



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

João Gabriel Teixeira Lara Resende

**DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO INSPIRADO
NA TRIPTOFILINA PaT-2 PARA A MODULAÇÃO DE SUA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Projeto de monografia de graduação

Brasília - DF

2021/1



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

João Gabriel Teixeira Lara Resende

**DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO INSPIRADO
NA TRIPTOFILINA PaT-2 PARA A MODULAÇÃO DE SUA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Projeto de trabalho de conclusão de curso de bacharelado em Química Tecnológica apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília - DF

2021/1

João Gabriel Teixeira Lara Resende

**DESENHO RACIONAL E SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO INSPIRADO
NA TRIPTOFILINA PaT-2 PARA A MODULAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Relatório final apresentado ao Instituto de
Química da Universidade de Brasília para
obtenção do título de Bacharel em Química
Tecnológica.

Brasília, 26 de outubro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Orientador

Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno
Membro Titular

Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado
Membro Titular

Prof. Dr. Rafael Oliveira Rocha
Membro Suplente

RESUMO

Triptofilinas são uma família enigmática de moléculas. Desde seu descobrimento em 1985 até hoje, pouco se sabe sobre seu papel fisiológico, visto que não possuem análogos em mamíferos. Estudos com triptofilinas mostram as diferentes atividades biológicas que essas moléculas podem apresentar, desde miotrópica, antimicrobiana, anticâncer, e recentemente, antioxidante. No presente trabalho, sintetizou-se um análogo da triptofilina PaT-2, encontrada na secreção cutânea de *Pithecopus azureus*, que demonstra ter atividade inibitória de radicais livres de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, respectivamente) em cultura celular. O análogo nomeado de cPaT-2 possui a adição de Gly para espaçamento e Cys em ambas as porções N-terminal e C-terminal, para promover a formação de uma ligação dissulfeto e ciclização da molécula, permitindo aproximação de resíduos aromáticos de Phe e Trp facilitando interações do tipo “ π stacking”. Em PaT-2, são esses os resíduos considerados responsáveis pela atividade antioxidante mensurada e hipotetiza-se que sua aproximação em cPaT-2 leve a alterações em sua capacidade de receber e doar elétrons. A síntese do peptídeo foi realizada em fase sólida com seu sucesso confirmado a partir de resultados por espectrometria de massa. Cálculos conformacionais teóricos indicam que a estrutura de menor energia do análogo cíclico apresenta aproximação das cadeias laterais aromáticas de Phe e Trp, gerando potencial de interação das nuvens π . Modelos obtidos a partir de cálculos teóricos mostram que os dois enxofres envolvidos na ligação dissulfeto dominam a atividade redox do peptídeo, tornando o cPaT-2 um excelente acceptor de elétrons mas um mal doador. Utilizando como base os resultados teóricos preliminares obtidos e outros cálculos a serem realizados futuramente, a perspectiva é avaliar o potencial antioxidante do cPaT-2 em ensaios *in vitro* e em culturas celulares, utilizando o PaT-2 como referência para melhor compreensão sobre a eficiência da estratégia aplicada em termos de modulação de atividade antioxidante.

Palavras-chave: Triptofilinas, peptídeos antioxidantes, π -stacking, ligação dissulfeto, síntese de peptídeos em fase sólida, *Pithecopus azureus*.

ABSTRACT

Tryptophilins are an enigmatic family of molecules. Since their discovery in 1985, little is known about their physiological role, since they have no analogues in mammals. Studies with tryptophilins show the different biological activities that these molecules can present, from myotropic, antimicrobial, anticancer, and recently, antioxidant. In the present work, we synthesized an analog of the tryptophilin PaT-2, recently found in the skin secretion of *Pithecopus azureus*, and demonstrated to have oxygen and nitrogen free radical (ROS and RNS, respectively) inhibitory activity in cell culture. The analog named cPaT-2 has the addition of Gly as spacer and Cys in both N-terminal and C-terminal portions to promote the formation of a disulfide bond and cyclization of the molecule, allowing approximation of aromatic Phe and Trp residues facilitating π -stacking type interactions. In PaT-2, these residues are considered responsible for the measured antioxidant activity and it is hypothesized that their approximation in cPaT-2 leads to changes in their ability to receive and donate electrons. The synthesis of the peptide was performed by solid phase methodology with its success confirmed from mass spectrometry results. Theoretical conformational calculations indicate that the lower energy structure of the cyclic analogue exhibits approximation of the aromatic side chains of Phe and Trp, generating potential π -cloud interactions. Models obtained from theoretical calculations show that the two sulfurs involved in the disulfide bond dominate the redox activity, making cPaT-2 an excellent electron acceptor but a poor donor. Based on the preliminary theoretical results obtained and future calculations, the perspective is to evaluate the antioxidant potential of cPaT-2 in *in vitro* assays and in cell cultures, using PaT-2 as a means of comparison for better understanding of the efficiency of the strategy applied in terms of modulation of antioxidant activity.

Keywords: Tryptophillins, antioxidant peptides, pi-stacking, disulfide bond, solid phase peptide synthesis, *Pithecopus azureus*.

Tabela de aminoácidos naturais

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Lista de abreviaturas

DCM - Diclorometano

DIC - *N-N'*-diisopropil carbodiimida

DMF - Dimetilformamida

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EDT - 1,2-etanoditiol

ELA - Esclerose lateral amiotrófica

Fmoc - 9-fluorenilmetiloxycarbonila

FRAP - Ferric reducing ability of plasma, do português, habilidade de redução férrica do plasma

KCN - cianeto de potássio

LMWA - Low molecular weight antioxidants. do português antioxidantes de baixo peso molecular

MALDI-TOF - Ionização/dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo

NADH - dinucleótido de nicotinamida e adenina

PDB - Protein data base, do português, base de dados de proteínas

QTOF - quadrupolo tempo de voo

RGB - Red green blue, do português vermelho verde e azul

RNS - Reactive nitrogen species, do português espécies reativas de nitrogênio

ROS - Reactive oxygen species, do português espécies reativas de oxigênio

RP-HPLC - Reverse phase high performance liquid chromatography, do português cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa

SPPS - Síntese de fase sólida de peptídeos

tBu - terc-butila

TFA - Ácido trifluoroacético

TIS - triisopropilsilano

UV - ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Tryptofilinas	9
1.2. Peptídeos antioxidante	10
1.3. Interação “ π -stacking” ou aromático-aromático	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. METODOLOGIA	17
3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida	17
3.1.1. Linker	17
3.1.2. Desproteção e inchaço da resina	18
3.1.3. Teste de Kaiser	19
3.1.4. Acoplamento utilizando Oxyma/DIC	21
3.1.5. Clivagem	22
3.2. Caracterização de peptídeos sintetizados	23
3.3. Oxidação das Cys	24
3.4. Purificação	24
3.5. Predição da estrutura 3D e atividade antioxidante	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Síntese e caracterização	26
4.1.1. cPaT-2	26
4.1.2. cPaT-2 oxidado	28
4.1.3. PaT-2	30
4.2. Predição da estrutura 3D e atividade antioxidante	33
5. CONCLUSÃO	38

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Triptofilinas

Secreções cutâneas de anfíbios, principalmente anuros, têm despertado grande interesse dentro da comunidade científica pela grande variedade de moléculas bioativas presentes em altas concentrações (1). Dentre os anuros, a subfamília Phyllomedusinae é a com maior complexidade molecular de peptídeos secretados por sua pele (1). Grandes quantidades de peptídeos já foram isolados das secreções de anfíbios, entretanto existe uma parcela considerável que ainda não foram caracterizados estrutural ou funcionalmente (2). Os peptídeos bioativos extraídos das secreções se dividem em análogos de neuropeptídeos, antimicrobianos, anticâncer, agentes antivirais, antioxidantes, fungicidas e peptídeos complexantes de calmodulina (2, 3). Os análogos de neuropeptídeos são a segunda classe mais estudada, atrás apenas dos antimicrobianos. Tratando-se de atividade farmacológica, podem se dividir em: angiotensinas, bombesinas, bradisininas, caeruleínas, deltorfinas, sauvaginas, espasmolisinas, taquicininas, xenopsinas, triptofilinas e peptídeos liberadores de tirotropina (1, 3).

Alguns dos peptídeos obtidos de extratos metanólicos geravam resultados positivos em teste colorimétrico de Ehrlich, indicando presença de anéis indol típicos de resíduo de triptofanila (4), porém não possuíam correlatos em mamíferos, diferentemente dos outros análogos de neuropeptídeos encontrados (3). Essas moléculas foram atribuídas à família das triptofilinas (TPHs), com seu primeiro registro de encontro em rãs do gênero *Phyllomedusa* em 1985 (5). Triptofilinas são o único grupo de peptídeos extraídos de anuros que são descritos unicamente por sua semelhança química estrutural (3), e sua atribuição foi dada em consequência da presença de anéis indol presente na molécula de Trp (6), apesar de membros atribuídos recentemente a essa família não possuírem esse motivo (2).

