



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Enzo Matheus Carmo da Silva

**SÍNTESE E ESTUDOS ESTRUTURAIS POR RMN DE UM NOVO
PEPTÍDEO ENCRIPADO VISANDO ATIVIDADE ANTIVIRAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Brasília – DF

1º/2019



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Enzo Matheus Carmo da Silva

**SÍNTESE E ESTUDOS ESTRUTURAIS POR RMN DE UM NOVO
PEPTÍDEO ENCRIPADO VISANDO ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Aline Lima de Oliveira Paterno
Co-Orientador: Guilherme Dotto Brand

1º/2019

“NÃO SÓ ESTAMOS NO UNIVERSO, MAS O UNIVERSO ESTÁ EM NÓS”

NEIL DEGRASSE TYSON

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível graças a muitas pessoas que apoiaram a minha trajetória. Ciência não se faz sozinho, e tenho muitas pessoas a agradecer pelo apoio que me deram.

Agradeço a minha orientadora Aline e ao meu coorientador Guilherme por terem me aceitado como aluno de TCC e por terem me acompanhado, aconselhado e pela paciência que tiveram comigo. Vocês me inspiram a seguir em frente no mundo da ciência.

Agradeço aos professores Mauro e Sônia por terem aceitado participar da banca avaliadora, contribuindo de forma imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu desenvolvimento pessoal.

Agradeço a meus pais e minha irmã Cibele pelo apoio durante anos, pelo amor e pela ajuda nos momentos em que eu precisava ensaiar a minha defesa na frente de uma “plateia”.

Agradeço aos meus melhores amigos, ou melhor, aos meus irmãos Gabriel, Eduardo, Fábio, Kenji e Matheus. Sem a amizade eu nunca teria chegado até aqui.

Agradeço à minha namorada Maria Gabriela por todo o carinho, atenção, compreensão e amor. Não posso esquecer de agradecê-la, também, por me ajudar a confeccionar a Figura 4 e a Figura 13 desse TCC.

Agradeço aos meus colegas de graduação, principalmente ao Lucas, mas também Eric, Izabella, Eduardo, André, Maria Luíza, Miguel, Isabelle, Arthur, Thiago, Ana, Gabriel, Kaio, Nicolas, e muitos outros pelo companheirismo durante esses anos de graduação.

Agradeço a Michele pela paciência ao me ensinar quase tudo o que eu precisava para o desenvolvimento desse TCC em laboratório.

Agradeço ao professor José Roberto Leite por disponibilizar o Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada para a realização da purificação por HPLC e à Andreane pelo auxílio que recebi nesse laboratório.

Agradeço ao Carlos Bloch Jr. e ao José Cardoso por possibilitarem a realização dos experimentos com Espectrometria de Massas e Dicroísmo Circular na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Agradeço ao Gabriel, quem me cedeu uma amostra do peptídeo Bt01.

Agradeço aos alunos de graduação e pós-graduação do LITMO e do LAQMOS pela ajuda em muitos momentos que precisei e por proporcionar bons ambientes de estudo e trabalho.

SUMÁRIO

Introdução.....	7
Revisão Bibliográfica.....	11
Objetivos.....	21
Metodologia.....	21
Resultados e Discussão.....	27
Conclusões.....	43
Referências.....	44

RESUMO

Os peptídeos são biomoléculas que possuem diversas atividades biológicas conhecidas e atrativas para o desenvolvimento de novas drogas. Esse trabalho propõe uma estratégia para se obter novos peptídeos antimicrobianos, com foco na atividade antiviral. Para isso, primeiramente, foi utilizado o *software* denominado Kamal para prospecção e então síntese um peptídeo cuja estrutura primária está contida em uma proteína e que possivelmente tem: atividade antiviral e estruturação em α -hélice. A síntese de um dos peptídeos selecionados pelo Kamal foi realizada em Fase Sólida e purificada por HPLC, onde observou-se relativa pureza do produto obtido. Porém, o peptídeo prospectado e selecionado para o presente trabalho não apresentou atividade antimicrobiana e nem uma estrutura definida, mesmo após análises realizadas na presença de vesículas. Dessa forma, partiu-se para o estudo estrutural do peptídeo Bt01, um peptídeo prospectado pelo Kamal em trabalhos anteriores, por Ressonância Magnética Nuclear. Resultados preliminares das análises dos espectros de TOCSY e NOESY revelaram que a estrutura do peptídeo Bt01 é uma α -hélice entre a Glicina 3 e a Fenilalanina 16.

Palavras-chaves: Prospecção; RMN; Peptídeo; Kamal; Estrutura Tridimensional.

INTRODUÇÃO

Peptídeos são biomoléculas constituídas por ligações covalentes de um ou mais aminoácidos, chamadas ligações peptídicas. A ligação peptídica é formada pela condensação entre os grupos amina e ácido carboxílico de aminoácidos diferentes dando origem, assim, à cadeias polipeptídicas formados por amidas monossubstituídas. A estrutura, nome, e abreviação de uma letra dos 20 aminoácidos naturais estão representados na Figura 1.

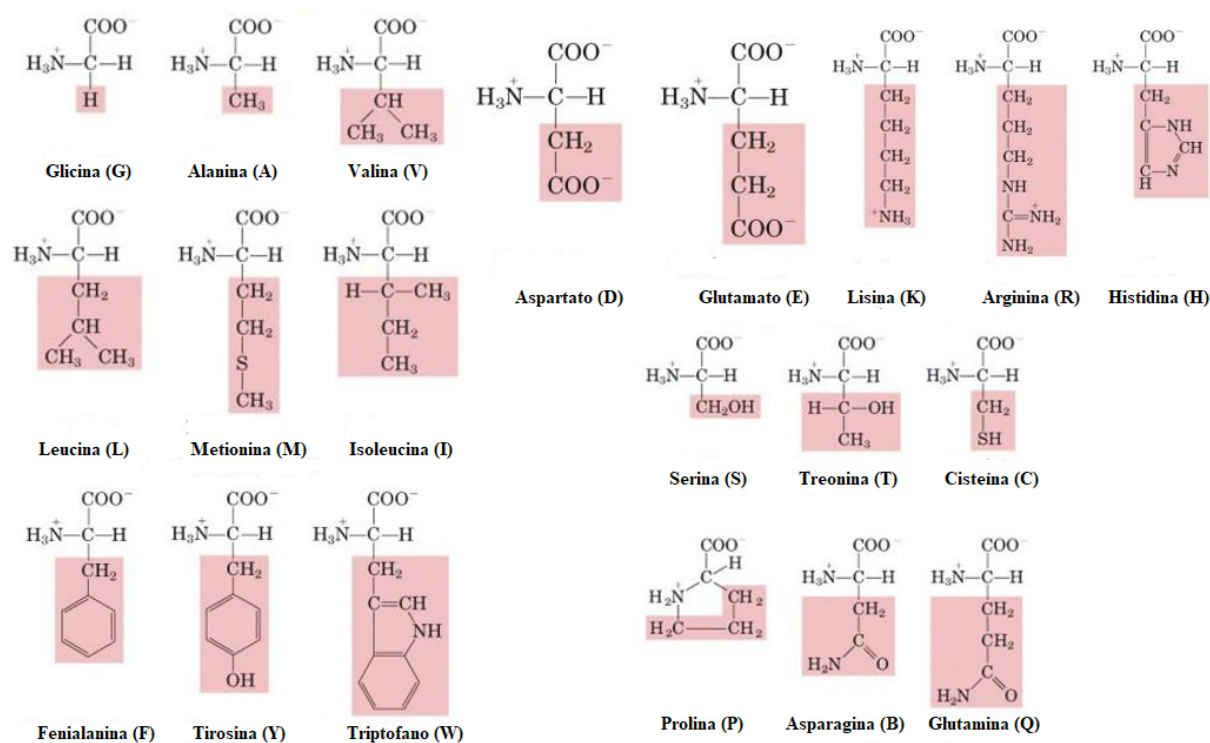


Figura 1. Estrutura, nome, e abreviação de uma letra dos 20 aminoácidos naturais (Adaptado de: Princípios de Bioquímica de Lehninger 6ª Edição¹).

A atividade antimicrobiana de peptídeos já é bem estabelecida, com destaque para as atividades antibacterianas. Por outro lado, existe uma necessidade crescente de obter-se novas drogas antivirais, que possam ser aplicadas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças emergentes e reemergentes, como AIDS, HPV, hepatite, doenças causadas pelo vírus da influenza e, em particular, por vírus que sofrem mutações e que se tornam mais resistentes ao longo dos anos. Tal ação é essencial para a saúde pública.^{2,3}

A atividade antiviral de peptídeos já foi demonstrada em alguns trabalhos.⁴ O estudo dessa classe de moléculas para o desenvolvimento de fármacos tem se intensificado, pois os peptídeos são, em geral, menos tóxicos.³ Isso ocorre por que a sua degradação no organismo leva à formação de aminoácidos, que têm uma rápida eliminação pelas vias catabólicas do organismo (na forma de ureia, no caso de seres humanos), além de serem altamente específicos e efetivos, tendo uma afinidade muito maior com membranas de células de patógenos que de células humanas, induzindo, assim, a morte de micro-organismos e não do organismo sob tratamento.² Além disso, técnicas muito eficientes de sínteses de peptídeos, como a Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS), facilitariam a sua produção em larga escala. Porém, o uso de peptídeos como fármacos também apresenta desvantagens, como: altos custos de produção, alta sensibilidade a mudanças de pH, suscetibilidade à proteólise, etc.⁵

Peptídeos que interagem com membranas em geral se estruturam na forma de hélice anfifílica.⁶ As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos catiônicos interagem com as regiões com alta densidade de carga negativa da membrana, enquanto os resíduos apolares interagem com as regiões mais ricas em carbono e hidrogênio. Essa interação promove uma mudança na transição de fase da membrana, podendo, assim, perturbar a sua integridade, romper o equilíbrio osmótico e, posteriormente, causar a lise celular. Tal mudança pode ser caracterizada por Calorimetria de Varredura Diferencial usando membranas modelo.^{7,8}

Moléculas com capacidade de induzir lise celular são potenciais agentes antimicrobianos, porém a sua seletividade e toxicidade devem ser avaliadas, para que não ocorra morte do hospedeiro em tratamento. Peptídeos antivirais podem prevenir a interação entre os vírus e os receptores da célula hospedeira ou inibir o complexo de replicação viral, interferindo em interações proteína-proteína, prejudicando, assim, a proliferação desses vírus no hospedeiro.³

Trabalhos recentes^{7,8} mostram que peptídeos com relevantes atividades biológicas podem estar contidos em uma proteína, ou seja, a sequência de aminoácidos que define a estrutura primária de tal peptídeo com atividade de interesse pode estar presente com papel estrutural na macromolécula em questão, ou seja, não necessariamente é atribuída uma função para tal região da proteína.⁸ Tais peptídeos são ditos encriptados e podem ter uma atividade diferente daquela exercida pela sua proteína de origem. É dito que tal atividade está encriptada na proteína em questão, chamada de proteína parental. Dezenas de peptídeos encriptados que apresentam níveis relevantes de interação com membranas modelo já foram identificados usando o software Kamal. Alguns desses peptídeos tiveram a atividade antibacteriana comprovada.^{7,8}

A estrutura molecular dos compostos químicos está intimamente relacionada com a função dos mesmos, e isso não é diferente com biomoléculas. Já foi percebido que peptídeos com interação com membranas modelo possuem características físico-químicas (derivadas de suas estruturas) similares, como carga entre +1 e +6 em pH 7, massa entre 2.200 Da e 3.200 Da, ponto isoelétrico entre 8 e 11, além de momento hidrofóbico entre 0,3 e 1,4.⁷ Porém, tais valores são aproximados, e pode ser difícil variar uma dessas propriedades sem variar as outras, já que todas estão intimamente relacionadas com a estrutura molecular.

A estrutura tridimensional de moléculas, incluindo estruturas secundárias e terciárias de peptídeos ou de proteínas podem ser determinadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Além disso, tal técnica pode ser usada para estudos de dinâmica molecular, como processos de interação peptídeo-alvo, por meio de: avaliação de flexibilidade física, cinética de interação, mudanças na interação devido a alterações no ambiente químico, como; pH, força iônica da solução, presença de agentes desnaturantes, etc.

A RMN é preferível à espectroscopia de Difração de Raios-X (DRX) em muitos casos de estudos acerca da estrutura de biomoléculas por dois motivos: a dificuldade ou impossibilidade de obter-se o monocristal da substância em questão; e o fato da estrutura molecular determinada por DRX ser a estrutura da molécula no estado cristalino. No caso de estudos realizados por meio da técnica de RMN a estrutura da molécula é obtida em solução e, portanto, em condições mais próxima das encontradas em estado fisiológico.⁹

Nesse trabalho, foi prospectado um novo peptídeo que tem estrutura primária contida em uma proteína do genoma humano, com possível atividade antiviral, utilizando o *software* Kamal. Após a obtenção da sequência de aminoácidos, a síntese do peptídeo foi realizada.

