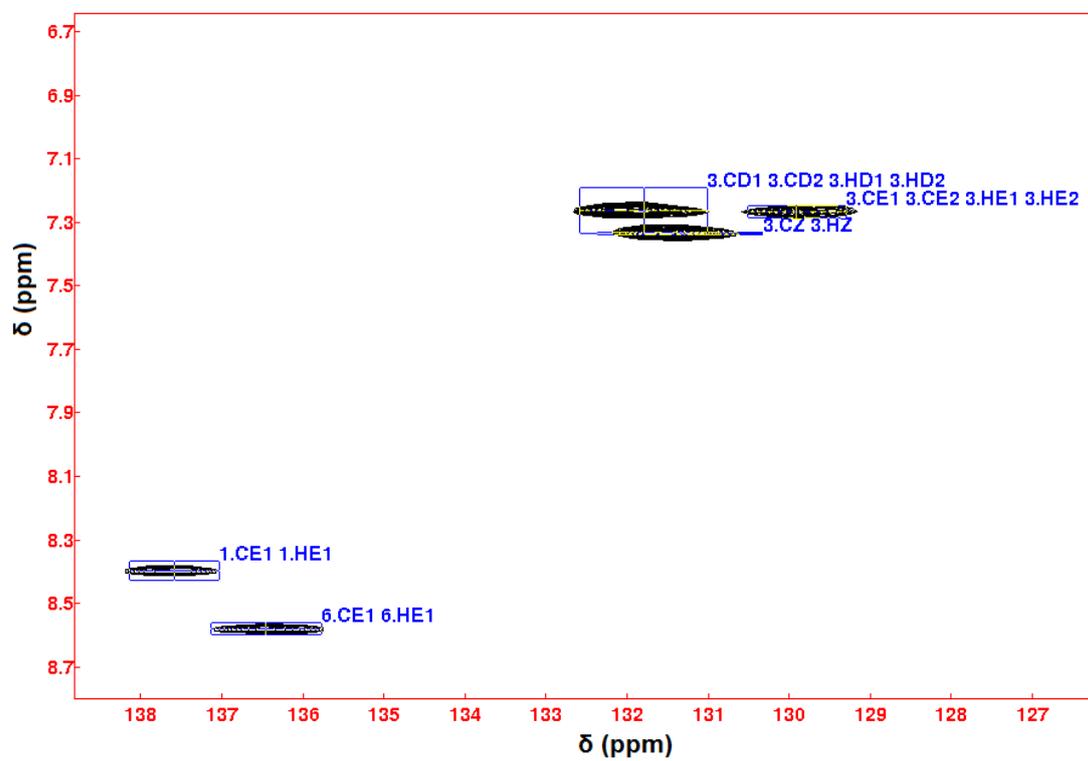
Anexo 34: Espectro ROESY do hexapeptídeo + Zn(II) mostrando ROE entre os resíduos histidina-1 e fenilalanina-3.

Anexo 35



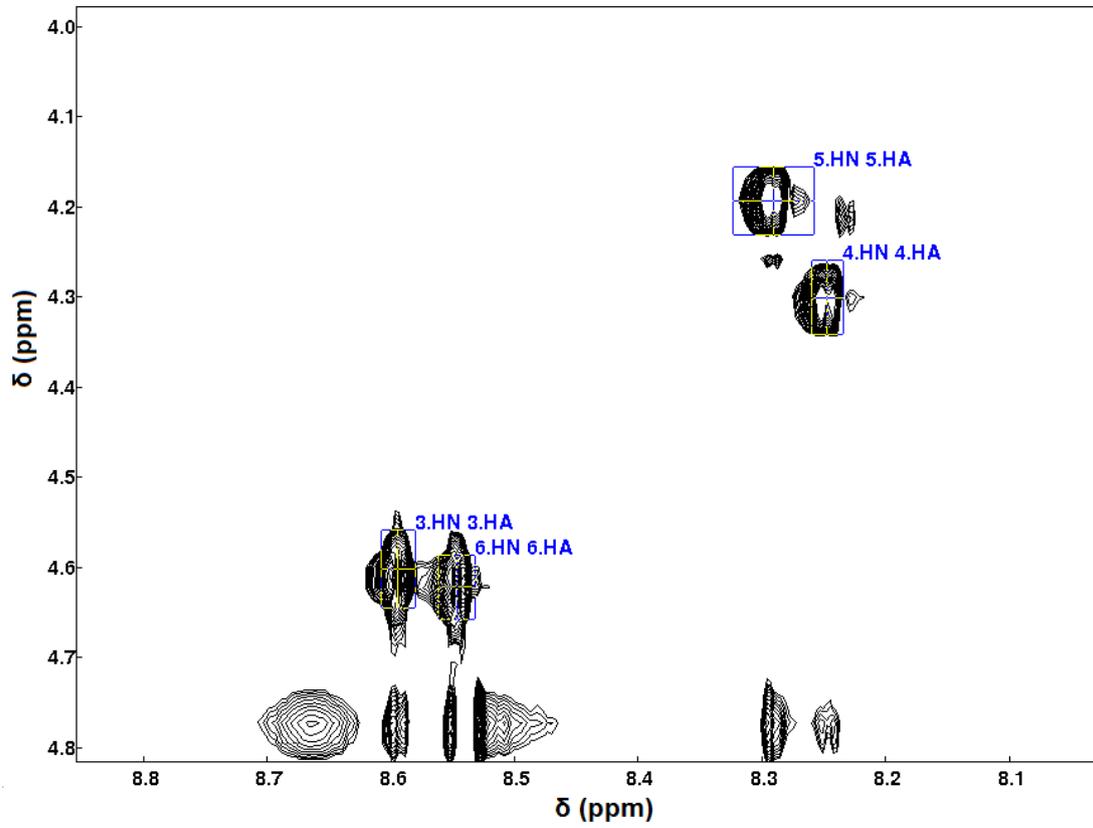
Anexo 35: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região alifática, referente ao hexapeptídeo + Zn(II), mostrando as metilas e alguns carbonos beta e gama.