Com o passar do tempo, mais triptofilinas foram sendo identificadas, apresentando entre si divergências estruturais. Por isso, foram divididas em três tipos distintos: triptofilina-1 (T1) são peptídeos com sete ou oito resíduos de aminoácidos, com algumas características conservadas entre as moléculas como a dupla Lys-Pro no N-terminal e resíduo de Trp na posição 5 e de Pro na posição 7, ambos referentes ao N-terminal. Triptofilina-2 (T2) é o tipo mais diversificado, podendo variar entre 4 e 7 aminoácidos em sua estrutura, sua maioria contém o C-terminal amidado (2), com todos contendo a dupla Pro-Trp. As triptofilinas-3 (T3) são o grupo mais conservado, compostos por 13 aminoácidos, apresentando variações conservativas apenas nas posições 2, 5, 6 e 13 do N-terminal. Têm como semelhança o pGlu no N-terminal, a dupla Lys-Pro nas posições 3 e 4 e a sequência Pro-Pro-Ile-Tyr-Pro nas posições 7-12 (4).

Por possuírem correlatos homólogos em mamíferos, peptídeos extraídos de secreção de anfíbios têm frequentemente atividade farmacológica análoga, como no caso de atividade em musculatura lisa, liberadores de insulina e histamina e inibidor de tripsina (3). Com isso, atividade miotrópica semelhante à bradicinina ou atividade inibidora da mesma foram os primeiros a serem profundamente estudados. Indução ao relaxamento de musculatura lisa caudal, intestinal ou da bexiga de ratos foi observado em algumas triptofilinas, como em PdT-1 (KPPAWVP), PdT-2 (DMSPPWH) e balticinina (pGluDKPFGPPPIYPV). Atividade inibidora de bradicinina antagonizando o relaxamento em musculatura lisa foi encontrado em triptofilinas como a PhT-3 (pGluDKPFWPPPIYPM) e PsT-1 (KPPPWVPV). Atividades antiproliferativas de células cancerígenas e atividade antimicrobiana também foram encontrados em algumas dessas moléculas estudadas (2-4, 7-10). Entretanto, muitas das triptofilinas encontradas não apresentaram resultados nos ensaios de atividade farmacológica usualmente realizados (5), rendendo pouco conhecimento sobre o papel biológico dessa classe de peptídeos.

Em dados ainda não publicados, foi encontrada uma triptofilina T2 da espécie *Pithecopus azureus*, de sequência FPPWL-NH₂ nomeada PaT-2. Segundo os autores, o peptídeo é detectado em circunstâncias que precedem a transição para o ambiente terrestre, ocasião ligada ao aumento do risco de dano oxidativo (11, 12). PaT-2 mostrou possuir atividade antioxidante nos ensaios em que células do sistema nervoso central foram submetidas a estresse oxidativo.

1.2. Peptídeos antioxidantes

Estresse oxidativo é consequência de um desbalanceamento do equilíbrio entre a produção e mitigação de moléculas com alto potencial oxidativo, como radicais livres (13). Dentre esses compostos altamente instáveis, os mais conhecidos são as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), com alguns exemplos sendo o radical superóxido (O₂^{•-}), hidroxil (•OH), óxido nítrico (NO[•]), peroxinitrito (ONOO⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (14). Observa-se que os dois últimos não são radicais, entretanto são fortes agentes oxidantes que reagem com biomoléculas, especialmente peróxido de hidrogênio, capaz de rapidamente se espalhar sobre membranas celulares, resultando em morte celular (15). H₂O₂ também pode reagir através da reação de Fenton e Haber-Weiss formando radical hidroxil (16), tornando-se um dos compostos com maior capacidade de induzir estresse oxidativo. Tais compostos radicalares e oxidantes atrelados ao estresse oxidativo são responsáveis pela diminuição da viabilidade das células por dano oxidativo a biomoléculas (proteínas e lipídeos), dano em material genético e indução de apoptose (17, 18). Oxidação lipídica causada por ROS é uma das principais causas para degradação lipídica em matrizes alimentícias e cosméticas (19). Através de alterações em funções de sinalização e acúmulos de produtos oxidados, ROS também estão ligados a

diversas doenças, dentre elas algumas degenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington e ELA (13).

A formação de moléculas causadoras de estresse oxidativo pode ocorrer por meio de agentes endógenos (radicais sintetizados pelo próprio organismo como produtos da respiração aeróbica ou produtos secundários de processos metabólicos e inflamatórios) ou exógenos (radicais provenientes de agentes externos como poluição do ar e radiação solar) (20). O sistema de defesa do organismo contra agentes radicalares oxidantes pode ser dividido em dois grupos. O primeiro é constituído por compostos enzimáticos codificados por gene. Alguns exemplos são peroxidase, superóxido dismutase e catalase, que consomem ROS impedindo que ataquem outras proteínas. O segundo grupo conta com antioxidantes de baixo peso molecular (LMWA - *low molecular weight antioxidants*) que possuem atividade de coleta de ROS. Esses últimos não são codificados por genes e podem ser sintetizados por células (NADH e carnitina), adquiridos por dieta (caroteno e polifenóis) ou como produto residual de outra funcionalidade do organismo, como no caso do ácido úrico (11).

Dentre as variadas atividades farmacológicas encontradas em compostos peptídicos extraídos de anuros, são descritos peptídeos com atividade antioxidante, sendo esses parte do extenso arsenal de peptídeos codificados geneticamente responsáveis pela defesa da pele destes animais (11). Durante seu processo de crescimento, anfíbios transitam do meio aquático para o meio terrestre, com isso aumentando a exposição a raios UV e a disponibilidade de oxigênio (11, 12). Acredita-se que essa alteração de habitat ocasione um aumento do surgimento de ROS endógenos e conseqüentemente aumenta o risco de dano oxidativo (21). Utilizando uma abordagem biorracional, ou seja, analisando a interação do animal com o ambiente que habita, é possível inferir que anfíbios, especialmente os que vivem em lugares com alto índice de radiação UV, possuam um sistema ativo de defesa contra dano oxidativo e radicais livres. Alguns desses peptídeos extraídos com comprovada atividade antioxidante estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Peptídeos antioxidantes: estruturas primárias, origem, atividade e concentração.

Nome	Estrutura primária	Origem	Atividade	Concentração	Referência
Andersonin-AOP1	FLPGLECVW	<i>Odorrana andersonii</i>	Inibição de ABTS ⁺ e DPPH	3 µM 98,52 % inibição ABTS ⁺ 50 µM 93,97 % inibição DPPH	Yang et al. 2016 (52)
salamandrin-I	FAVWGCADY RGY-NH ₂	<i>Salamandra salamandra</i>	Inibição de ABTS ⁺ e DPPH	0,285 Trolox-eq/mg (ABTS ⁺) 0,081 Trolox-eq/mg (DPPH)	Plácido et al. 2020 (55)
antioxidin-I	TWYFITPYIP DK	<i>Physalaemus nattereri</i>	Inibição do decaimento de fluoresceína	4,088 Trolox-eq/mg	Barbosa et al. 2018 (13)
Triptofilina L 1.2	FPWL-NH ₂	<i>Litoria rubella</i>	Atividade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) Inibição de DPPH e atividade de redução férrica	TEAC = 1,76 (2,5 µM peptídeo) IC ₅₀ = 0,52 mM (DPPH) 116,57 µm Fe ²⁺ /mM pep	Tran et al. 2021 (12)
Antioxidin-RP1	AMRLTYNKP CLYGT	<i>Rana pleuraden</i>	Inibição de ABTS ⁺ , DPPH e NO	80 µg/mL 95,9 % ABTS 96,6 % DPPH 66,4 % NO	Yang et al. 2009 (11)
VH12	VKYVSPTCG PCH	<i>Arthrospira platensis</i>	Inibição de DPPH ABTS, radical hidroxil, radical superóxido	98,55 % a 200 µM (DPPH) 96,44 % a 200 µM (ABTS) 97,58 % a 200 µM (OH·)	Sannasimuthu e Arockiaraj(54)

Mecanismos de ação antioxidante envolvem coleta de radicais livres, inibindo transferência de hidrogênio (HAT) ou migração de um único elétron (EM) em biomoléculas. Outro meio de ação possível é como agente quelante de metais de transição, impedindo a formação de radicais hidroxil através da reação de Fenton (20, 22-24). Além de interagir diretamente com radicais livres, estudos *in vivo* mostram que peptídeos antioxidantes são capazes de interferir e modular biomarcadores do estresse oxidativo como a peroxidação de lipídios, a quantidade de ROS intracelulares e apoptose, assim como modular a resposta antioxidante de sistemas celulares, aumentando produção e expressão de agentes antioxidantes enzimáticos. (25, 26).

No geral, presença de aminoácidos com cadeias laterais contendo grupos fenólicos (Phe e Tyr), indólico (Trp), sulfidril (Cys), imidazol (His), e pirrolidina (Pro) são associados com atividade antioxidante de peptídeos bioativos, pois são capazes de doar hidrogênio ou elétron para o radical livre, resultando em

espécies radicalares mais estáveis (20, 22, 23, 27). Há relatos de que aminoácidos hidrofóbicos facilitam a interação do peptídeo com um meio lipídico, como as bicamadas lipídicas de células, permitindo melhor interação com radicais livres (22, 23). Estudos mostram que ao colocar os aminoácidos associados com atividade antioxidante em sequências aleatórias, o peptídeo formado não apresenta o mesmo efeito de inibição de radicais livres, indicando que a atividade tem dependência com a estrutura espacial relativa dos aminoácidos componentes do peptídeo para permitir interações entre si ou conformações preferenciais (28), porém ainda há muito a ser elucidado, necessitando pesquisas adicionais sobre essa relação.