Estudos por meio da técnica de RMN também foram realizados visando a determinação da estrutura tridimensional de tal biomolécula.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Prospecção e síntese de peptídeos com atividade biológica

Proteínas são macromoléculas biológicas constituídas por uma ou mais cadeias poliméricas de aminoácidos (Figura 2). As proteínas são moléculas constituinte dos seres vivos e participam de muitos processos celulares, como resposta a estímulos, transporte de moléculas, catálise de reações bioquímicas, entre outros. O que difere as proteínas dos peptídeos é o tamanho da cadeia polipeptídica, ou seja, peptídeos são cadeias oligoméricas, tendo massa molar menor que 10.000 Da.¹

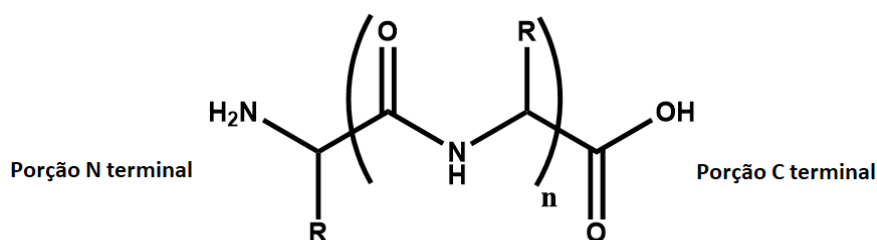


Figura 2. Estrutura geral de peptídeos e proteínas.

Ambas as classes de biomoléculas podem apresentar níveis de organização estrutural. São eles: estrutura primária, estrutura secundária e estrutura terciária (Figura 3). A estrutura primária é definida pela sequência de aminoácidos que configura a biomolécula. A estrutura secundária de um peptídeo diz respeito a arranjos espaciais particularmente estáveis dos átomos de uma cadeia polipeptídica, sem levar em consideração a conformação de suas cadeias laterais. A estrutura secundária de peptídeos e proteínas inclui padrões regulares, como as hélices e as folhas beta. Já a estrutura terciária representa o arranjo espacial ao longo de toda a cadeia de aminoácidos, podendo, inclusive, haver proximidade espacial entre resíduos de aminoácidos que são distantes na estrutura primária.¹

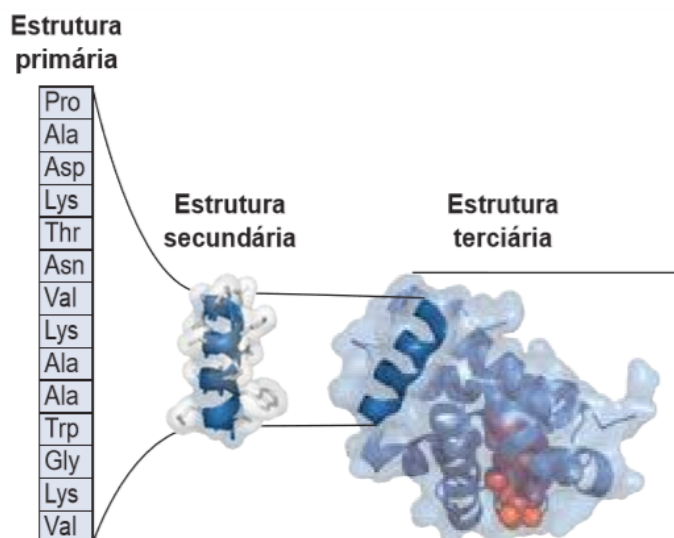


Figura 3. Hierarquia estrutural de peptídeos (Adaptado de: Princípios de Bioquímica de Lehninger 6ª Edição¹).

As atividades dos peptídeos bioativos estão intimamente relacionadas à sua estrutura terciária e, por conseguinte, pela sua sequência de aminoácidos. Estudos sobre interações de peptídeos com membranas modelo mostram que peptídeos que se estruturam em α -hélice anfifílica apresentam, em geral, capacidade de interagir com membranas, interferindo em uma transição de fase do tipo ordem-desordem, que parte da fase gel para a fase de cristal líquido (Transição $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$).⁶ Tal interferência pode causar: perda do equilíbrio osmótico, induzindo lise celular, ou possibilitar a entrada do peptídeo no meio citoplasmático. Tais atividades podem resultar em ações antimicrobianas.

Também já foi demonstrado que peptídeos com atividades biológicas podem ser identificados por meio da análise da sequência de aminoácidos de uma proteína. Tais peptídeos são ditos encriptados e podem ter uma atividade diferente daquela exercida pela proteína de origem. Já foram identificadas diferentes atividades biológicas encriptadas nas estruturas primárias de diversas proteínas, tais como: opióides nas caseínas do leite¹⁰; anti-hipertensiva em proteínas como miosina, troponina e actina, que estão presentes em carnes¹¹; antimicrobianas em proteínas de plantas⁷; além de atividades antioxidantes e anticâncer.¹²

Um exemplo de peptídeo antiviral encriptado em proteína é o VIRIP (Virus-Inhibiting Peptide), que possui a estrutura primária LEAIPMSIPPEVKFNKPFVF encriptada na alfa-1-antitripsina, uma proteína que tem função de inibir a ação das enzimas trombina, plasmina e

elastase, que tem importante participação na resposta inflamatória normal do corpo humano. Tal peptídeo tem ação de supressão da infecção e da replicação de vírus HIV-1 em células sanguíneas humanas.¹³

Os peptídeos com possíveis atividades de interação com membrana podem ser identificados utilizando o *software* Kamal. Em linhas gerais, o Kamal realiza uma proteólise *in silico* de proteínas codificadas em um dado genoma, gerando como resultado peptídeos com número de resíduos de aminoácido pré-definidos. Esses peptídeos são então submetidos a um processo de filtragem, que seleciona aqueles com possíveis atividades biológicas. Tal filtro é feito estipulando-se o intervalo de algumas propriedades físico-químicas, como: carga da biomolécula em pH 7, ponto isoelétrico, momento hidrofóbico, massa molar, agregação e hidrofobicidade média.⁷

A definição das propriedades físico-químicas que serão utilizadas na análise do software Kamal é importante para o sucesso da busca de peptídeo com atividades biológicas relevantes. Por exemplo, idealmente, a massa molar de um fármaco antiviral não deve ser alta, para que os produtos de sua degradação não se acumulem nos tecidos, gerando menor toxicidade.³ Já as outras propriedades citadas acima estão relacionadas com a possibilidade de estruturação do peptídeo em α -hélice quando em contato com membranas. A presença de carga positiva facilita a aproximação às membranas, já que as mesmas possuem, geralmente, cargas negativas ou átomos muito eletronegativos, como oxigênio e nitrogênio, em seus grupamentos cabeça. A hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico, que é a soma dos vetores hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácido, estão relacionadas com a disposição do peptídeo de ter uma estrutura anfifílica, ou seja, de ter a aptidão de interagir com ambos os ambientes (polar e apolar) da membrana.

Os mecanismos de ação de peptídeos antivirais já conhecidos envolvem interações na superfície celular ou entrada no peptídeo no meio citoplasmático. Estes mecanismos são: ligar-se a alvos virais na superfície da membrana celular, competindo por tais sítios com os vírus, para impedir a entrada dos mesmos na célula; supressão da expressão gênica viral, ativação de respostas do sistema imunológico, e ligação a proteínas virais causando inibição da adsorção do vírus em seus alvos (Figura 4).⁴ Então, dados advindos de estudos sobre interação entre peptídeos antivirais e membranas modelo são necessários para entender quais propriedades estruturais conferem atividade antiviral a peptídeos.

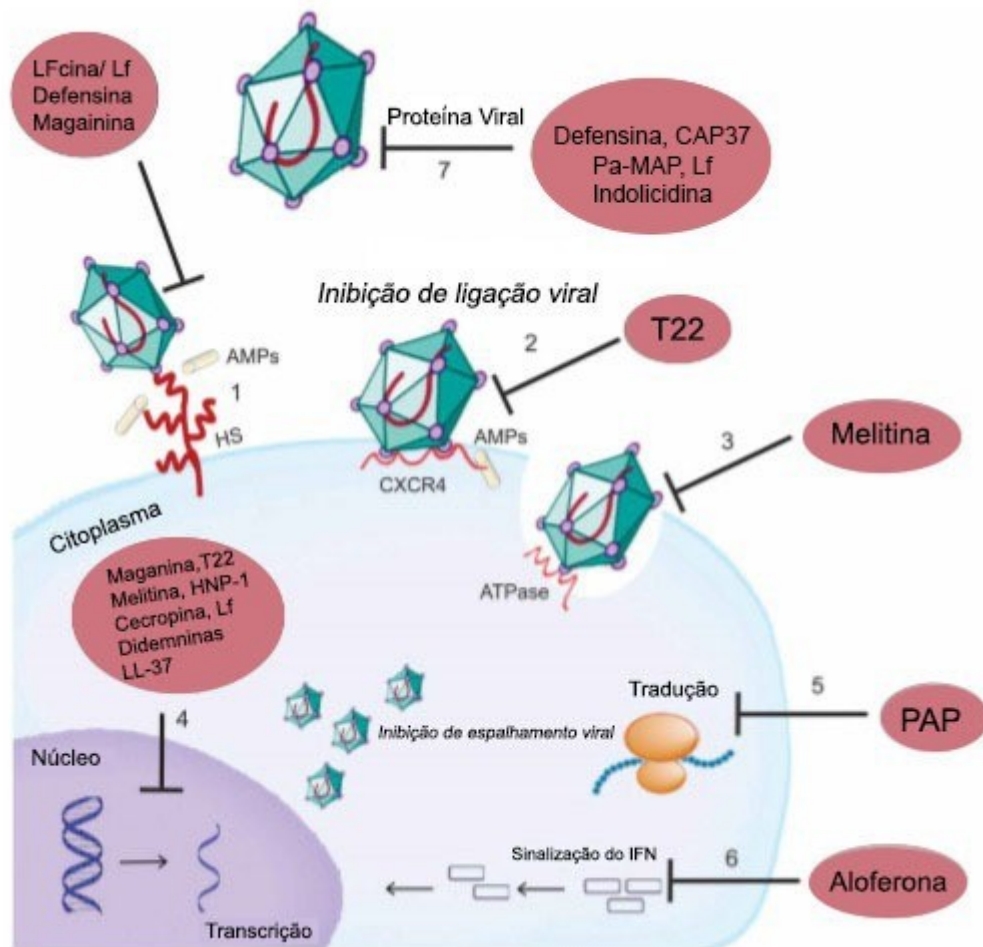


Figura 4. Alguns mecanismos de ação de peptídeos antivirais, como: ligar-se a alvos virais na superfície da membrana, competindo por tais sítios com os vírus, impedindo a entrada dos patógenos na célula (1); supressão da expressão gênica viral (4); ativação de respostas do sistema imunológico (6); ligação a proteínas virais causando inibição da adsorção do vírus em seus alvos (7) (Adaptado de Mulder *et al*, 2013).⁴

Após a identificação de potenciais sequências de aminoácidos com atividade biológica, esses peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e avaliados como inibidores do crescimento de microrganismos. A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (ou SPPS, do inglês, *Solid Phase Peptide Synthesis*) é um método muito eficiente para a síntese de tais biomoléculas, pois ele permite o maior rendimento em cada uma das etapas de acoplamento de aminoácidos por meio do uso de reagentes em excesso e da fixação dos aminoácidos em uma fase sólida que diminui as perdas físicas. O acoplamento de aminoácidos é feito sobre uma resina insolúvel, geralmente composta por derivados de poliestireno, a partir do grupo carboxila do aminoácido da porção C-terminal do peptídeo em questão, ou seja, a síntese é feita na direção contrária à da direcionalidade da biomolécula. A SPPS apresenta limitações,

como o fato de que impurezas derivadas de reações laterais, reações incompletas e reagentes impuros, que podem acumular sobre a resina.¹⁴

Um dos fatores essenciais na SPPS é a proteção das cadeias laterais e dos grupamentos amino das porções N-terminais. Os aminoácidos usados em tal método de síntese já devem estar protegidos antes do início da síntese. Há diferentes estratégias de SPPS mas, neste trabalho, é apenas utilizada a estratégia Fmoc/tBu. Como o grupo Fmoc tem a função de proteger o grupo amino, esse deve ser removido na etapa anterior ao acoplamento com o aminoácido seguinte. Tal remoção pode ser feita com uma base de Lewis, o mecanismo com o uso de 4-metilpiperidina está representado na Figura 5.