Anexo 36



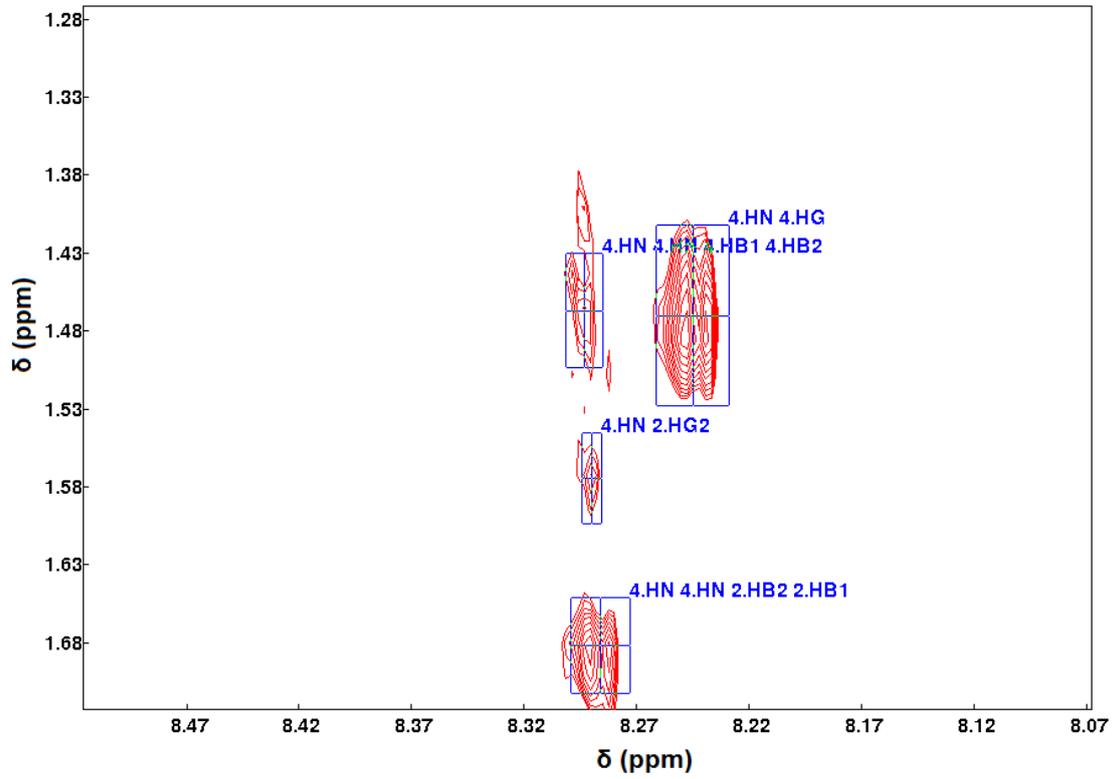
Anexo 36: Espectro HSQC-editado (^1H - ^{13}C) da região aromática referente ao hexapeptídeo + Zn(II).