Estudos que descrevem peptídeos com atividade antioxidante apresentam peptídeos pequenos com baixa massa molecular como detentores de tal atividade. Teoriza-se que a relação entre tamanho da molécula e inibição de radicais livres seja por seu pequeno tamanho permitir melhor absorção pelo intestino para a corrente sanguínea, para serem direcionados ao tecido alvo e efetuar atividade fisiológica (20, 23, 29). Tran et al. estudou atividade antioxidante em triptofilinas de cadeia curta obtidas a partir do sapo australiano *Litoria rubella* e dentre as estudadas, SPWL-OH e FPWL-NH₂ apresentaram forte atividade inibidora de radicais em ensaios com ABTS^{•+} e atividade moderada em ensaios com DPPH e do tipo FRAP (12).

1.3. Interação “ π stacking” ou aromático-aromático

Interação π -stacking é o nome comum atribuído a interações entre aromáticos, mas apesar do termo, não existe apenas o contato face centrado, também conhecido como interação paralela ou sanduíche. Outras possíveis e mais estáveis formas de interação entre grupos aromáticos conhecidas são paralela deslocada ou descentralizada, paralela no mesmo plano, inclinada, engrenagem (formato de L) e borda-face (podendo ser interação do tipo borda-face T ou Y) (30-32).

Devido ao momento quadrupolo de compostos aromáticos a configuração paralela é a menos observável, visto que a aproximação das nuvens eletrônicas das ligações π ressonantes causam repulsão entre si, tornando-se favorecidas os arranjos borda-face e paralela deslocada, mais estáveis e aproximadamente isoenergéticas (Fig. 1) (33). Considerado como um caso especial para que a interação paralela seja favorecida, a interligação alternada entre uma espécie aromática rica em elétrons e uma pobre em elétrons, com fortes grupos retiradores ligados invertendo o momento quadrupolo, permite variados graus de mistura entre orbitais π e transferência de cargas (34).

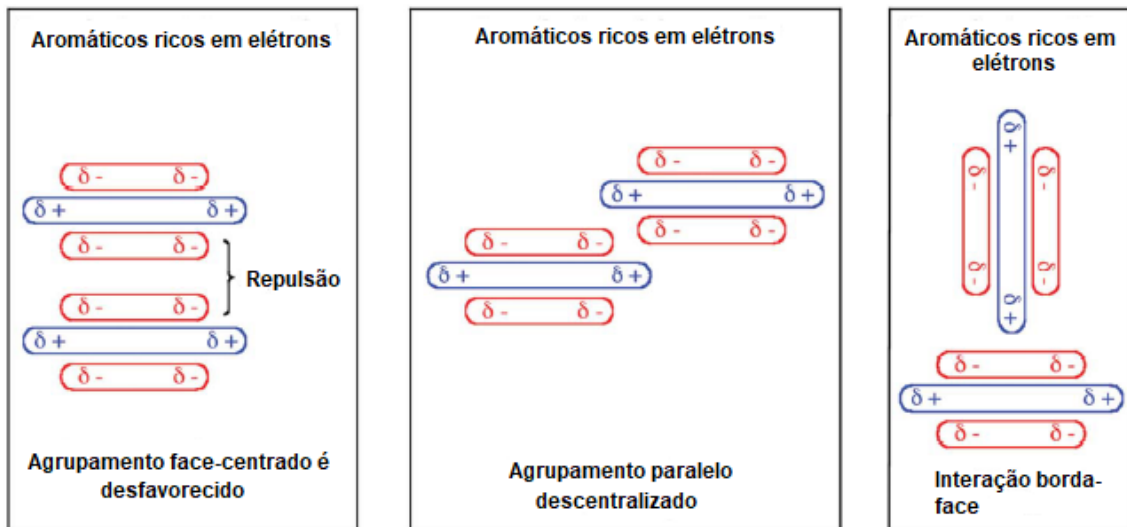


Figura 1. Esquema de visualização de interações entre cadeias aromáticas. Região de cor vermelha representa polarização negativa, cor azul representa polarização positiva (adaptado) (30).

Interações entre elétrons π aromáticos também são dependentes da distância interplanar entre os anéis. Distâncias muito longas, nomeadamente acima de 3,8 Å, tornam as interações muito enfraquecidas, não sendo aceites como “ π -stacking”. A distância ideal para permitir este tipo de interação está entre 3,3 e 3,6 Å, em que quanto mais próximas do primeiro valor, mais fortes são consideradas (35).

Estudos feitos em interações dos aminoácidos naturais com cadeias laterais aromáticas (Trp, Phe, Tyr e His) em proteínas mostram que combinações são importantes para estabilização de estruturas secundárias e terciárias, dobramentos e estabilidade intermolecular de proteínas (30, 31, 36). Interações entre as cadeias laterais aromáticas não acontecem apenas em pares mas também em grandes aglomerados (36), sendo responsáveis pelo processo de formação de amilóides fibrilares, agregados altamente organizados de peptídeos anfifílicos (30, 37).

Estudos realizados *in vitro* do PaT-2 (FPPWL-NH₂) mostram que sua atividade redox está centrada nos aminoácidos Phe e Trp. Interações entre cadeias aromáticas destes aminoácidos foram estudadas com base em 593 proteínas do PDB mostram que quando Phe interage com Trp com distanciamento $n + 3$ (Phe-Pro-Pro-Trp no caso do PaT-2), 43 % dos pares têm angulação entre anéis de $30^\circ < \theta < 60^\circ$ ou $120^\circ < \theta < 150^\circ$ caracterizando configuração inclinada. 36 % possuem arranjo perpendicular ($60^\circ < \theta < 120^\circ$) e por fim, 21 % paralela ($0^\circ < \theta < 30^\circ$ ou $150^\circ < \theta < 180^\circ$) (36). Um outro estudo mais recente concluiu que interações π - π são preferenciais quando perpendiculares entre si do que as paralelas, inferindo que uma melhor descrição para essas interações é C-H $\cdots\pi$ em vez de “stacking” (38). A partir desses dados, infere-se que interação aromático-aromático entre Phe e Trp não seja impedida

energeticamente, e com base no conhecimento sobre o perfil redox do PaT-2, supõe-se que interações entre os orbitais π aromáticos possam ter efeito de modulação na atividade redox desses aminoácidos por poder proporcionar melhor estabilização da molécula após reagir com espécies radicalares. Com o intuito de facilitá-las, um peptídeo análogo a PaT-2 foi racionalmente planejado para promover a aproximação das cadeias aromáticas presentes. O análogo nomeado de cPaT-2 possui a adição de Gly-Cys em ambas as porções N-terminal e C-terminal da molécula (CGFPPWLGC-NH₂), com as Gly agindo como espaçadores e as Cys para ciclização do peptídeo através da ligação dissulfeto. O presente trabalho tem como objetivo analisar se a interação aromático-aromático das cadeias laterais de Phe e Trp, responsáveis pela atividade redox do PaT-2, podem gerar algum efeito de modulação dessa atividade.

2. JUSTIFICATIVA

Peptídeos antioxidantes podem ser o próximo passo na tecnologia de combate ao estresse oxidativo por sua versatilidade e diversidade de fontes de obtenção. Presentes em proteínas de diversos alimentos, sua aquisição por meios naturais alivia uma crescente preocupação quanto a utilização de compostos sintéticos como conservantes alimentícios (17, 27). O crescente interesse nessas moléculas é devido ao potencial de aplicações como aditivos alimentícios para prevenção de oxidação lipídica e inibidores de produção de ROS por reação de Fenton (22), suplementos para prevenção de dano oxidativo irreversível em células e material genético e como agentes terapêuticos para tratamento de doenças.

Triptofilinas são uma classe de moléculas enigmáticas obtidas de secreções cutâneas de anfíbios. Por não possuírem correlatos em mamíferos, pouco se sabe sua atividade biológica. Entretanto, peptídeos dessa família com notável atividade antioxidante vêm sendo reportados em estudos recentes, inferindo que talvez algumas dessas moléculas estejam envolvidas no sistema de defesa a estresse oxidativo dos anuros. Estudos indicam que a presença de atividade antioxidante está relacionada com presença de aminoácidos com grupos fenólicos, indólicos, sulfidrila, imidazol e pirrolidina, assim como com o tamanho da cadeia de aminoácidos. Uma das triptofilinas encontradas com atividade antioxidante, extraída de *Phitecopus azureus*, é o PaT-2 (FPPWL-NH₂). Analisando sua estrutura e sabendo o papel importante das interações aromático-aromático em proteínas, infere-se que uma interação C-H... π possa ocorrer entre as cadeias aromáticas laterais da Phe e Trp. A hipótese a ser estudada neste trabalho é que a interação entre esses dois aminoácidos possa ter algum efeito na atividade antioxidante dessa triptofilina. Buscando potencializar tais interações, um análogo cíclico nomeado de cPaT-2 (CGFPPWLGC-NH₂), foi sintetizado com base em um planejamento estrutural para aproximar o grupo fenólico da Phe do indólico do Trp, com intenção de estudar através de ensaios de atividade antioxidante se a interação entre os grupos aromáticos altera a capacidade de receber ou doar elétrons, gerando uma possível potencialização da atividade inibitória de radicais livres.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese de peptídeos em fase sólida

O método de síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS) é amplamente utilizado para sintetizar peptídeos de até 50 aminoácidos. Algumas das vantagens deste método em relação ao método por solução são a possibilidade de realizar toda a síntese em um único frasco e a fácil automação por se tratar de uma sucessão de etapas repetitivas (39). Utiliza-se de excessos dos reagentes permitindo garantir que a reação seja completa, com possibilidade de filtração para retirada do remanescente permitindo reduzir o número de etapas de purificação de intermediários. Apesar dessa facilitação no processo de síntese, gera uma maior quantidade de resíduos.