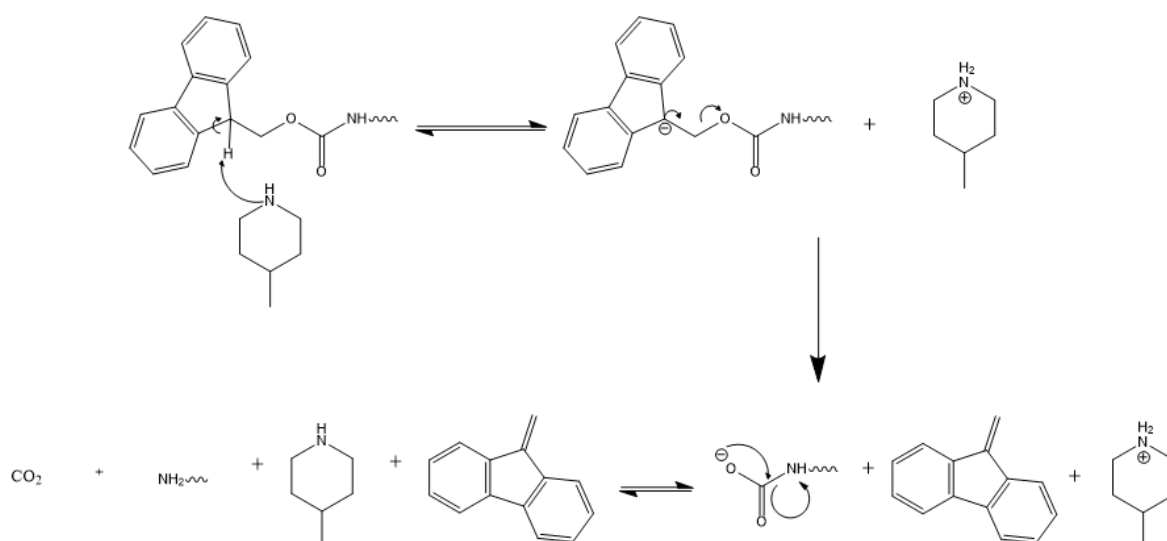


Figura 5. Mecanismo de desproteção do grupo amino, usando 4-metilpiperidina como base de Lewis.

As reações de acoplamento de aminoácidos seguindo o método Fmoc/tBu são feitas utilizando-se uma carbodiimida como substância que ativa a carboxila do aminoácido que será acoplado, para que possa reagir com o grupo amina previamente desprotegido. Durante o processo de síntese, o peptídeo está sujeito à racemização. Para evitar tal processo, utiliza-se o reagente Oxima como agente de supressão de tal reação.¹⁵ A Oxima faz com que o carbono da carbonila se torne muito mais eletrofílico, fazendo com que o grupo amina presente no aminoácido ligado à resina ataque apenas como nucleófilo, impedindo uma reação de enolização (que ocorreria caso a amina agisse como base), que pode levar à racemização do composto. O mecanismo geral para as reações de acoplamento, usando Diisopropilcarbodiimida (DIC) para ativação da carboxila, está representado na Figura 6.

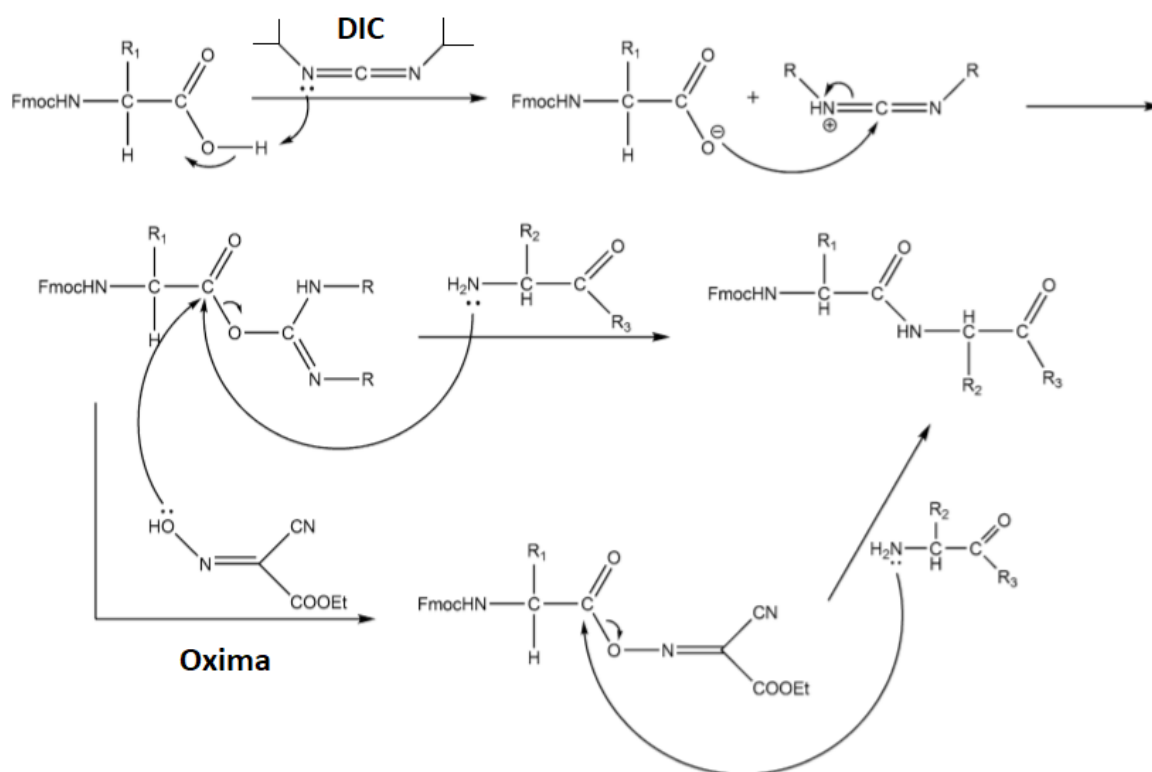


Figura 6. Mecanismo geral para reações de acoplamento na SPPS pelo método Fmoc/tBu, utilizando diisopropilcarbodiimida como ativador do grupo carboxila e Oxima como supressor de enantiomerização (Adaptado de Pires *et al*, 2014).¹⁵

A última etapa em uma síntese pelo método Fmoc/tBu consiste em uma reação mediada por condições ácidas para retirada dos grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos (Figura 7). Nesta etapa, geralmente usa-se Ácido Trifluoroacético (TFA) para atingir a condição reacional ácida. Há, também, o uso de reagentes nucleofílicos tais como tioanisol, fenol, etanoditiol e água, que participam tanto da remoção dos grupos laterais como da clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina, gerando um peptídeo amidado.¹⁵ O mecanismo de tal clivagem está representado na Figura 8.

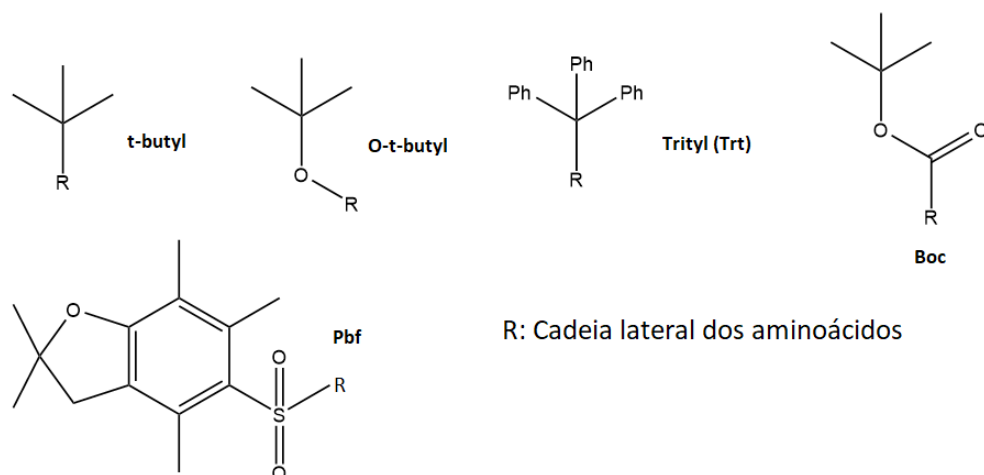


Figura 7. Grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos.

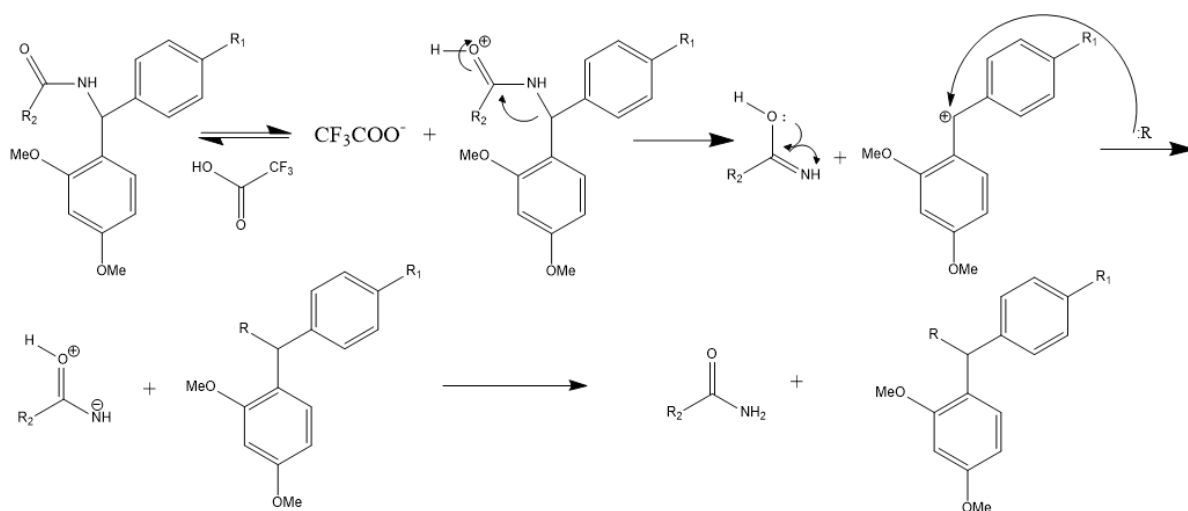


Figura 8. Mecanismo de clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina, onde R é um nucleófilo.

Espectroscopia de RMN na resolução de estruturas de biomoléculas

A espectroscopia de RMN é fundamentada em um fenômeno que ocorre com núcleos atômicos que possuem número de spin nuclear diferente de zero e que são submetidos a um campo magnético (B_0) intenso. Núcleos com spin igual a $\frac{1}{2}$ (como núcleos de hidrogênio), ao serem submetidos a um campo magnético B_0 perdem a degenerescência e o sistema, então, passa a apresentar dois estados energéticos possíveis: um estado de menor energia, no qual os núcleos têm seus vetores momento magnético na mesma direção e sentido que o campo magnético; e um estado de maior energia, no qual os núcleos têm seus vetores momento magnético na mesma direção porém no sentido contrário do campo magnético. A proporção

entre as populações de spins presentes em cada um dos estados pode ser dada pela distribuição de Boltzmann, segundo a fórmula:

$$N_1/N_2 = e^{\Delta E/kT} \text{ (Equação 1)}$$

onde N_1 é a população de núcleos no estado de menor energia, N_2 é a população de núcleos no estado de maior energia, ΔE é a diferença de energia entre os estados, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta do sistema.

Ao incidir-se radiação eletromagnética, na frequência de rádio, núcleos presentes no estado menos energético absorvem energia e sofrem uma transição para o estado de maior energia, invertendo, assim a direção do momento magnético dos seus spins. Tal diferença de energia ΔE , também descrita da Equação 1, pode ser calculada a partir da Equação de Planck:

$$\Delta E = h\nu \text{ (Equação 2)}$$

onde h é a Constante de Planck e ν é a frequência da radiação eletromagnética necessária para realizar a transição (frequência de absorção).

A diferença de energia entre os estados energéticos dos spins depende da intensidade do campo magnético aplicado e do tipo de núcleo analisado (^1H , ^2H , ^{13}C , etc). Tais dependências podem ser verificadas pela seguinte equação:

$$\nu = \gamma B_0/2\pi \text{ (Equação 3)}$$

onde γ é a constante magnetogírica, que tem valores diferentes para os diferentes núcleos. Por fim, os núcleos que foram excitados retornam ao estado de menor energia emitindo radiação eletromagnética. Tal radiação emitida tem frequência dependente, além do campo magnético aplicado, dos campos magnéticos gerados por átomos vizinhos ao núcleo em questão (B_{local}).¹⁶ Devido à relação com a vizinhança do núcleo analisado é que se pode usar o fenômeno de RMN para determinar estruturas moleculares.

A RMN pode ser usada em conjunto com outras técnicas espectroscópicas na análise de biomoléculas, como a Espectrometria de Massas e espectroscopia de Dicroísmo Circular. Porém, a RMN é a única técnica disponível para a determinação estrutural de peptídeos e proteínas de difícil cristalização que se enquadrem no limite de tamanho da molécula de 40 kDa. Em trabalhos de elucidação estrutural de peptídeos, proteínas e macromoléculas em geral, é necessário o emprego de experimentos multidimensionais. Isso ocorre devido ao fato destas moléculas conterem um grande número de núcleos de ^1H , o que leva a sobreposição dos vários sinais obtidos no espectro, dificultando seu assinalamento. Os experimentos multidimensionais dão uma correlação de informações como conectividades estruturais e

vizinhanças espaciais, tornando-os preferíveis aos experimentos unidimensionais para este tipo de estudo, já que, em espectros de RMN unidimensionais de biomoléculas, ocorre intensa sobreposição de sinais.¹⁷ Em geral, para a completa elucidação estrutural a partir de experimentos bidimensionais, são realizados os experimentos de *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY), e *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* (NOESY).