Anexo 37



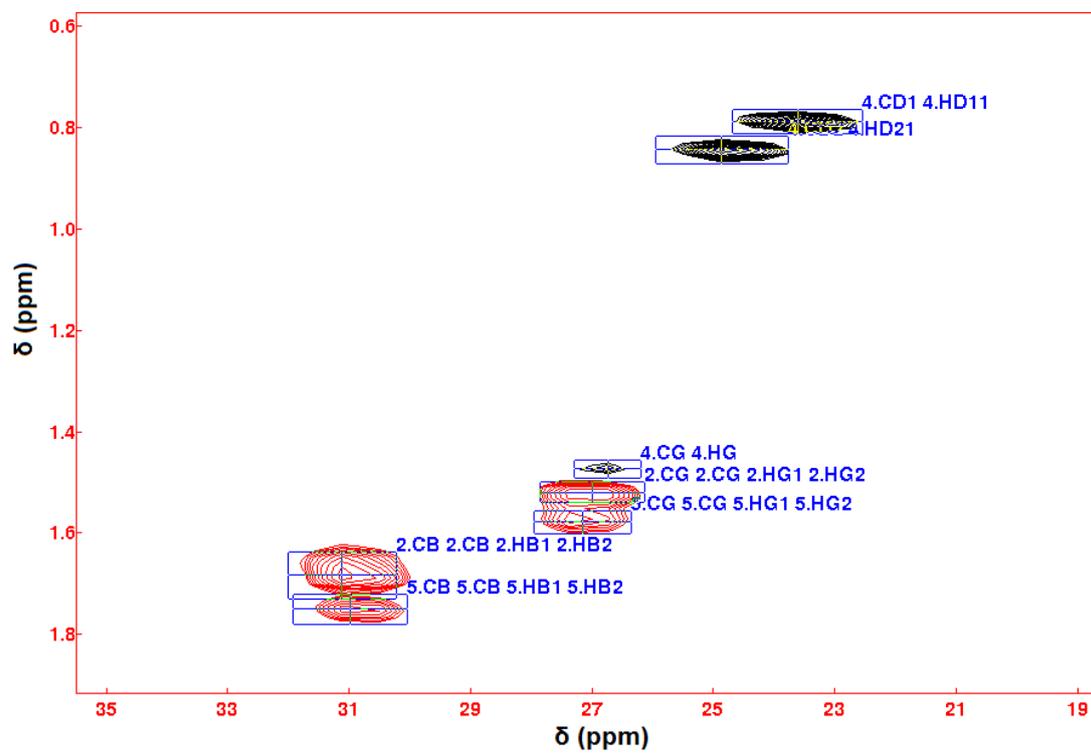
Anexo 37: Espectro TOCSY do peptídeo + CO₂ mostrando a região de hidrogênio amídico.

Anexo 38



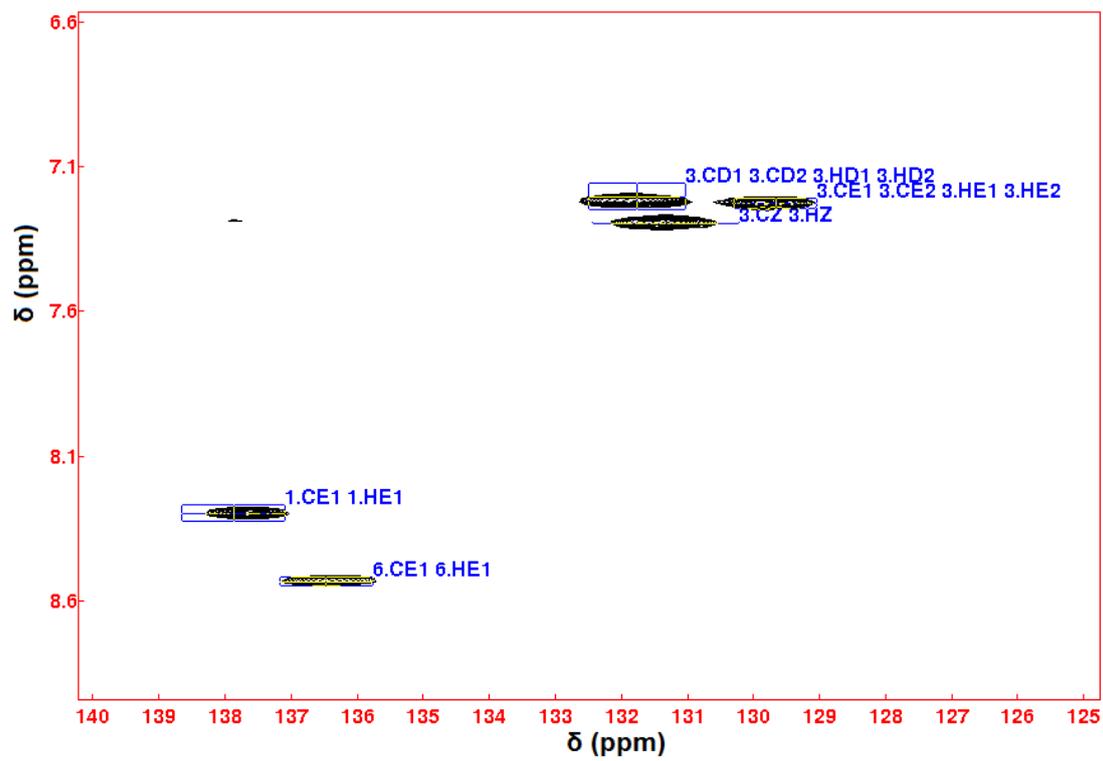
Anexo 38: Espectro ROESY do peptídeo + CO₂ mostrando a existência de ROE entre o resíduo arginina-2 e fenilalanina-4.

Anexo 39



Anexo 39: Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da região alifática referente ao peptídeo + CO_2 , mostrando a região das metilas e de alguns carbonos beta e gama.

Anexo 40



Anexo 40: Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da região aromática referente ao peptídeo + CO_2 .