As etapas para realização da síntese da fase sólida se iniciam com a escolha de uma resina com o “linker” específico, a depender se a intenção final é ter o C-terminal do peptídeo ácido ou amidado. O papel do linker é servir como uma ponte entre o suporte sólido (resina) e o primeiro aminoácido da sequência do peptídeo alvo (considerando a direção C-terminal para N-terminal). A partir dessa etapa, os passos subsequentes envolvem desproteção do grupo amino e acoplamento do aminoácido seguinte até que o peptídeo desejado tenha sua sequência completa, tendo como etapa final a clivagem para que haja a separação do peptídeo sintetizado do suporte sólido fixo e desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos.

A metodologia de SPPS de uso mais comum foi empregada no trabalho, utilizando Fmoc/tBu. Os grupos protetores existentes são lábeis em condições inversas de pH, garantindo desproteções isoladas. A proteção dos grupos α -amino é feita pelo grupo Fmoc, lábil em condições básicas, enquanto a proteção dos grupos laterais dos aminoácidos é feita por compostos baseados em tert-butil ou tritil, lábeis em condições ácidas (39). Primeiramente foi sintetizado o cPaT-2, CGFPPWLGC-NH₂ e posteriormente o PaT-2, FPPWL-NH₂.

3.1.1. Linker

Para que tanto o análogo quanto a triptofilina tenham a porção C-terminal amidada, a resina de Rink foi a escolhida pois seu sítio de ligação no peptídeo possui um átomo de nitrogênio (Fig. 2).

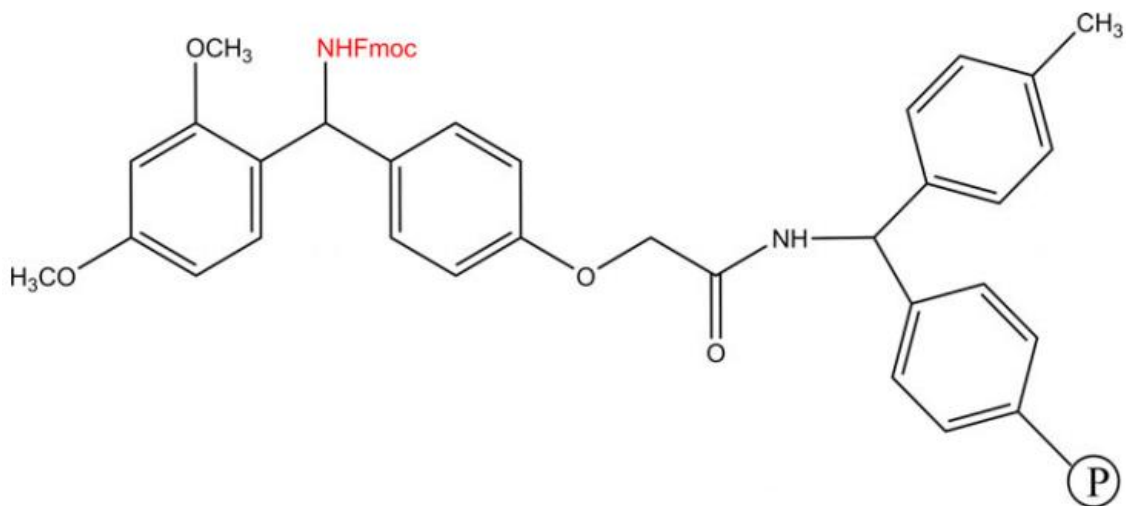


Figura 2. Estrutura do linker da resina de Rink (40).

Observa-se que está destacado em vermelho o grupo amino protegido por Fmoc responsável pela ligação com o primeiro aminoácido a ser acoplado. Demarcado por P, está o restante da resina.

3.1.2. Desproteção e inchaço da resina

Inicialmente foram adicionados 0,15 mmol de resina em uma seringa comum de polipropileno com filtro na extremidade oposta do êmbolo para impedir a passagem do suporte sólido. Faz-se necessário inchaço da resina utilizando volume suficiente de diclorometano (DCM) para que a resina fique completamente submersa, deixando sob agitação por 30 minutos, a fim de aumentar a área superficial do local de reação de síntese. Semelhante aos aminoácidos, a resina vem com o grupo de proteção Fmoc, tornando-se necessário retirá-lo para que ocorresse êxito no primeiro acoplamento. Para isso, efetuou-se duas lavagens com 4 mL de 4-metilpiperidina, feitas sob agitação por 15 minutos cada. A 4-metilpiperidina atua como base retirando o hidrogênio do carbono sp^3 terciário formando um carbânion, onde o par de elétrons rapidamente forma uma ligação dupla estabilizada por ressonância, quebrando a ligação com o grupo amino da resina (posteriormente dos aminoácidos).

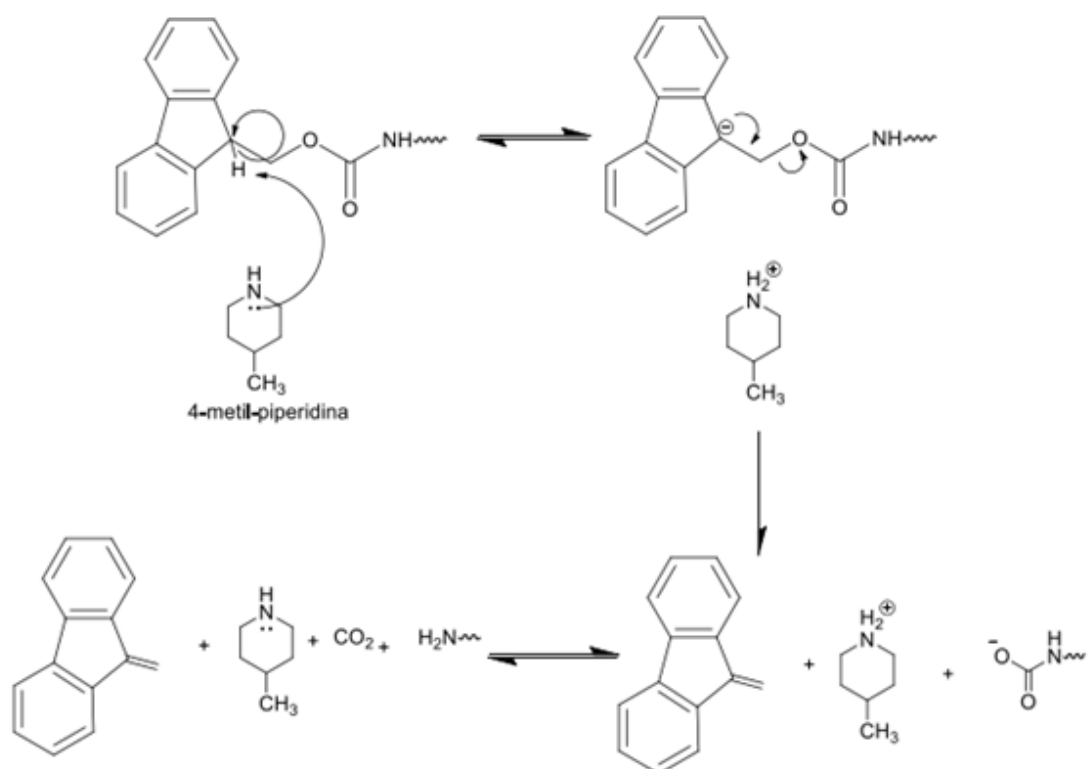


Figura 3. Reação de desproteção por remoção da molécula de Fmoc (43).

3.1.3. Teste de Kaiser

A fim de garantir que a desproteção foi efetiva, primeiramente realizou-se três lavagens alternadas de DCM e DMF para retirar quaisquer impurezas presentes, então um teste colorimétrico que investiga a presença de aminas livres, conhecido como teste de Kaiser, é executado. O teste de Kaiser (ou teste da ninidrina) consiste na reação entre a ninidrina e uma amina primária, em que após várias etapas é formado um composto conhecido como *Ruhemann's blue* (azul de Ruhemann em tradução livre). Caso a ninidrina reaja com uma amina secundária, é formado um composto amarelo-marrom (40).