Dessa forma, a análise detalhada de espectros de peptídeos e proteínas está baseada nas correlações via ligação química e naquelas através da distância absoluta entre núcleos. A transferência de magnetização para um núcleo de spin $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{13}C , ^{15}N , por exemplo) via ligação química ocorre pela transmissão de polarização dos elétrons envolvidos nas ligações, sendo um fenômeno conhecido como acoplamento *spin-spin* ou acoplamento escalar J . Na análise de peptídeos, as correlações *spin-spin* são usadas para a identificação do sistema de *spins* de cada aminoácido por meio do experimento de TOCSY. O outro tipo de transferência de magnetização ocorre pelo espaço, sendo conhecido como acoplamento dipolar. Na técnica de RMN, quando os núcleos previamente excitados retornam ao estado de menor energia, diz-se que houve relaxação. Em certos casos, pode ocorrer relaxação cruzada entre dois núcleos que estão próximos. Tal efeito é denominado de *Nuclear Overhauser enhancement* (NOE) e pode derivar valores de distâncias espaciais que é usado em estudos estruturais de peptídeos por meio do experimento de NOESY. Os átomos envolvidos em NOE devem estar a menos de 5 Å de distância entre si e, portanto, não há um limite de ligações químicas presentes entre tais núcleos para que o fenômeno ocorra.^{17,18} Os padrões de NOE que definem as estruturas secundárias regulares em peptídeos estão mostrados na Figura 9.

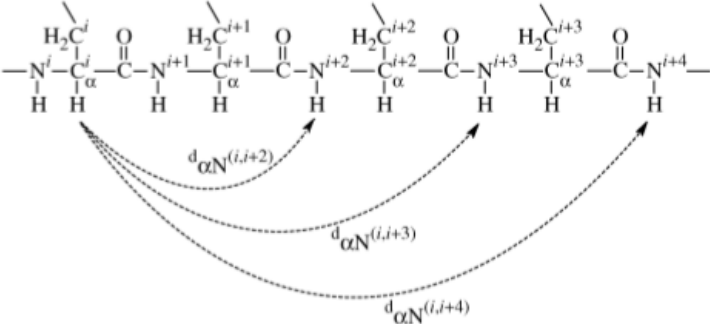
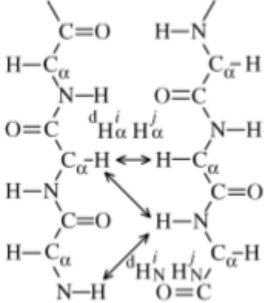
NOE observado	Elementos de estrutura secundária
$H_{\alpha,i} - H_{N,i+2}$ $H_{\alpha,i} - H_{N,i+3}$ $H_{\alpha,i} - H_{N,i+4}$	<p>α-hélice</p>  <p>The diagram illustrates an alpha-helix structure with residues i through $i+4$. Each residue is represented by its α-carbon (C_{α}), amide nitrogen (N), and carbonyl oxygen (O). The α-proton (H_{α}) and amide proton (H_N) are explicitly shown. Dotted arrows indicate NOE interactions from $H_{\alpha,i}$ to $H_{N,i+2}$, $H_{N,i+3}$, and $H_{N,i+4}$. These interactions are labeled as $d_{\alpha N}^{(i,i+2)}$, $d_{\alpha N}^{(i,i+3)}$, and $d_{\alpha N}^{(i,i+4)}$ respectively.</p>
$H_{\alpha,i} - H_{N,j}$ $H_{N,i} - H_{N,j}$ $H_{\alpha,i} - H_{\alpha,j}$	<p>Folhas-β</p>  <p>The diagram shows a beta-sheet structure with two residues, i and j, in adjacent strands. Each residue is shown with its α-carbon (C_{α}), amide nitrogen (N), and carbonyl oxygen (O). The α-proton (H_{α}) and amide proton (H_N) are explicitly shown. Dotted arrows indicate NOE interactions: $H_{\alpha,i} - H_{N,j}$, $H_{N,i} - H_{N,j}$, and $H_{\alpha,i} - H_{\alpha,j}$. These interactions are labeled as $d_{H_{\alpha} H_N}^{i,j}$, $d_{H_N H_N}^{i,j}$, and $d_{H_{\alpha} H_{\alpha}}^{i,j}$ respectively.</p>

Figura 9. Padrões de NOE que definem α -hélices e folhas- β . Tais padrões são obtidos a partir de experimentos de NOESY para estudos sobre estruturas secundárias de peptídeos (Adaptado de Greenbaum and Ghose, 2010).¹⁸

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar e determinar a estrutura tridimensional por meio da técnica de RMN de um peptídeo com possível atividade antiviral, prospectado com o auxílio do software Kamal.

METODOLOGIA

Prospecção pelo Kamal

A prospecção de peptídeos foi realizada pelo *software* Kamal, onde proteínas que são super-expressas no plasma humano quando há infecção viral foram selecionadas para que a proteólise *in silico* fosse realizada. O Kamal foi configurado de forma a ser retirada a possibilidade de apresentarem-se aminoácidos fortemente apolares (como: valina, leucina, triptofano e fenilalanina) em campos destinados a aminoácidos hidrofílicos, o ângulo polar (ângulo formado entre as faces polares do peptídeo) utilizado foi de 192° e o comprimento do peptídeo limitado a 24 aminoácidos. Os peptídeos resultantes da proteólise em *sílico* tiveram, então, suas propriedades físico-químicas avaliados para que um peptídeo fosse escolhido para ser sintetizado.

Síntese do peptídeo

O método utilizado para a síntese do peptídeo foi a SPPS pela estratégia Fmoc/tBu, utilizando: aminoácidos previamente protegidos, 4-metilpiperidina (solução 20% em DMF) como base de Lewis para desproteção do grupo amino, resina composta por *Rink amide* ligada a aminometilpoliestireno (Especificação: 100-200 mesh) e sua ativação utilizando-se

Diclorometano em agitação por 30 minutos, DMF e Diclorometano para lavagem da resina após cada etapa de acoplamento e de desproteção, Oxima como agente supressor de racemização, DIC como ativador do grupo carboxila, DMF como solvente para as reações de acoplamento; e realizando-se o Teste de Kaiser para verificar o sucesso de cada acoplamento e de cada desproteção. A estratégia Fmoc/tBu está representada de forma resumida na Figura 10.

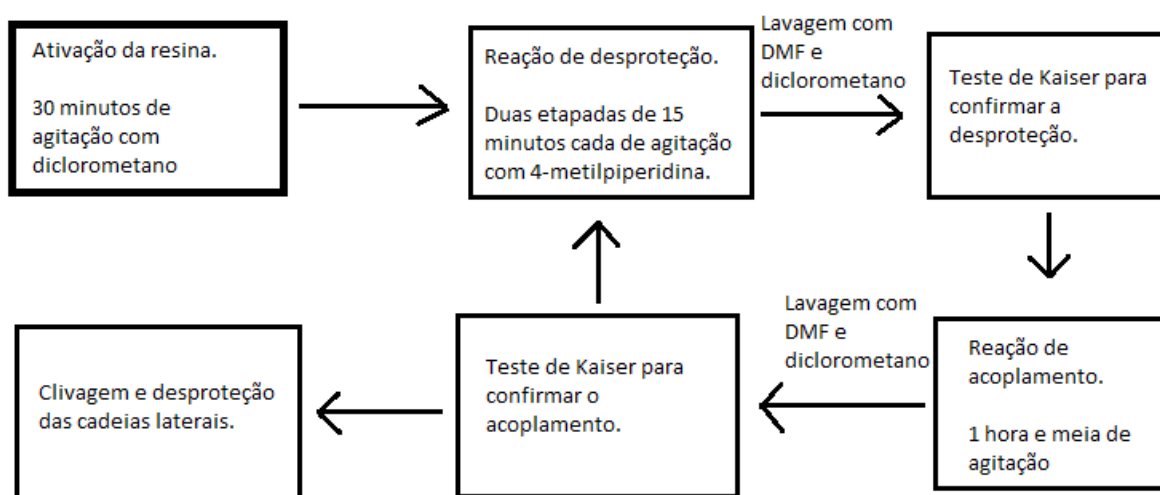


Figura 10. Esquema resumido das etapas realizadas na SPPS pela estratégia Fmoc/tBu.

O Teste de Kaiser é qualitativo, e é usado para detecção de grupos amina livres. Tal teste envolve três soluções: 5% m/v de ninidrina em metanol, 80% m/v de fenol em etanol e KCN em piridina (2 mL de 0,001 molar de KCN para 98 mL de piridina). Adicionou-se duas gotas de cada solução (na ordem citada) em uma alíquota da resina, então, aqueceu-se a 120 °C por aproximadamente um minuto. A formação de grãos de coloração azulada indica a presença de grupos amino livres, ou seja, a desproteção foi bem-sucedida. Para verificação do sucesso de cada acoplamento, o teste deve ter resultado negativo, devendo ser observados grãos incolores ao final do teste.¹⁴

A clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina, além da remoção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi feita com uma solução de TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5: 5:5:5:2,5 v/v.

Purificação por HPLC

Após a clivagem, o peptídeo foi liofilizado, para então ser purificado por HPLC em fase reversa, com monitoramento em 216nm (comprimento de onda relacionado a ligação peptídica). Utilizou-se coluna Vydac 218TP54 c18 analítica em gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v) em água da seguinte forma: entre 0 e 5 minutos a fase móvel possui 5% de acetonitrila, entre 5 e 45 minutos a concentração de acetonitrila na fase móvel aumenta linearmente de 5% até 95%, entre 45 e 55 minutos a fase móvel possui 95% de acetonitrila, entre 55 e 60 minutos a concentração de acetonitrila na fase móvel diminuiu linearmente de 95% a 5%. As injeções foram realizadas em volumes fixos de 1 mL, de forma que 60 mg do produto bruto foram solubilizadas em 6 mL de água ultrapura (água Mill-Q), levando assim a uma concentração de 10 mg/mL, e então, as injeções foram realizadas.

Confirmação da estrutura primária por Espectrometria de Massas

Após purificação, a identidade do peptídeo sintetizado foi confirmada por Espectrometria de Massas com base na razão massa/carga esperada. Para tal análise, utilizou-se o Espectrômetro de Massas MALDI-TOF/TOF (UltraFlex 3, Bruker Daltonics) disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massas da Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia. Preparou-se a placa de MALDI misturando-se o peptídeo em uma proporção 3:1 a uma solução matriz de 10 mg/mL de Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 3% (v/v) de TFA. Aplicou-se tal mistura na placa, que foi seca sob atmosfera ambiente. Calibrou-se o equipamento depositando, também na placa, uma mistura de calibrantes externos com a matriz. O peptídeo foi analisado em modo refletor positivo e o íon correspondente à massa/carga do peptídeo de interesse foi fragmentado via LIFT51 para confirmação da estrutura primária segundo a série b, na qual o íon molecular sofre uma perda neutra de 17 unidades (para peptídeos amidados) e então se fragmenta de forma que o fragmento de menor razão massa carga detectado é referente ao resíduo N terminal; e segundo a série y, na qual o íon molecular sofre uma perda referente a massa do resíduo N terminal e então se fragmenta, de modo a que o fragmento de menor razão massa carga detectado é referente ao resíduo C terminal com uma adição de 18 unidades.

Caracterização estrutural utilizando Dicroísmo Circular

Experimentos de Dicroísmo Circular foram realizados usando vesículas grandes unilamelares (LUVs) em diferentes concentrações (0 μM , 40 μM , 80 μM , 160 μM , 320 μM , 640 μM , 1280 μM e 2000 μM) para uma mesma quantidade de peptídeo (40 μM). As LUVs utilizadas foram usadas DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e DMPG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-glicerol), para que fosse analisada a tendência de estruturação do peptídeo frente ao aumento da concentração das LUVs. Tais suspensões foram submetidas ao espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co., Japão) e a faixa de comprimentos de onda selecionada foi entre 200 nm e 260 nm, realizando-se quatro varreduras à temperatura ambiente, feitas em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, com tempo de resposta de 0,5 segundos e intervalo de 0,2 nm.

Caracterização funcional com testes de Concentração Inibitória Mínima

Testes de CIM (Concentração Inibitória Mínima) para a verificação de atividade antimicrobiana do peptídeo foram realizados, após purificação e identidade confirmada. Tais testes foram realizados com as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e foram avaliadas concentrações entre 0,25 μM e 128 μM . O peptídeo na faixa de concentração de 128 μM a 0,5 μM foi incubado por 24 h a 37 °C, em meio de cultura líquido, com bactérias nas concentrações finais 5×10^5 células.mL⁻¹. Este procedimento foi realizado em meio Mueller-Hinton (Himedia). O peptídeo Hs02 foi utilizado como controle positivo. Foram utilizados os microrganismos em seus respectivos meios de crescimento como controle negativo. Para garantir a esterilidade do meio de cultura, foi feito um controle deste na ausência de bactérias e de peptídeos. Após o período de incubação, a concentração inibitória mínima do peptídeo contra cada bactéria foi avaliada visualmente, sendo o meio turvo considerado como resultado de ausência de inibição e meio límpido como resultado de inibição.