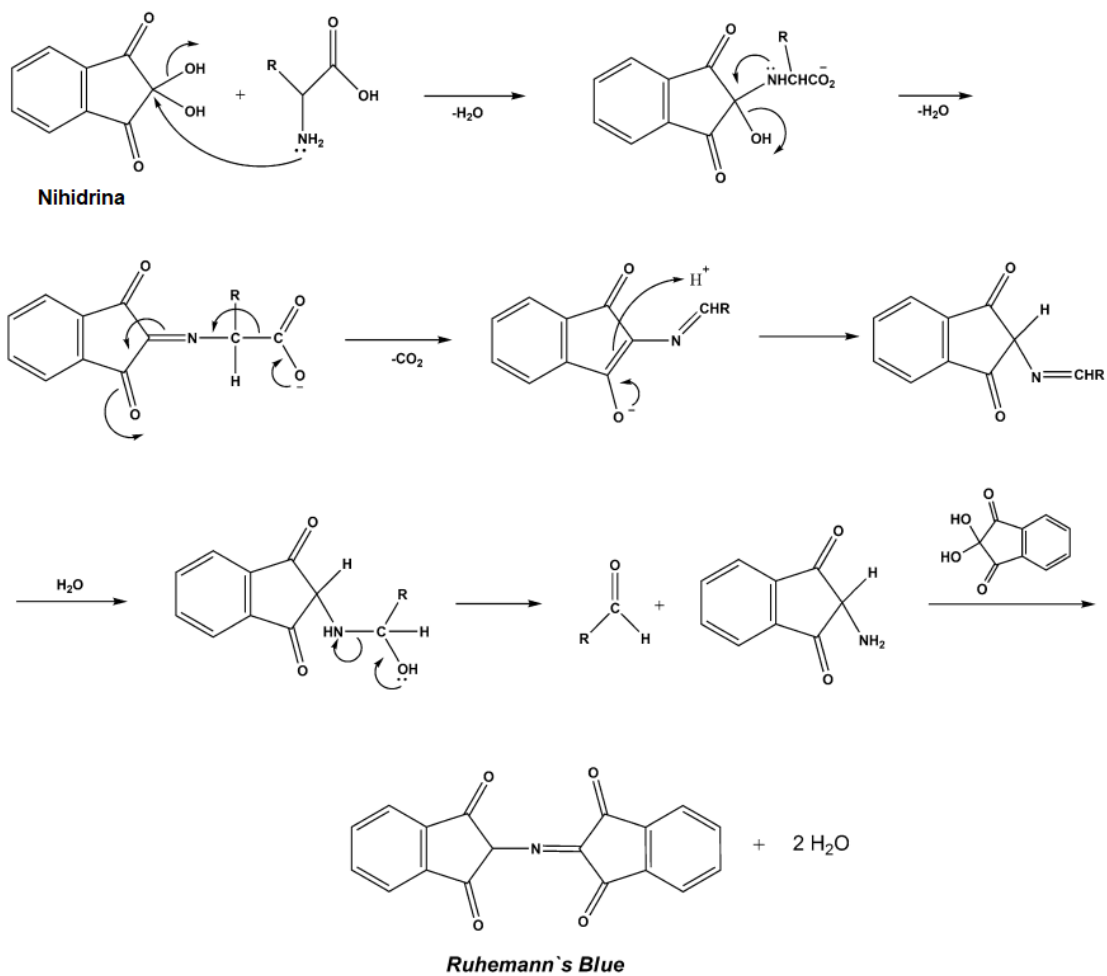


Figura 4. Reação da ninidrina com aminas primárias para formação do azul de Ruhemann (40).

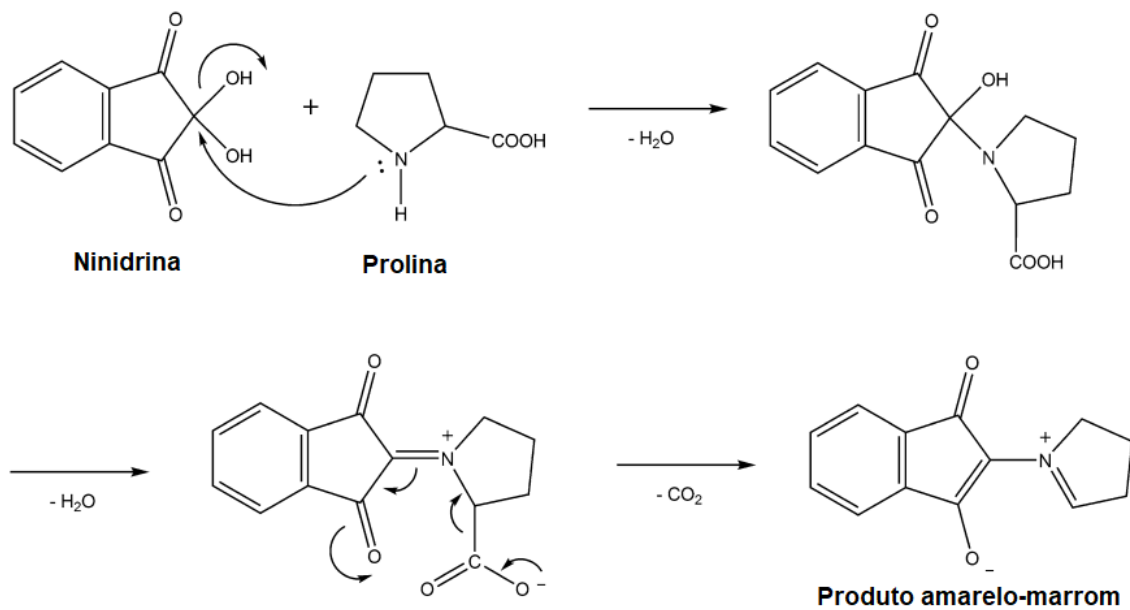


Figura 5. Reação da ninidrina com aminas secundárias para formação do composto amarelo-marrom (40).

Para realização do teste, coletou-se uma pequena amostra da fase sólida para reação com as soluções de 5% ninidrina em etanol (m/v), 80% fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina (2 mL 0,001 M KCN em 98 mL de piridina), sob aquecimento de aproximadamente 120 °C. Passados alguns minutos, analisa-se o sólido (de preferência contra uma fonte de luz) para observar a presença ou não de coloração. A presença de coloração azul-arroxeadada no sólido denuncia que a desproteção ocorreu com êxito, enquanto caso estivesse incolor, indica existência do grupamento Fmoc ainda presente na molécula.

3.1.4. Acoplamento utilizando Oxyma/DIC

Existem diversos métodos com diferentes reagentes para acoplamento de aminoácidos. Neste trabalho foram empregados os reagentes N-N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC) e etil(2Z)-2-ciano-2-hidroxiiminoacetato (oxyma). A vantagem de utilizar estes reagentes surge pois, no processo de ativação da carboxila, o DIC possui nitrogênio básicos capaz de captar o próton que é liberado ao formar o íon carboxilato, não necessitando da presença de uma base orgânica (40). O oxyma é uma alternativa segura que tem como função prevenir a epimerização de aminoácidos durante o processo de saída do grupo O-acil isoureia (41). O processo de acoplamento tem início no ataque nucleofílico do oxigênio da carboxila no carbono eletrofílico da carbodiimida, ativando o carbono da carbonila, que sofre ataque nucleofílico do grupo OH da molécula de oxyma, tendo como grupo de saída a O-acil-isoureia. Formou-se então um aminoéster reativo que sofre ataque nucleofílico da amina primária da resina (posteriormente a amina primária do último aminoácido acoplado), regenerando o oxyma e completando o acoplamento.

Para dar início ao acoplamento utilizando método Oxyma/DIC, pesou-se quatro equivalentes do primeiro aminoácido a ser acoplado (Cys), 85,3 mg de oxyma e ambos foram adicionados ao meio reacional juntamente com 2 mL de DMF e 93 µL de DIC. Homogeneizou-se a mistura que foi deixada sob agitação por 1h30, tempo suficiente para garantir um bom rendimento. Lavou-se, analogamente, com DCM e DMF para a limpeza do excesso de reagentes e verificou-se o êxito do acoplamento através de realização de teste de Kaiser. Para os acoplamentos subsequentes, repetiu-se os mesmos procedimentos de acoplamento até síntese completa do peptídeo

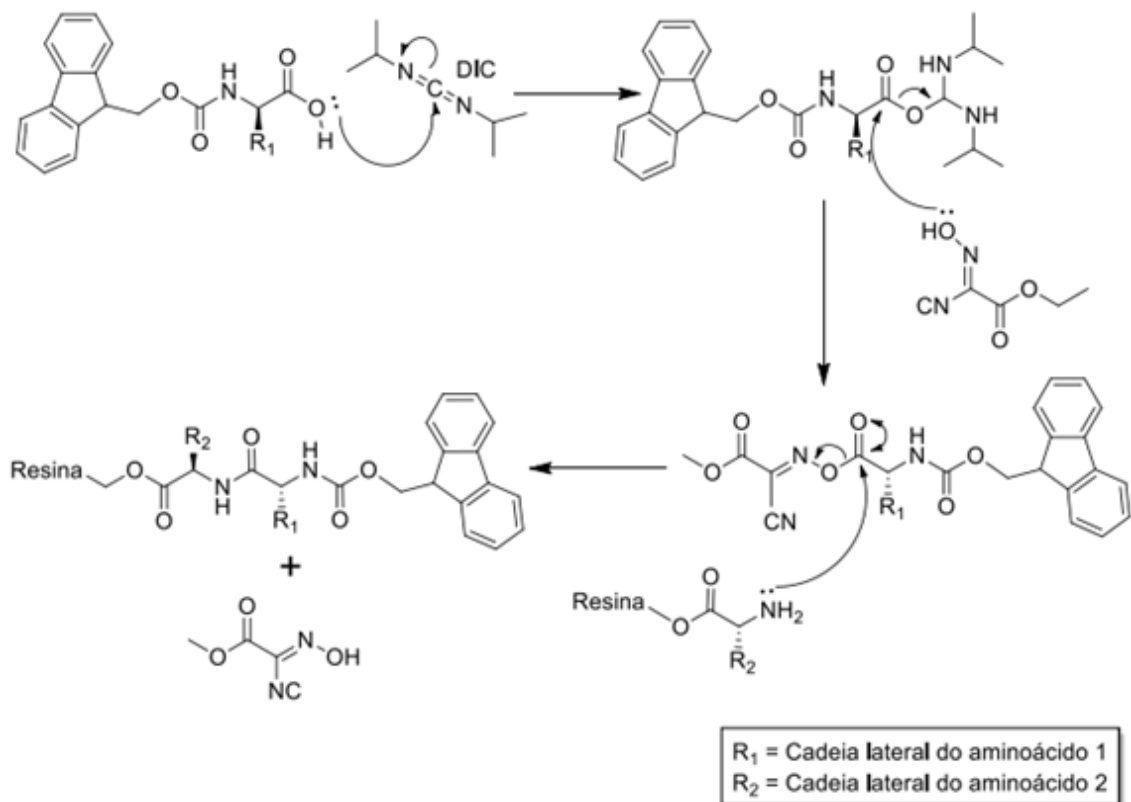


Figura 6. Reação de acoplamento com método Oxyma®/DIC (43).

3.1.5. Clivagem

Finalizado o peptídeo, a clivagem é feita para promover quebra da ligação do peptídeo com a resina soltando-o do suporte sólido, e para remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos. Emprega-se um chamado “coquetel de clivagem” a depender dos aminoácidos presentes. Isso ocorre porque a maior fração do coquetel corresponde a TFA, responsável pela retirada dos grupos protetores remanescentes e quebra da ligação com a resina, em que após esse processo de quebra muitos carbocátions são formados e para impedir que esses reajam com peptídeos ricos em elétrons como Tyr, Trp, Met e Cys, torna-se necessária a adição de compostos que reajam com os carbocátions prontamente (40, 42). Uma relação entre os coquetéis de clivagem e a estrutura do peptídeo é apresentada na tabela 1.

Tabela 2. Relação entre coquetéis de clivagem com a composição do peptídeo (42).

Aminoácidos presentes na estrutura do peptídeo	Coquetel de clivagem	Tempo de reação (h)
Todos exceto Arg, Cys e Trp desprotegidos	TFA/TIS/Água 95:2.5:2.5 (v/v)	1,5 – 3,0
Todos exceto Arg e Trp desprotegidos	TFA/TIS/Água/EDT 94:1:2.5:2.5 (v/v)	1,5 – 3,0
Todos	TFA/TIS/Água/Fenol/EDT 82.5:5:5:5:2.5 (v/v)	1,5 – 18,0

O coquetel escolhido baseado na natureza do peptídeo sintetizado foi o de TFA/TIS/Água/Fenol/EDT. Adicionou-se todos os reagentes e manteve-se sob agitação por 1,5 h. Purgou-se a solução com argônio para remoção dos compostos voláteis, condicionando a concentração do peptídeo. Dissolveu-se os reagentes restantes do coquetel juntamente com os protetores de cadeia lateral já clivados utilizando diisopropil éter. Filtrou-se a solução com filtração a vácuo, restando o peptídeo e a resina no papel filtrante enquanto a fase etérea foi coletada e armazenada. Lavou-se o sólido retido com água destilada para solubilizar o peptídeo, deixando apenas a resina retida no filtro e ao final armazenou-se a fase aquosa resultante.

3.2. Caracterização dos peptídeos sintetizados

O material aquoso obtido da clivagem do cPaT-2 foi liofilizado nas dependências da Universidade Católica de Brasília, campus Asa Norte, e analisado por espectrometria de massa do tipo ionização/dessorção a laser assistida por matriz com analisador de massa do tipo tempo de voo (MALDI-TOF) e sua fragmentação analisada por MS/MS para confirmação de sua massa,

ambos procedimentos feitos em colaboração com o Laboratório de Toxinologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. A matriz utilizada foi de 10 mg/mL de HCCA com mistura de 50% (v/v) ACN e 50% (v/v) TFA em proporção de 3:1 com o peptídeo, aplicada em placa de MALDI. Para análise das fragmentações, o aparelho foi empregado no modo refletor positivo. Os dados foram analisados utilizando o software FlexAnalysis v3.1 e também o mmass 5.5.0.

Durante o processo de lavagem com diisopropil éter na clivagem do PaT-2, percebeu-se a presença de sobrenadante na solução coletada, significando que o peptídeo havia passado pelo filtro juntamente com o éter. A fração etérea ficou em repouso em contato com ar para evaporação dos compostos voláteis. O restante foi ressolubilizado em aproximadamente 25 mL de água e levado para liofilização, para posteriormente ser analisada por espectrometria de massa do tipo QTOF.

3.3. Oxidação das Cys

A oxidação das sulfidrilas das Cys é necessária para a formação da ligação dissulfeto e ciclização da molécula, permitindo aproximação dos grupos aromáticos de Phe e Trp para facilitação de alguma interação aromática-aromática preferida. Realizou-se o processo de oxidação das cisteínas do peptídeo segundo método 6 do protocolo para peptídeos contendo Cys (44). O protocolo consiste em promover a oxidação deixando a solução com o peptídeo diluído exposta ao ar livre para reagir com oxigênio atmosférico. Para isso, o peptídeo liofilizado foi diluído para concentração de 0,5 mg/mL em solução de carbonato de amônio 0,1 M recém preparada e deixado em contato com ar atmosférico por 24 horas sob agitação. A confirmação da oxidação foi realizada por espectrometria de massa MALDI-TOF.

3.4. Purificação

A purificação dos peptídeos sintetizados foi realizada com técnica de cromatografia líquida de alta desempenho em fase reversa (RP-HPLC). Consiste na purificação por separação dos componentes da solução a partir de interações hidrofóbicas do peptídeo com os ligantes hidrofóbicos presentes no suporte sólido da fase estacionária. A fase móvel é composta por uma mistura de água com um solvente orgânico hidrofóbico somado a modificador iônico, sendo aplicado um gradiente desse solvente orgânico para que sua concentração aumente gradativamente com o tempo. Diferenças de hidrofobicidade dos compostos da solução geram diferentes intervalos de tempo necessários para

serem carregados através da fase estacionária e alcançarem o detector, gerando picos no software de análise e permitindo que os compostos sejam coletados separadamente (45).

Para purificação dos peptídeos cPaT-2 e PaT-2 foi utilizada coluna semi-preparativa com fase estacionária constituída por octadecilsilano (C₁₈). Como fase móvel, foi aplicado fluxo de 2,5 mL/min de 95 % de solução A (água deionizada) e 5 % solução B (acetonitrila com 0,1 % TFA) pelos primeiros 5 min. Houve aumento do gradiente da solução B durante um intervalo de 50 minutos, com os 5 minutos finais mantendo em 100 % totalizando 60 minutos. Para o cPaT-2 foram feitas quatro corridas, injetando em cada uma 5,25 g em 1 mL de água deionizada, enquanto para o PaT-2 realizou-se duas corridas com 15 mg em 1 mL de água deionizada em cada.

3.5. Predição da estrutura 3D e atividade antioxidante

A predição da possível estrutura de menor energia foi feita utilizando software PEP-FOLD (<https://mobyli.e.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD>) através de diversas simulações, em que o programa aponta a conformação mais estável em termos de energia e população (46).

A previsão da atividade antioxidante do cPaT-2 e PaT-2 foram feitas em colaboração com a Universidade Estadual Paulista, campus Itapeva, utilizando índice de Fukui condensado para átomos, definido pela capacidade de reorganização de cargas atômicas de uma molécula a partir da relação entre a densidade eletrônica e a remoção/adição de elétrons (47). O índice permite análise dos sítios da molécula com maior reatividade para reações do tipo redox, dividindo-se em reações com nucleófilos resultando em ganho de elétrons (f⁺), com eletrófilos resultando em perda de elétrons (f⁻) e uma média da atividade dos sítios reativos, prevendo reações com radicais livres (f⁰).

Por último, para utilizar como comparação de atividade antioxidante entre PaT-2 e isômeros, cPaT-2, glutianona, GHK e L-carnosina, os índices de aceitação de elétrons (Ra) e doação de elétron (Rd) foram calculados e analisados utilizando mapa aceitador-doador (DAM) (48).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e caracterização

PaT-2 e cPaT-2 foram sintetizados com sucesso utilizando método SPPS e após a liofilização de ambos, foi obtido um sólido granulado branco. Durante o processo de clivagem, na lavagem com diisopropil éter para separação do peptídeo e os grupos protetores de cadeia lateral, é comum o descarte do resultado dessa filtração visto que o peptídeo se mantém retido no filtro. Entretanto, devido ao tamanho e natureza de ambos os peptídeos sintetizados, a coleta da filtração referida por “fase etérea” foi armazenada. Observou-se que havia a presença de precipitado, indicando que o peptídeo foi carregado durante a lavagem de éter, especialmente no procedimento com o PaT-2. Dado comportamento é atribuído por o peptídeo ser totalmente composto por aminoácidos hidrofóbicos, apresentando maior afinidade pelo éter. Seu pequeno tamanho também permite maior facilidade para ultrapassar pelo filtro.