Preparo de amostra para realização dos experimentos de RMN

Para um estudo mais detalhado da estrutura da biomolécula, a análise por RMN foi realizada. Com a finalidade de se preparar a amostra para os experimentos de RMN, quantificou-se uma solução de peptídeo por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV-

VIS. A massa disponível do peptídeo foi solubilizada em água ultrapura (água Mill-Q) e então diluída, também em água ultrapura. Tal diluição é necessária para que os valores de absorvância obtidos para cada um dos comprimentos de onda selecionados respeitem os limites da Lei de Beer-Lambert. Os comprimentos de onda selecionados são 205 nm, 215 nm e 225 nm. A equação empírica usada para a quantificação de tal amostra encontra-se abaixo:

$$CP (\mu\text{g} / \text{mL}) = (X + Y) \cdot FD / 2 \text{ (Equação 4)}$$

Onde CP é a concentração do peptídeo em microgramas por mL, FD é o fator de diluição utilizado,

$$X = (A_{215} - A_{225}) \cdot 144 \text{ (Waddel, 1956) (Equação 5)}$$

e

$$Y = A_{205} \cdot 31 \text{ (Scopes, 1974) (Equação 6)}$$

sendo que A_{215} , A_{225} e A_{205} são os valores de absorvância medidos para 215 nm, 225 nm e 205 nm, respectivamente.

A fim de que fosse preparada 550 μL de solução a 1,28 mM de peptídeo para serem realizados os experimentos de RMN, pipetou-se, da solução quantificada, 49 μL em um frasco, onde, também, foram pipetados 55 μL de D_2O , 400 μL de tampão PBS e 46 μL de uma solução contendo 6,8 mg de DPC-d38 (Dodecilsfosfolina completamente deuturada). Tal solução de 46 μL de DPC-d38 tem concentração de 380,01 M, mas, com a diluição, a solução final tem concentração de 31,783 mM (molaridade aproximadamente 25 vezes maior que a de peptídeo). Tal solução tem apenas 10% de D_2O para que sejam evitadas trocas de hidrogênios lábeis do peptídeo por deutério. O pH da solução foi aferido com um pHmetro.

Estudos estruturais por RMN

Foram realizados experimentos de RMN de ^1H monodimensionais e bidimensionais *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) e *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy* (NOESY) no Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker Avance III HD 600 instalado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade de Brasília, operando em campo magnético de 14 T e frequência de 600 MHz. Os experimentos de TOCSY e NOESY foram feitos seguindo os parâmetros citados na Tabela 1. Ambos os experimentos foram realizados com supressão do sinal da água.

Tabela 1. Parâmetros para a obtenção dos espectros de TOCSY e NOESY.

	Time Domain	Número de Incrementos	Número de Scans	Mixing Time
TOCSY	4096	512	128	100 ms
NOESY	4096	512	128	200 ms

A atribuição sequencial da cadeia peptídica foi feita segundo o método descrito por Wuthrich.¹⁷ As estruturas foram calculadas utilizando o software ARIA (versão 2.0) e um protocolo de *simulated annealing* e refinamento com base no Diagrama de Ramachandran. Os programas Pymol e CcpNmr Analysis foram usados para avaliar a qualidade das estruturas.

Cronograma de Atividades

O cronograma das atividades realizadas de tal projeto encontra-se a seguir:

	2018					2019					
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Etapa 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Etapa 2			X	X	X						
Etapa 3						X	X	X			
Etapa 4								X	X	X	
Etapa 5										X	X

Etapa 1: Pesquisa Bibliográfica

Etapa 2: Síntese, purificação e confirmação da identidade do peptídeo.

Etapa 3: Obtenção dos espectros de RMN e CD, em conjunto com a realização dos testes de CIM.

Etapa 4: Análise dos espectros de RMN, cálculo e refinamento de estruturas.

Etapa 5: Elaboração da versão final do Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Química.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção, síntese, purificação, estudos estruturais preliminares e estudos de atividade antimicrobiana do peptídeo.

O peptídeo escolhido utilizando-se de prospecção pelo software Kamal para o desenvolvimento desse projeto tem a seguinte estrutura primária: KKLVRLEHAAKQAAA. Tal sequência de aminoácidos está contida na Talina, uma proteína citoplasmática de aproximadamente 230 kDa presente nos seres humanos e em outros seres vivos. A Talina tem funções relacionadas à geração de uma conexão transmembrânica entre integrinas e actinas, presentes no citoesqueleto.¹⁹ Tal peptídeo foi batizado de Hs07 e tal etapa desse projeto foi realizada pela aluna de doutorado Michele Ávila dos Santos, também pertencente ao grupo de pesquisa.

A síntese do peptídeo foi realizada com um leve excesso de massa (frente a referências usadas e desenvolvidas pelos alunos e pesquisadores do laboratório) dos reagentes sólidos para cada etapa, a fim de garantir que cada etapa ocorra com o maior rendimento possível. A massa de Oxima utilizada como referência foi de 0,085 g; e as referências para a massa de cada aminoácido protegido, além das massas de Oxima e Aminoácidos protegidos utilizadas em cada etapa da síntese encontram-se na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Massas dos reagentes sólidos utilizadas em cada etapa da síntese, além das massas de referência para cada Aminoácido Protegido utilizado.

Etapa da Síntese	Aminoácido protegido	Massa de Oxima utilizada (g)	Massa medida de aminoácido protegido (g)	Massa de referência para o aminoácido protegido (g)
1ª	Fmoc-Ala-OH	0,091	0,198	0,1868
2ª	Fmoc-Ala-OH	0,087	0,215	0,1868
3ª	Fmoc-Ala-OH	0,090	0,192	0,1868
4ª	Fmoc-Gln(Trt)-OH	0,088	0,385	0,3664
5ª	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,090	0,295	0,2821
6ª	Fmoc-Ala-OH	0,091	0,204	0,1868
7ª	Fmoc-Ala-OH	0,091	0,198	0,1868
8ª	Fmoc-His(Trt)-OH	0,124	0,388	0,3719
9ª	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,098	0,280	0,2553
10ª	Fmoc-Leu-OH	0,105	0,227	0,2120
11ª	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0,089	0,416	0,3893
12ª	Fmoc-Gln(Trt)-OH	0,096	0,372	0,3664
13ª	Fmoc-Val-OH	0,089	0,242	0,2036
14ª	Fmoc-Leu-OH	0,089	0,212	0,2120
15ª	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,093	0,294	0,2821
16ª	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,099	0,292	0,2821

Os Testes de Kaiser e a etapa de clivagem foram realizados como foi citado na metodologia. Na etapa de clivagem, a solução de TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol foi feita utilizando os seguintes volumes de reagentes, respectivamente: 8,25 mL; 0,5 mL; 0,5 mL; 0,5 mL; 0,25 mL.

Após liofilização, o produto bruto foi submetido à purificação por HPLC. Uma solução de 60 mg do produto bruto em 6 mL de água ultrapura (água Mill-Q) foi preparada, para que injeções manuais de 1 mL dessa solução fossem feitas. Utilizando-se o detector de UV-VIS com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216nm e 280nm, observou-se o primeiro pico do cromatograma em 6,79 minutos, atribuído ao tempo morto; e um pico muito

intenso em 22,02 minutos, atribuído ao peptídeo de interesse. O cromatograma referente à purificação encontra-se na Figura 11, a seguir:

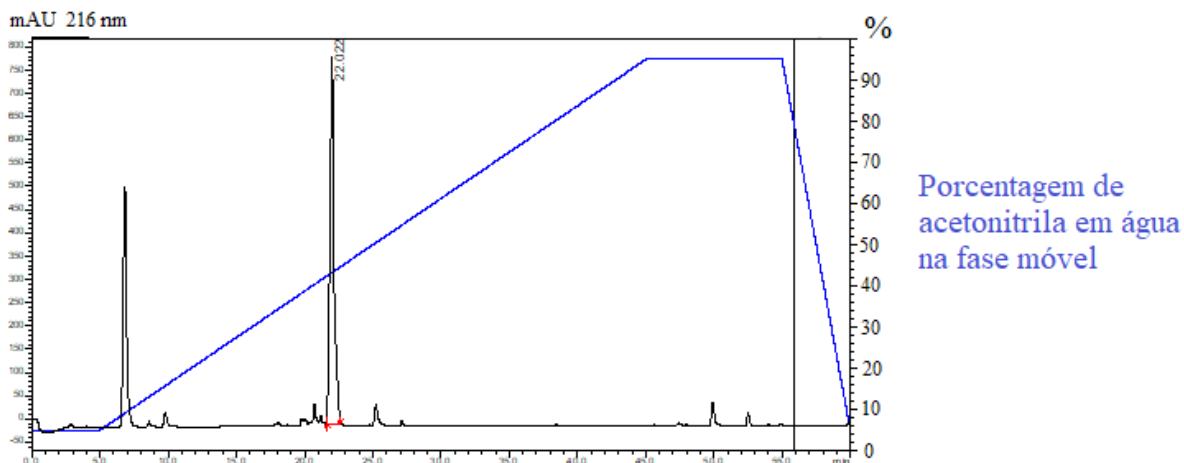


Figura 11. Cromatograma referente à purificação do Hs07 com monitoramento em 216 nm. A linha azul representa o gradiente de acetonitrila.

Pela análise do cromatograma percebe-se que haviam subprodutos de síntese, mas em quantidades muito pequenas. Uma inferência que pode ser feita, também pela análise do cromatograma, é que o peptídeo Hs07 tem uma polaridade considerada média, já que é detectado quando a concentração de acetonitrila (em água) na fase móvel se aproxima de 45%.

A identidade do Hs07 foi confirmada usando Espectrometria de Massas. No espectro de MS/MS (Figura 12), observa-se a presença de um pico em 1761,2; tal razão massa/carga é referente ao peptídeo de interesse no estado $[M + H^+]$. Percebem-se, também, picos referentes às fragmentações da série b, como em: 1403,4 e 996,2; referentes à perda neutra de NH_3 seguida da perda dos fragmentos de AAQ e AAQKAAH respectivamente; e da série y, como em: 1293,3 e 896,0; referentes à perda dos fragmentos KKL V e KKL VQRL respectivamente; tendo, assim, sua estrutura primária confirmada.

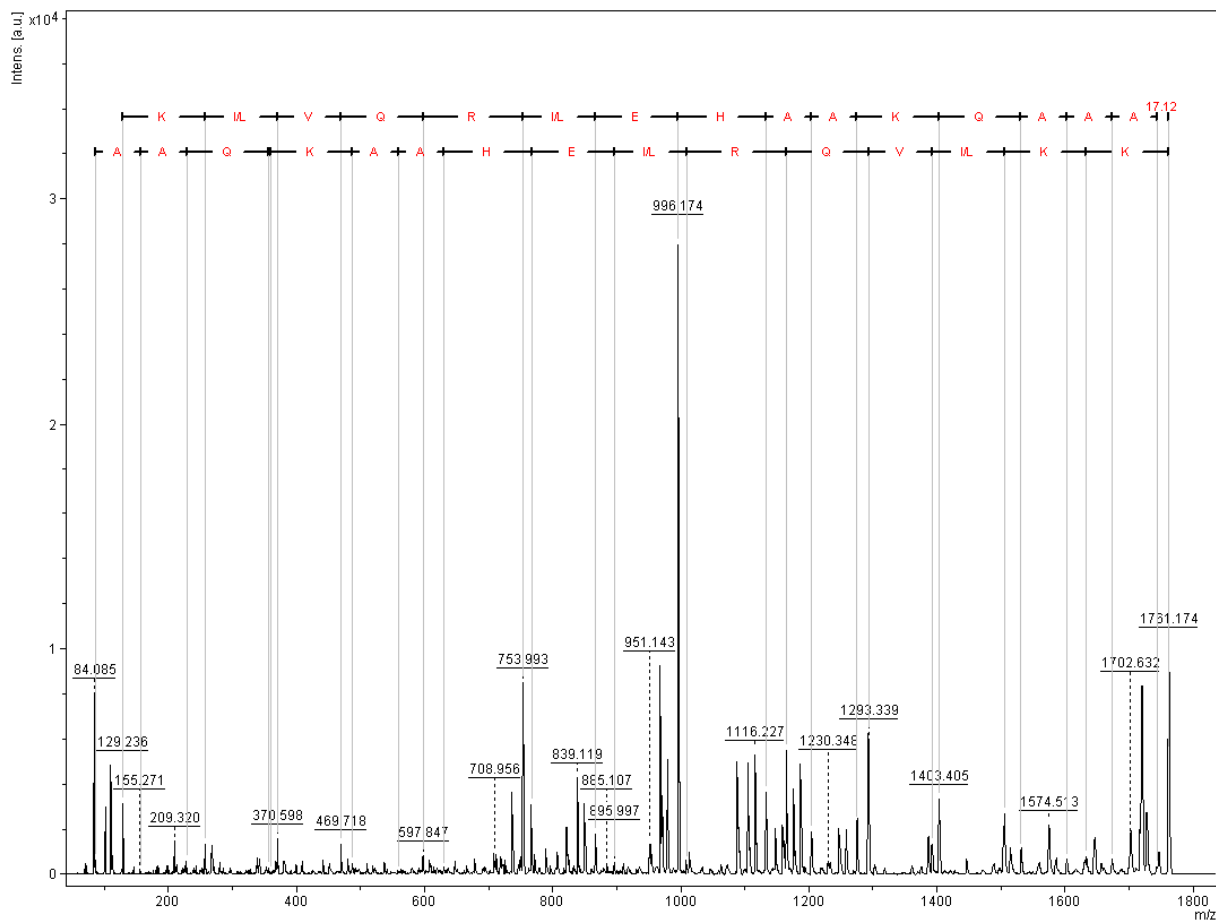


Figura 12. Espectro de massas referente ao peptídeo de interesse, com o íon molecular em 1761,2.