4.1.1. cPaT-2

Com o peptídeo liofilizado, uma pequena parte do produto foi solubilizada em solução de água e metanol para análise por espectrometria de massa a fim de obter confirmação do sucesso da síntese. A massa teórica do cPaT-2, sequência CGFPPWLGC-NH₂, com as sulfidrilas reduzidas é de $[M+H]^+ = 978,432$ Da, o pico base obtido do espectro de massa possui massa $[M+H]^+ = 978,426$ Da (Fig 7a). Observa-se presença de adutos de sódio e potássio a partir dos picos $[M + Na]^+ = 1000,398$ Da e $[M + K]^+ = 1016,371$ Da. Observa-se uma pequena diferença de 0,006 Da entre a massa teórica e a adquirida experimentalmente, atribuído ao fato de a análise em MALDI ter menor acurácia de massa em comparação a análise em ionização por eletrospray. É possível notar a presença de um pico com $[M+H]^+ = 976,396$ Da, diferenciado do pico referente a cPaT-2 por 2,03 Da. Este pico indica que parte do cPaT-2 sofreu oxidação, perdendo dois átomos de hidrogênio das sulfidrilas, formando ligação dissulfeto e gerando o peptídeo cíclico mesmo sem a presença de um meio oxidante específico.

Espectros de MS/MS foram obtidos ilustrando as possíveis fragmentações do peptídeo (Fig. 7b). Durante a colisão do peptídeo ionizado com o gás inerte, o ganho de energia interna induz desestabilização na ligação peptídica, gerando como fragmentos íons dos pares a/x, b/y ou c/z, com b/y sendo o par mais comum por ser o caminho menos energético, quebrando a ligação entre a da amida e a carbonila (49). A diferença de massa entre os

fragmentos é igual a massa dos resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura original do peptídeo (50). A partir da figura 7B é possível observar as fragmentações, comprovando sucesso na síntese do cPaT-2.

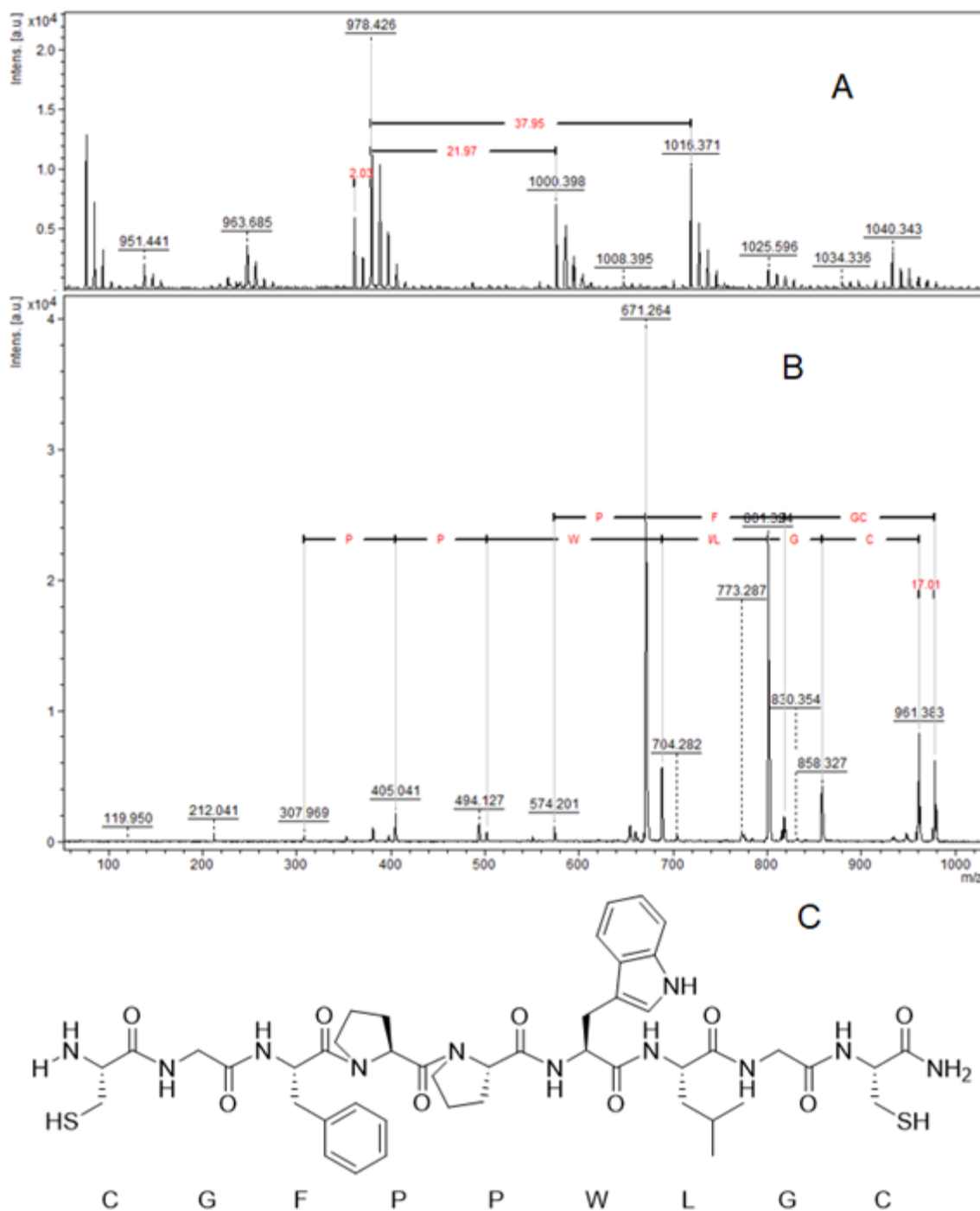


Figura 7. (A) Espectro de massa adquirido por MALDI-TOF apontando presença de cPaT-2 reduzido, oxidado e adutos de Na e K. (B) MS/MS ilustrando principais séries de fragmentações do peptídeo. (C) Estrutura linear do cPaT-2 reduzido.

4.1.2. cPaT-2 oxidado

O cPaT-2 foi solubilizado em solução de carbonato de amônio 0,1 M e deixado em contato com ar por 24 horas. Decorrido o tempo necessário, foi liofilizado e procedeu-se para análise por espectrometria de massa. Notou-se o aparecimento do pico base $[M + H]^+ = 976,404$ Da (Fig. 8), confirmando sucesso na ciclização e apontando presença de cPaT-2 oxidado por apresentar diferença de 2,02 Da para a molécula reduzida (Fig 7A), resultante da perda dos dois átomos de hidrogênio das sulfidrilas. Picos referentes a adutos de sódio $[M+ Na]^+ = 998,367$ Da e potássio $[M+K]^+ = 1014,341$ Da também foram constatados.

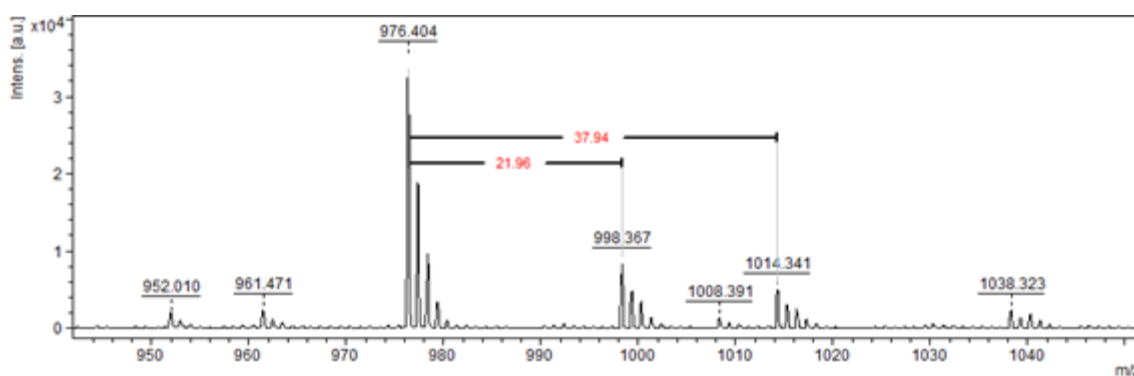


Figura 8. Espectro de massas obtido por MALDI-TOF indicando presença de cPaT-2 oxidado e adutos de Na e K.

O espectro de MS/MS confirma a ciclização do peptídeo através da presença do íon molecular ($m/z = 976,381$ Da, diferença de 2 Da dos dois hidrogênios) do cPaT-2 cíclico e das fragmentações possíveis. Alguns íons estão destacados, como íons da série b de fragmentos internos [4-6] (Pro-Pro-Trp), [4-7] (Pro-Pro-Trp-Leu) e [4-8] (Pro-Pro-Trp-Leu-Gly) e íons da série a, como o a7 (Cys-Gly-Phe-Pro-Pro-Trp-Leu) e o a8 (Cys-Gly-Phe-Pro-Pro-Trp-Leu-Gly) (Fig. 9).