Os espectros de Dicroísmo Circular obtidos para o peptídeo Hs07 em água e na presença de diferentes concentrações de LUVs estão apresentados na Figura 13. Pode-se observar que o peptídeo Hs07 não apresentou estruturação em nenhuma condição estudada, pois os espectros obtidos apresentam sinais negativos próximo a 200 nm. O padrão citado é característico de moléculas desordenadas.^{20, 21}

Os espectros de Dicroísmo Circular obtidos para a amostra em questão são encontrados na Figura 13, a seguir:

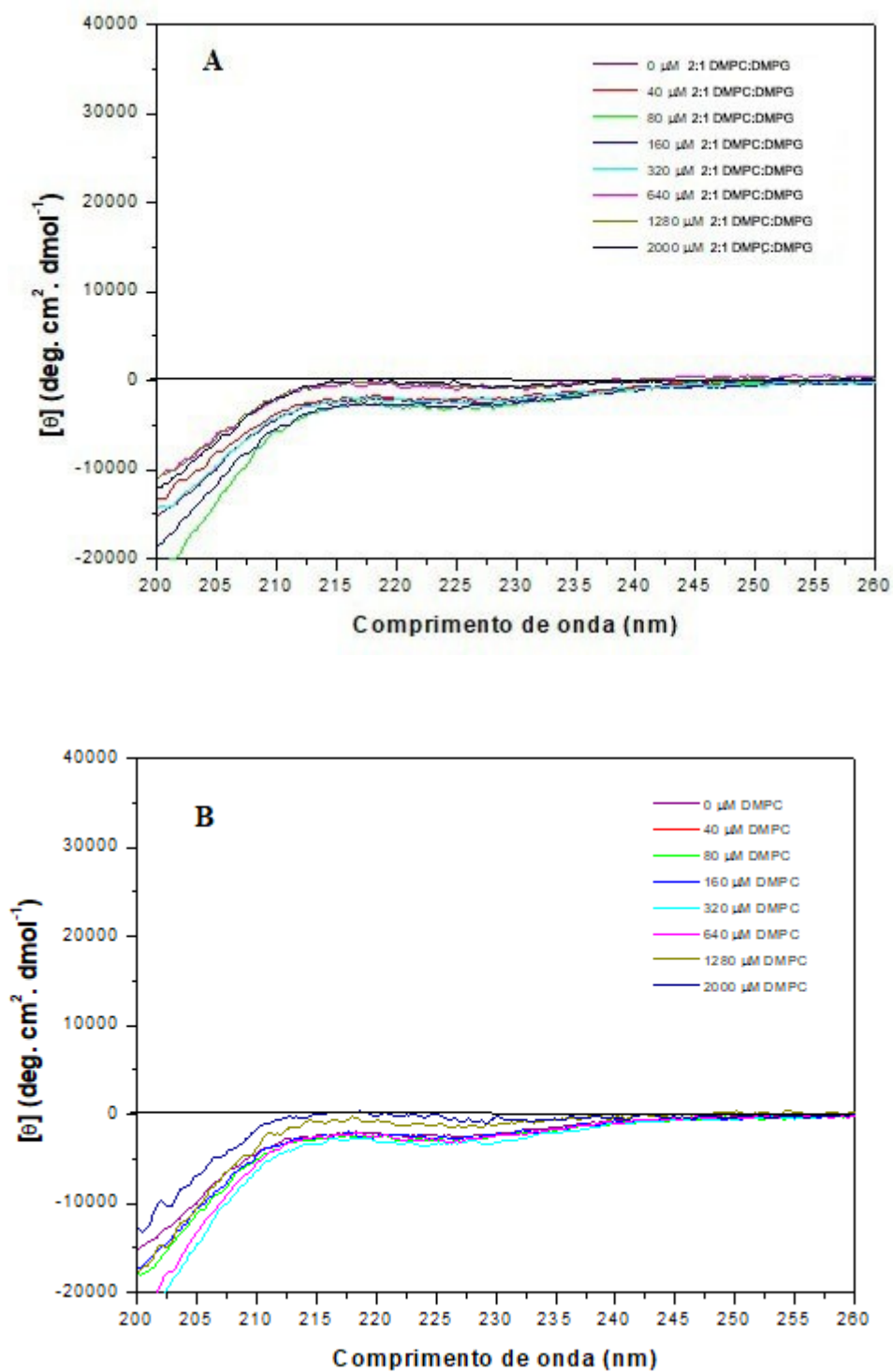


Figura 13. Espectros de Dicroísmo Circular obtido para uma concentração de 40 μM do Hs07 sem a presença de LUVs e com diferentes concentrações de 2:1 DMPC:DMPG (A) e DMPC (B).

A não estruturação do Hs07 pode estar associada ao fato de que sua face hidrofóbica (constituída de Leucina, Alanina e Valina) ser muito rica em Alanina, pois tal aminoácido é pouco hidrofóbico²³, tornando tal face não hidrofóbica o suficiente para interagir com moléculas de DMPC ou DMPG para, então, ser estruturado.

Foram realizados ensaios para se verificar a atividade antibacteriana dessa molécula, pois sabe-se que muitos peptídeos têm caráter promíscuo, tendo mais que apenas um tipo de atividade biológica (antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, moduladora do sistema imune, etc).⁴ Porém, para todas as espécies de bactérias testadas (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*), o Hs07 apresentou CIM (Concentração Inibitória Mínima) maior que a concentração máxima trabalhada no ensaio (128 μM). Pode-se inferir, então, que tal peptídeo não tem atividade antibacteriana. Esse resultado pode ser reflexo da não estruturação do peptídeo Hs07 quando em contato com as membranas das células de bactérias, como indicado pelos experimentos de Dicroísmo Circular realizados na presença de LUVs de DMPC e DMPG, que mimetizam membranas de células bacterianas.

Até o momento da escrita desse Trabalho de Conclusão de Curso, não foi possível obter resultados acerca da atividade antiviral do Hs07.

Como tal peptídeo não apresentou estruturação, escolheu-se um outro peptídeo, também prospectado pelo Kamal, para serem realizados os estudos estruturais por RMN.

Preparação da amostra e estudos estruturais por RMN do peptídeo Bt01.

O peptídeo Bt01 tem estrutura primária LMGLFNRIIRKVVKLFN. Tal sequência de aminoácidos está contida na proteína Acetiltransferase 10, e é conservada nos mamíferos. O Bt01 já foi estudado anteriormente, sendo prospectado pelo Kamal e sintetizado com o objetivo de aplicá-lo, caso apresentasse atividade antimicrobiana, em filmes de polimetimetacrilato para conservação de alimentos. Em tal estudo, foram obtidos espectros de Dicroísmo Circular, que mostravam uma estruturação em α -hélice de até 66,4% (na presença de 1280 μM de DMPC).²²

Apesar dos estudos com Dicroísmo Circular, a estrutura do Bt01 não havia sido resolvida no estudo citado. Conseqüentemente, tal peptídeo foi escolhido para que os estudos estruturais por RMN fossem realizados neste projeto, já que não foi observada estruturação para o Hs07.

A concentração da solução quantificada por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV-VIS foi de 29,830 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($A_{205} = 0,410$; $A_{215} = 0,186$; $A_{225} = 0,067$ e $FD = 2$) que é igual à

14,35 mM para o Bt01 amidado, que tem massa molar de 2078,65 g/mol. Após preparação da amostra para os experimentos de RMN (550 μ L de solução a 1,28 mM de peptídeo e 31,783 mM de DPC-d38), mediu-se o pH da solução, que correspondia a um valor de 7,3.

Os espectros de TOCSY e NOESY adquiridos para o peptídeo Bt01 na presença de DPC-d38 estão apresentados nas Figuras 14-18. Como pode ser observado, os espectros obtidos apresentaram uma boa resolução.

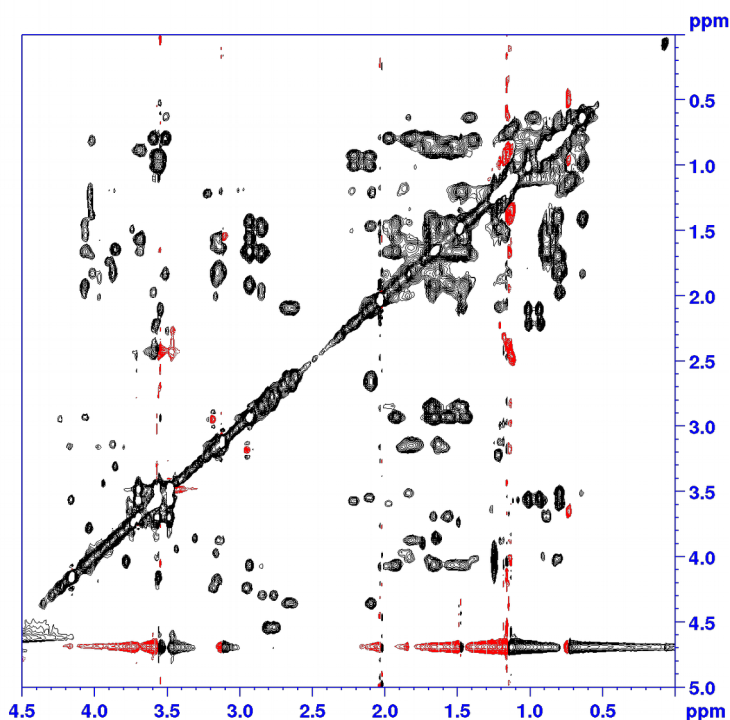


Figura 14. Ampliação da região de acoplamento ^1H de cadeia lateral do espectro de TOCSY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

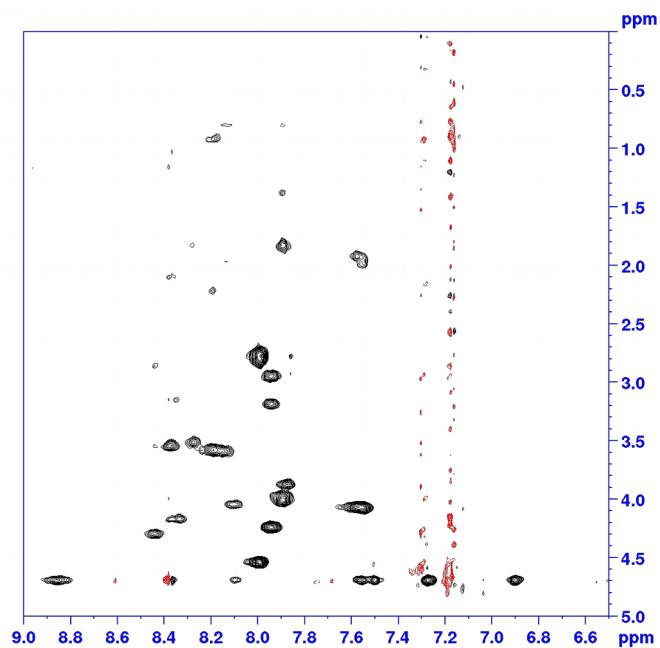


Figura 15. Ampliação da região de acoplamento de ^1H de cadeia principal com ^1H de cadeia lateral do espectro de TOCSY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

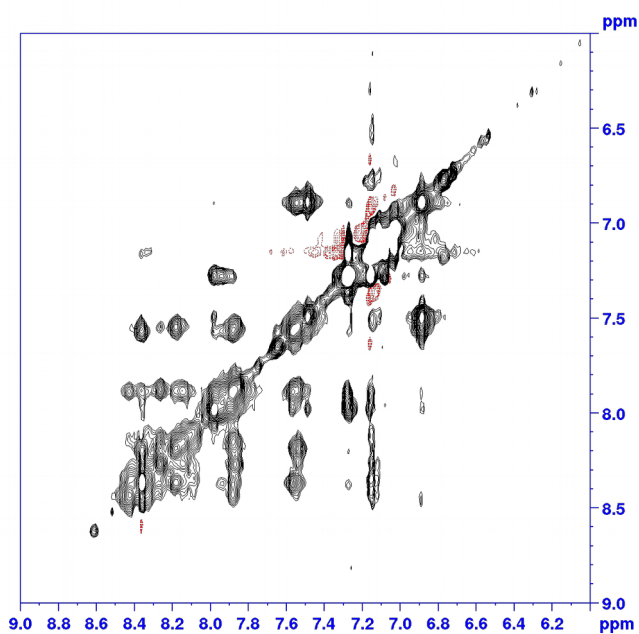


Figura 16. Ampliação da região de acoplamento de HN de cadeia principal do espectro de NOESY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

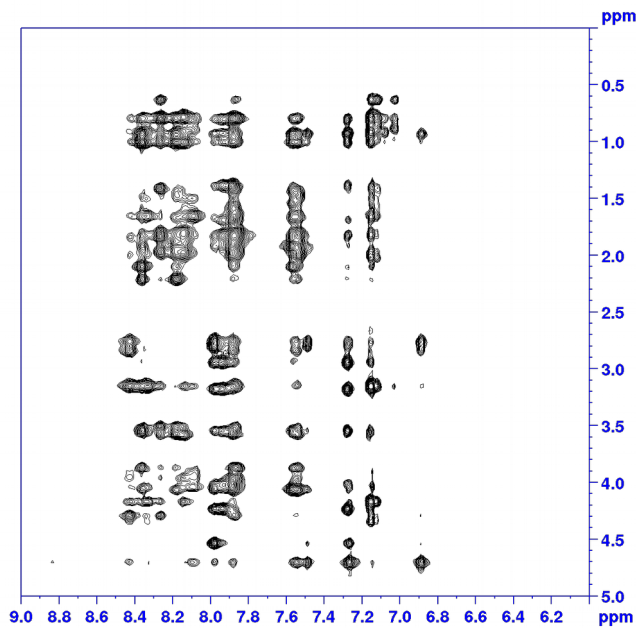


Figura 17. Ampliação da região de acoplamento de ^1H de cadeia principal com ^1H de cadeia lateral do espectro de NOESY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

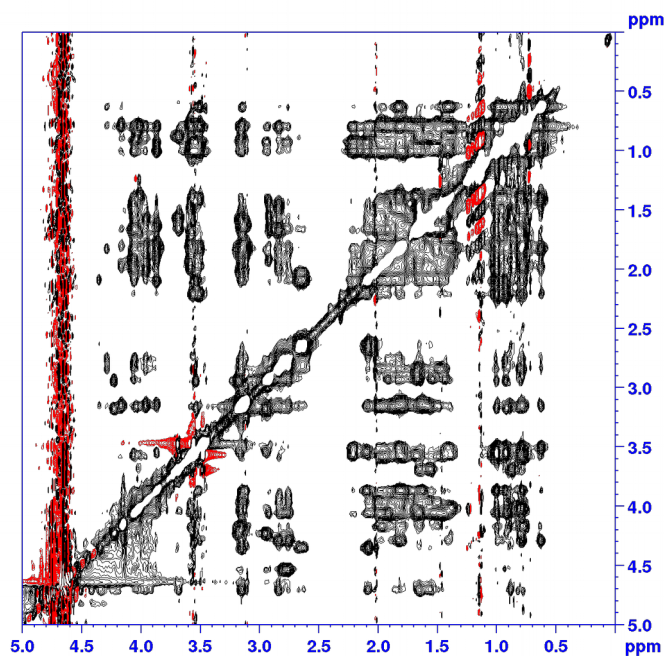


Figura 18. Ampliação da região de acoplamento ^1H de cadeia lateral do espectro de NOESY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

No espectro de TOCSY, informações sobre o sistema de spin de cada resíduo de aminoácido podem ser obtidas. Na região entre 0 ppm e 5 ppm do espectro de RMN (Figura 14) são observados sinais relativos a hidrogênios das cadeias laterais de cada resíduo de aminoácido. Já na região entre 6,5 ppm e 9 ppm (Figura 15) são observados sinais relativos a hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica. Sinais próximos a 4,8 ppm são mais difíceis de serem visualizados, devido a supressão do sinal da água (sinal que aparece em vermelho nas figuras).

Já no espectro de NOESY são observados acoplamentos dipolares relativos a átomos de ^1H que estão próximos espacialmente (até uma distância de 5 Å). Nos espectros de NOESY obtidos, na região entre 6 ppm e 9 ppm (Figura 16) foram observados acoplamentos de NH de cadeia principal entre resíduos de aminoácidos sequenciais ($i, i \pm 1$). Além disso, sinais de acoplamentos de NH de resíduos de aminoácidos a média distância ($i, i \pm 2$) também foram observados nessa região e são indicativos de formação de α -hélice. Além disso, nas regiões de acoplamento entre NH de cadeia principal e hidrogênios de cadeia lateral (Figura 17) e entre hidrogênio cadeias laterais (Figura 18) foram observados acoplamentos entre resíduos de aminoácidos sequenciais ($i, i \pm 1$) e a média distância ($i, i \pm 2$), ($i, i \pm 3$) e ($i, i \pm 4$), que também são indicativos de formação de α -hélice. Uma ampliação da região do espectro de NOESY relacionada ao acoplamento entre ^1H de cadeia principal com ^1H de cadeia lateral, em conjunto com as atribuições feitas para os sinais, encontra-se na Figura 19.

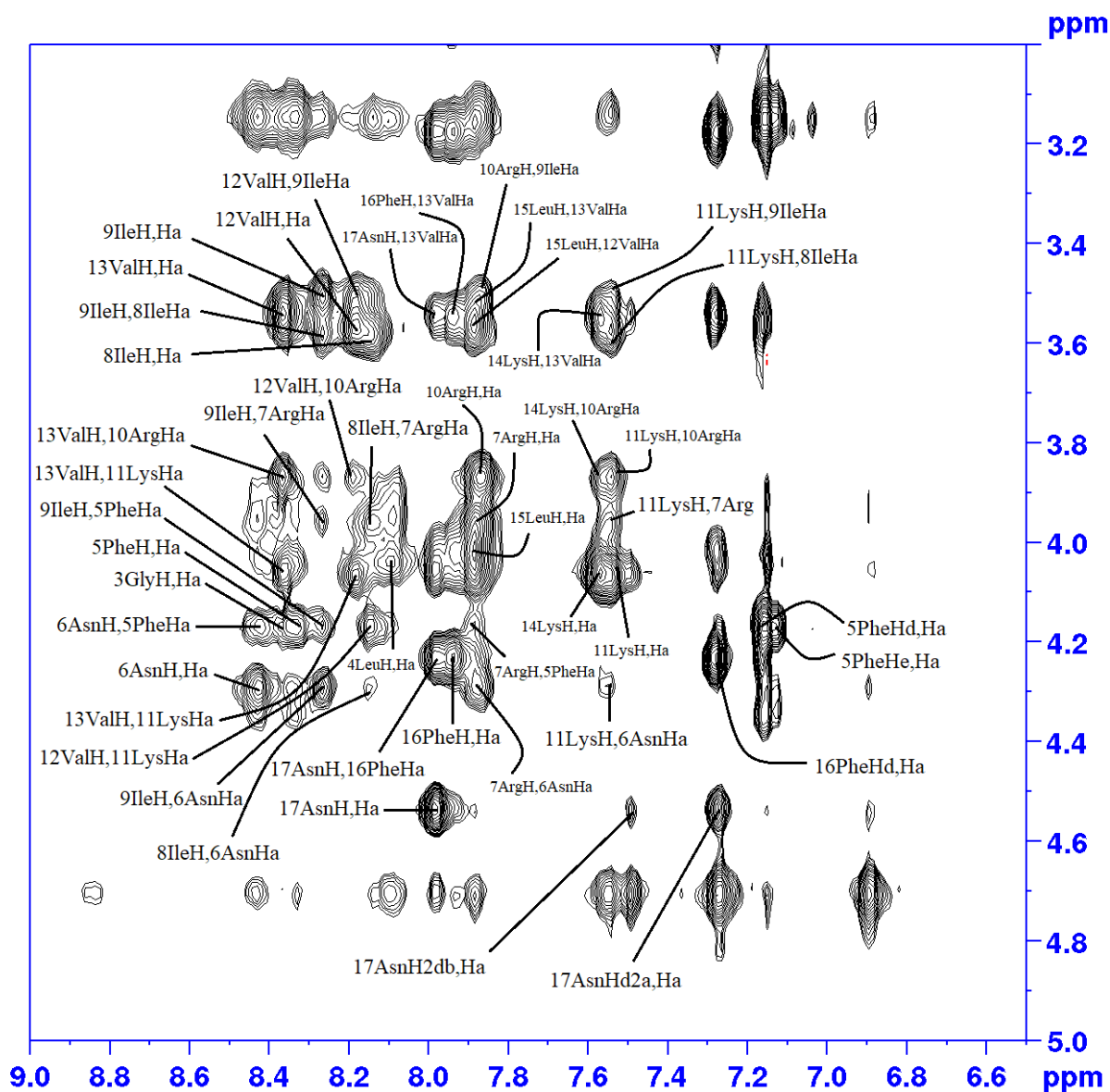


Figura 19. Uma ampliação da região do espectro de NOESY obtido para 1,28 mM de Bt01; 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3 relacionada ao acoplamento entre ^1H de cadeia principal com ^1H de cadeia lateral, em conjunto com as atribuições feitas para os sinais.

As atribuições foram feitas com base no método descrito por Wuthrich¹⁷. Utilizou-se os valores de referência de deslocamentos químicos do banco de dados disponibilizados pelo *Biological Magnetic Resonance Data Bank*²⁴. A atribuição dos conjuntos de sinais referentes aos hidrogênios de cada resíduo de aminoácido pode ser encontrada na Tabela 3. Muitos deslocamentos químicos atribuídos estão abaixo dos valores médios tabelados, o que é um indicativo de formação de α -hélice.

Tabela 3. Valores de deslocamentos químicos (ppm) atribuídos aos hidrogênios detectados de cada resíduo de aminoácido à concentração de 1,28 mM, 31,783 mM de DPC-d38 e pH=7,3. *Hidrogênio não detectado.

	N-H (ppm)	H α (ppm)	H β (ppm)	H γ (ppm)	H δ (ppm)	H ϵ (ppm)	H ζ (ppm)	H η (ppm)
Leu 1	*	3,62	1,49 e 1,59	0,82	*	-	-	-
Met 2	*	4,28	2,02	2,56 e 2,60	*	*	-	-
Gly 3	8,31	4,10	-	-	-	-	-	-
Leu 4	8,03	3,97	1,95	1,59	0,73	-	-	-
Phe 5	8,27	4,10	3,08	-	7,09	7,06	*	-
Asn 6	8,36	4,23	2,70 e 2,78	-	*	-	-	-
Arg 7	7,82	3,89	1,75 e 1,79	1,51	3,09	*	-	*
Ile 8	8,08	3,52	1,90	0,73	*	-	-	-
Ile 9	8,20	3,44	1,76	1,34; 0,91 e 0,72	0,56	-	-	-
Arg 10	7,81	3,80	1,74	1,56	3,04 e 3,08	*	-	*
Lys 11	7,48	4,00	1,93	*	*	*	*	-
Val 12	8,12	3,50	2,14	0,86	0,93	-	-	-
Val 13	8,30	3,48	2,03	0,86	0,94	-	-	-
Lys 14	7,50	4,00	1,85	1,38 e 1,48	1,60	2,77 e 2,86	*	-
Leu 15	7,82	3,95	1,77	1,32	*	-	-	-
Phe 16	7,87	4,17	2,88 e 3,11	-	7,21	*	*	-
Asn 17	7,92	4,47	2,70 e 2,73	-	7,21 e 7,43	-	-	-

Outro indicativo de formação de α -hélice que pode ser analisado é o *Chemical Shift Index* (CSI), ferramenta baseada em valores de deslocamento químico de H α tabelados de peptídeos onde variações negativas em torno do valor tabelado indicam formação de α -hélice; e a predição dos ângulos ϕ e φ . O CSI para o Bt01 é encontrado na Figura 20, e mostra que há indicativo de formação de α -hélice da Leucina 4 até o último resíduo de aminoácido

(Asparagina 17). Os valores dos ângulos ϕ e φ do Bt01 foram calculados com base no deslocamento químico dos hidrogênios ligados aos nitrogênios das ligações peptídicas e dos $H\alpha$, e tiveram seus valores plotados no Diagrama de Ramachandran, como mostra a Figura 21. Pela análise dos diagramas, pode-se perceber que a grande maioria dos ângulos calculados são característicos de estruturação em α -hélice.

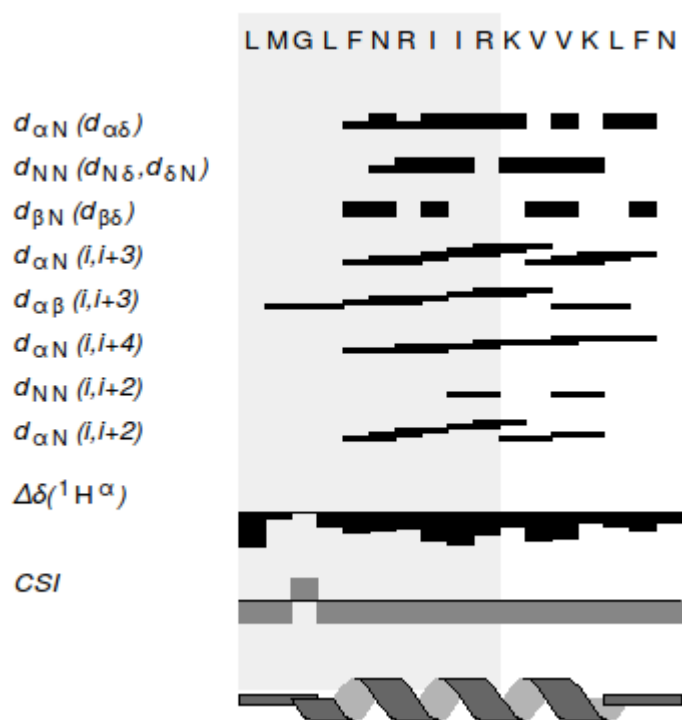


Figura 20. Resumo dos NOEs de média distância de cadeia principal e CSI calculado com base nos valores de deslocamento químico obtidos a partir dos experimentos de 1H - 1H TOCSY e NOESY para o peptídeo Bt01.

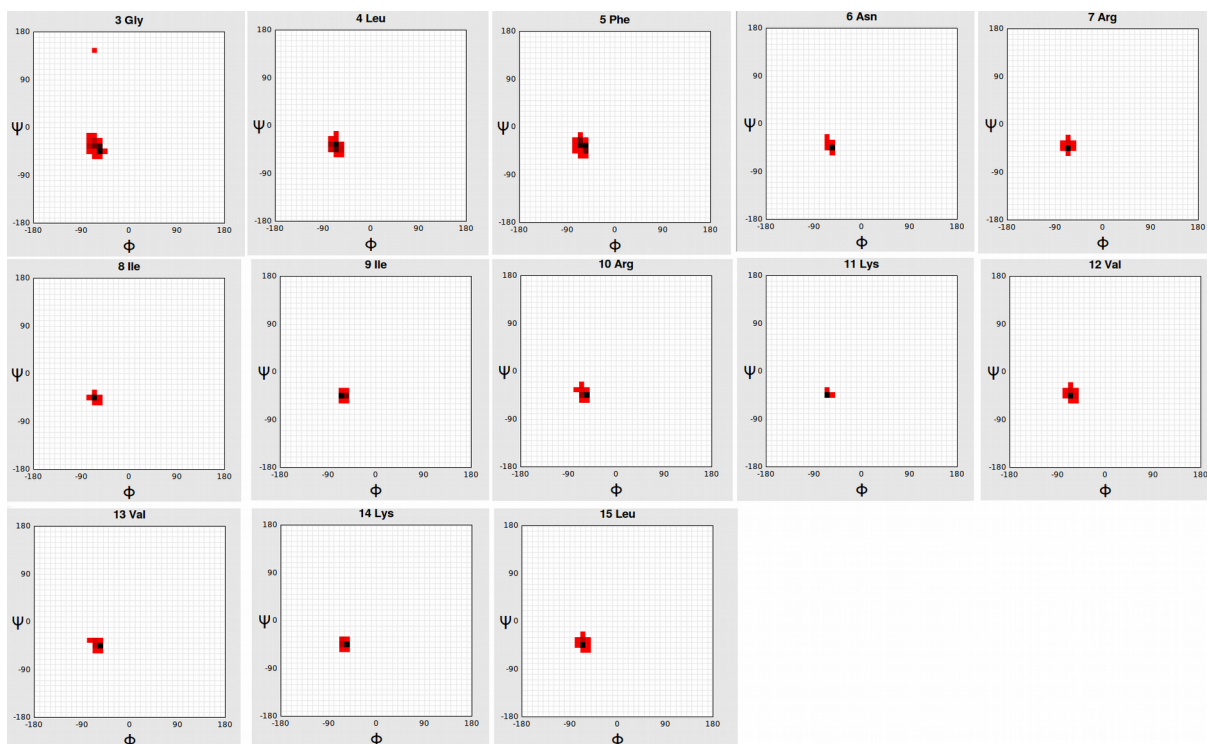
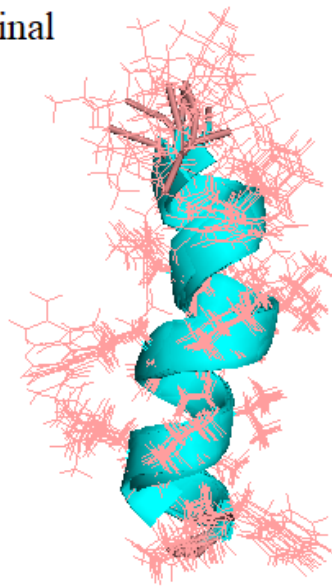


Figura 21. Valores dos ângulos ϕ e ψ calculados para os resíduos entre a Glicina 3 e a Leucina 15 do Bt01 e plotados no Diagrama de Ramachandran,.

A partir da atribuição dos NOEs do espectro de ^1H - ^1H NOESY, foram iniciados os cálculos estruturais do peptídeo Bt01 utilizando-se o programa ARIA. Ao final de cada cálculo foram avaliados os sinais indicados como rejeitados ou violados pelo protocolo de *simulated annealing*, de forma a minimizar as rejeições e violações acusadas, refinando, assim, as famílias de estruturas obtidas. O cálculo com os melhores resultados até a escrita desse Trabalho de Conclusão de Curso resultou em uma família das 10 estruturas, encontradas de forma sobrepostas na Figura 22. A estrutura de menor energia dentre as 10 obtidas pelo cálculo em questão se encontra na Figura 23. Os resultados obtidos até o momento mostra que o peptídeo Bt01 apresenta uma estrutura em α -hélice entre os resíduos Glicina 3 e Fenilalanina 16.

Porção N-terminal



Porção C-terminal

Figura 22. Sobreposição da família das 10 melhores estruturas calculadas para o Bt01 na concentração de 1,28 mM; na presença de 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

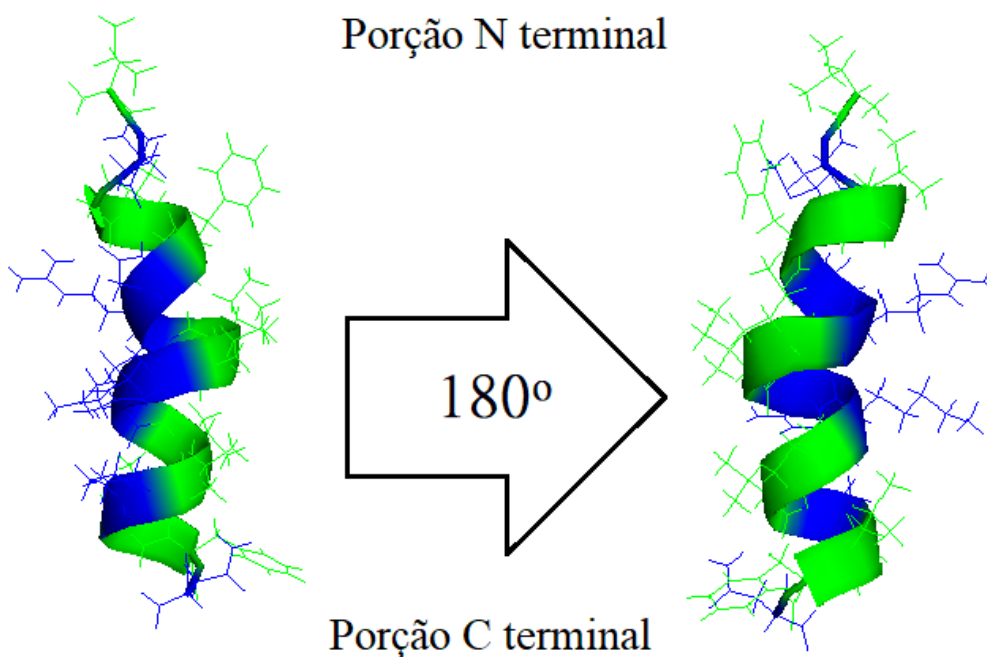


Figura 23. Estrutura de menor energia dentre a família de 10 estruturas com o melhor resultado. Tal estrutura está sendo mostrada em dois ângulos diferentes, e os resíduos polares estão na cor azul enquanto os resíduos apolares em verde.

Na Tabela 4, encontram-se as estatísticas referentes ao cálculo em questão, em que o protocolo acusou ainda um sinal violado e três rejeitados.

Tabela 4. Estatística estrutural para a melhor família de 10 estruturas obtidas por RMN para o peptídeo Bt01 em concentração 1,28 mM; na presença de 31,783 mM de DPC-d38 e pH = 7,3.

Restrições de NOE	
Número total de restrições de distância	199
Número de restrições intraresiduais	124
Número de restrições sequenciais (i, i ± 1)	38
Número de restrições de alcance médio (i, i ± j) _{j=2, 3, 4}	37
Ângulo Diedro	26
RMSD (Angstrom) de todos os resíduos	
Cadeia principal	0,45 ± 0,77
Todos os átomos	1,31 ± 0,98
RMSD (Angstrom) do segmento em hélice (Gly3-Phe16)	
Cadeia principal	0,22 ± 0,24
Todos os átomos	1,02 ± 0,53

CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento desse trabalho, foi possível sintetizar um novo peptídeo (nomeado de Hs07) prospectado pelo software Kamal e que tem sua estrutura primária contida em uma proteína do genoma humano. Porém não foram detectadas atividades antimicrobianas para tal biomolécula, como era esperado. A ausência de atividade antibacteriana foi relacionada à não estruturação do Hs07 em presença de vesículas, o que foi corroborado pelos experimentos de Dicroísmo Circular realizados na presença de DMPC e DMPC:DMPG. A não estruturação do Hs07 foi atribuída à sua alta concentração de alanina na face hidrofóbica, sendo que a alanina é um aminoácido que tem hidrofobicidade baixa. Especula-se que a alanina tem um comportamento de fronteira²⁵, portanto pode tanto ser responsável pela estruturação de um peptídeo quanto pela não estruturação de outro.

Também foi possível obter-se resultados preliminares acerca da estrutura do peptídeo Bt01 obtida por RMN na presença de DPC-d38. Tal estrutura, mesmo com a indicação de um sinal violado e três rejeitados pelo protocolo *simulated annealing*, é uma α -hélice que se estende entre os resíduos Glicina 3 e a Fenilalanina 16 do peptídeo, sendo que a Leucina 1, a Metionina 2 e a Asparagina 17 encontram-se desestruturadas.

REFERÊNCIAS

- 1 - Nelson, D. L., & Cox, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger, (6ª Edição). Artmed: São Paulo, 2014.
- 2 - Nichol, S. T., Arikawa, J. & Kawaoka, Y. (2000) Emerging viral diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 97, 12411–12412.
- 3 - Castel, G., Chtéoui, M., Heyd, B., & Tordo, N. (2011). Phage display of combinatorial peptide libraries: Application to antiviral research. *Molecules*, 16(5), 3499–3518.
- 4 - Mulder, K. C. L., Lima, L. A., Miranda, V. J., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2013). Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4(October), 1–23.
- 5 - Romanowski, E. G., Campbell, T. C. T., & Mcdermott, A. M. (2005). A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Current Eye Research*. 505–515.
- 6 - Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), 71–87.
- 7 - Brand, G. D., Magalhães, M. T. Q., Tinoco, M. L. P., Aragão, F. J. L., Nicoli, J., Kelly, S. M., ... & Bloch, C. (2012). Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS ONE*, 7(9).
- 8 - Brand, G. D., Ramada, M. H. S., Genaro-Mattos, T. C., & Bloch, C. (2018). Towards an experimental classification system for membrane active peptides. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- 9 - Nascimento, J. C., & Bloch, C. (2001) Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasil, nº 21, p. 52.
- 10 - Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2000). Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *The British Journal of Nutrition*, 84 Suppl 1(S1), S27-31.
- 11 - Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). Bioactive peptides from muscle sources: Meat and fish. *Nutrients*, 3(9), 765–791.
- 12 - Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6).
- 13 - Kirchhoff, F., Munch, J., Standker, L., & Forssmann, W. G. Peptide (virip) which inhibits a circulating virus in humans and the use thereof. US7037896B1, 11 aug. 1999, 05 feb. 2006.

- 14 - Chan, W. C., & White P. W. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. B. D. Hames: New York, 2000.
- 15 - Pires, D. A. T., Bemquerer, M. P., & Do Nascimento, C. J. (2014). Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20(1), 53–69.
- 16 - José, B. T., Capelle, K. W., & Azevedo, E. R. (2005). A RMN e suas aplicações atuais. *Ciência Hoje*, Brasil, v. 37, n° 221, p. 40-48.
- 17 - Wüthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids, (1st edn). John Wiley & Sons: New York, 1986.
- 18 - Greenbaum, N., & Ghose, R. (2010). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Structure Determination of Proteins and Nucleic Acids. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–10.
- 19 - Ben-Yosef, T., & Francomano, C. a. (1999). Characterization of the human talin (TLN) gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Genomics*, 62(2), 316–319.
- 20 - Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*.
- 21 – Venyaminov, S. Y., Baikalov, I. A., Shen, Z. M., Wu, C. S. C., Yang, J. T. (1993). Circular Dichroic Analysis of Denaturated Proteins: Inclusion of Denaturated Proteins in the Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 214, 17-24.
- 22 - Sá, L. G. G. Prospecção, Síntese e Aplicação de Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos na Conservação de Alimentos. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2018.
- 23 - Nozaki, Y., & Tanford, C. (1971). The Solubility of Amino in Aqueous Ethanol Acids and Two Glycine Dioxane Solutions Peptides, *The Journal of Biological Chemistry*, 246.
- 24 - “http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm”. Acessado em vários dias e horários durante os meses de abril e maio de 2019.
- 25 - Bechinger, B. (2001). Membrane Insertion and Orientation of Polyalanine Peptides : A 15 N Solid-State NMR Spectroscopy Investigation. *Biophysical Journal*, 81(4), 2251–2256.