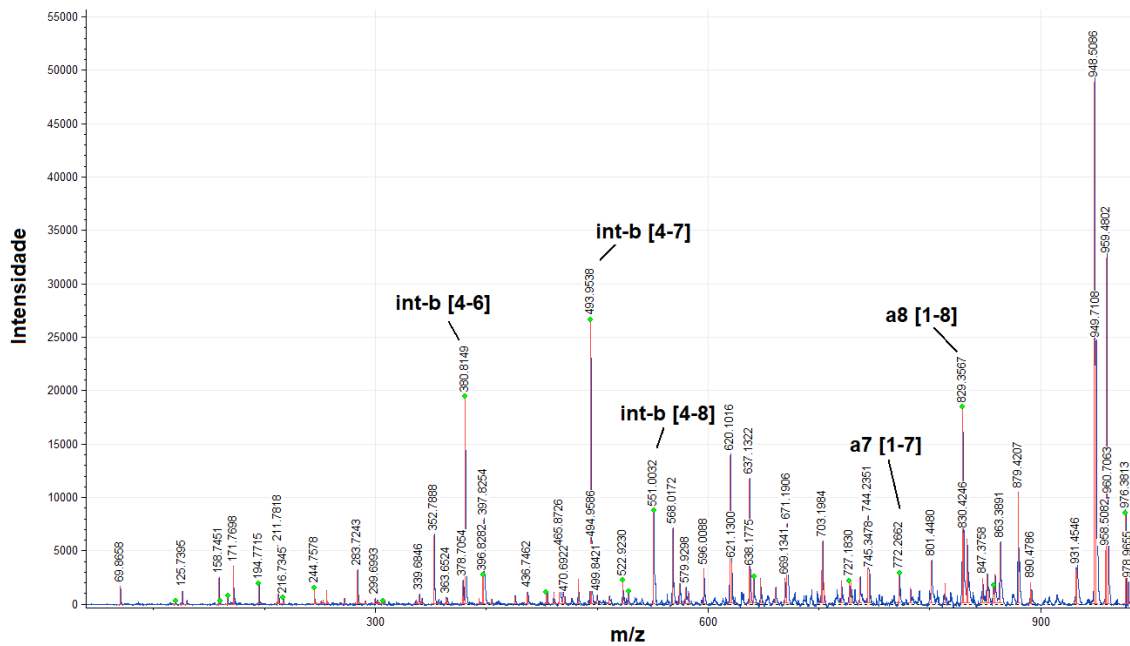


Figura 9. Espectro de MS/MS por MALDI com alguns íons de séries de fragmentações destacados de cPaT-2 cíclico.

Aproximadamente 21 g de cPaT-2 foram solubilizados em 4 mL de água para realizar corridas preparativas em RP-HPLC a fim de purificar o peptídeo. O volume total foi dividido em quatro alíquotas de mesmo volume, cada com concentração de 5,25 mg/mL. Medidas de absorvância foram adquiridas nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm, absorção característica de ligação peptídica e do triptofano, respectivamente. O cromatograma resultante mostra um pico limpo e isolado referente ao cPaT-2, com tempo de retenção de 29,845 minutos (Fig. 10).

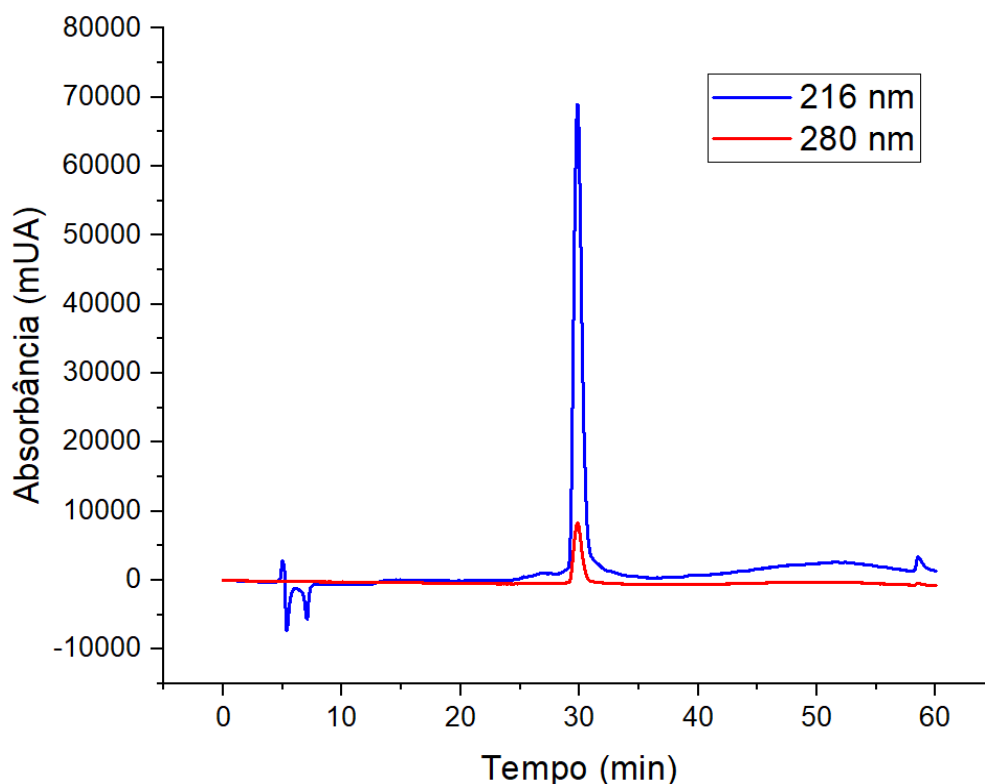


Figura 10. Gráfico de RP-HPLC da purificação do cPaT-2 com pico principal apresentando tempo de retenção de 29,845 minutos.

4.1.3. PaT-2

A síntese do PaT-2 foi feita com o intuito de utilizá-lo como um padrão de comparação para o análogo cíclico, rastreando alterações de atividade antioxidante da molécula em ensaios *in vitro* e em culturas celulares. O processo de preparação da amostra para análise por espectrometria de massa foi análogo ao feito com cPaT-2. A massa teórica do PaT-2, sequência FPPWL-NH₂, é de $[M+H]^+ = 658,371$ Da e o pico base obtido no espectro possui $[M + H]^+ = 658,371$ Da. Observa-se presença do aduto de sódio pelo pico $[M + Na]^+ = 680,352$ (Fig. 11).

Na fig. 12 observa-se o espectro de MS/MS para o PaT-2, ilustrando as principais séries de fragmentações da molécula e alguns íons imônio representando os picos com maior absorção. As diferenças de massa entre os picos indicam a massa dos aminoácidos que compõem o peptídeo, com isso comprovando sucesso na síntese do PaT-2.

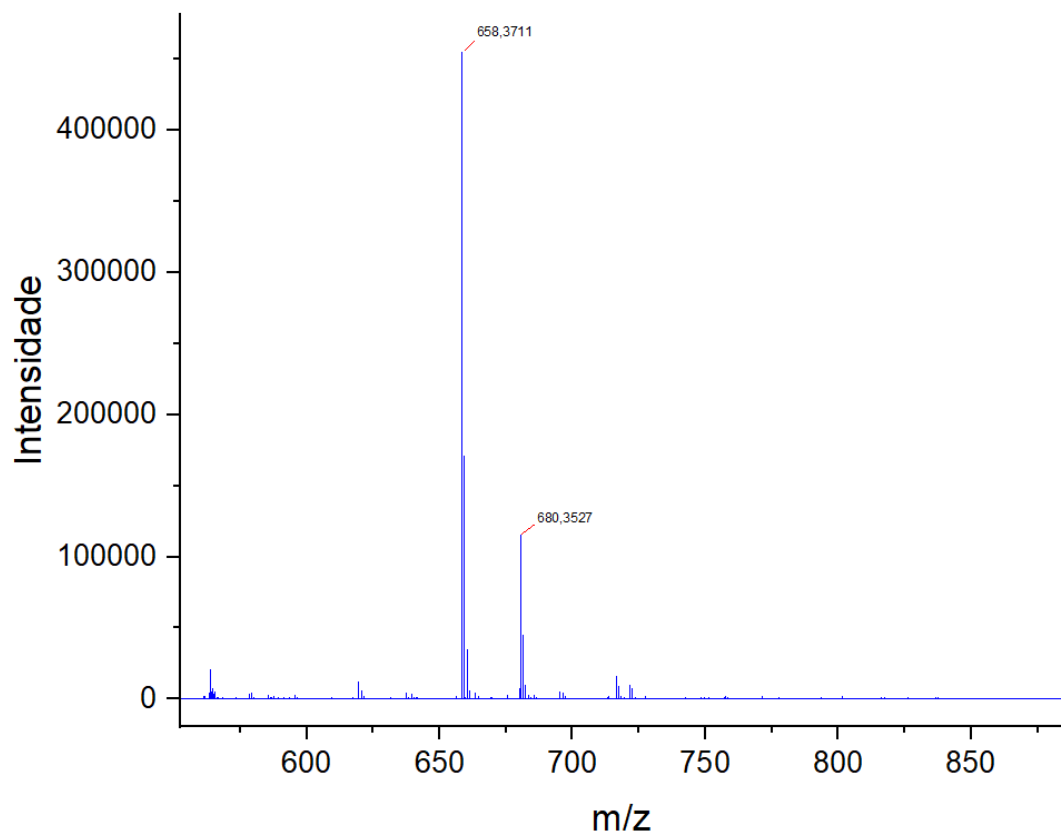


Figura 11. Espectro de massas adquirido por QTOF indicando presença de PaT-2 e seu aduto de Na.

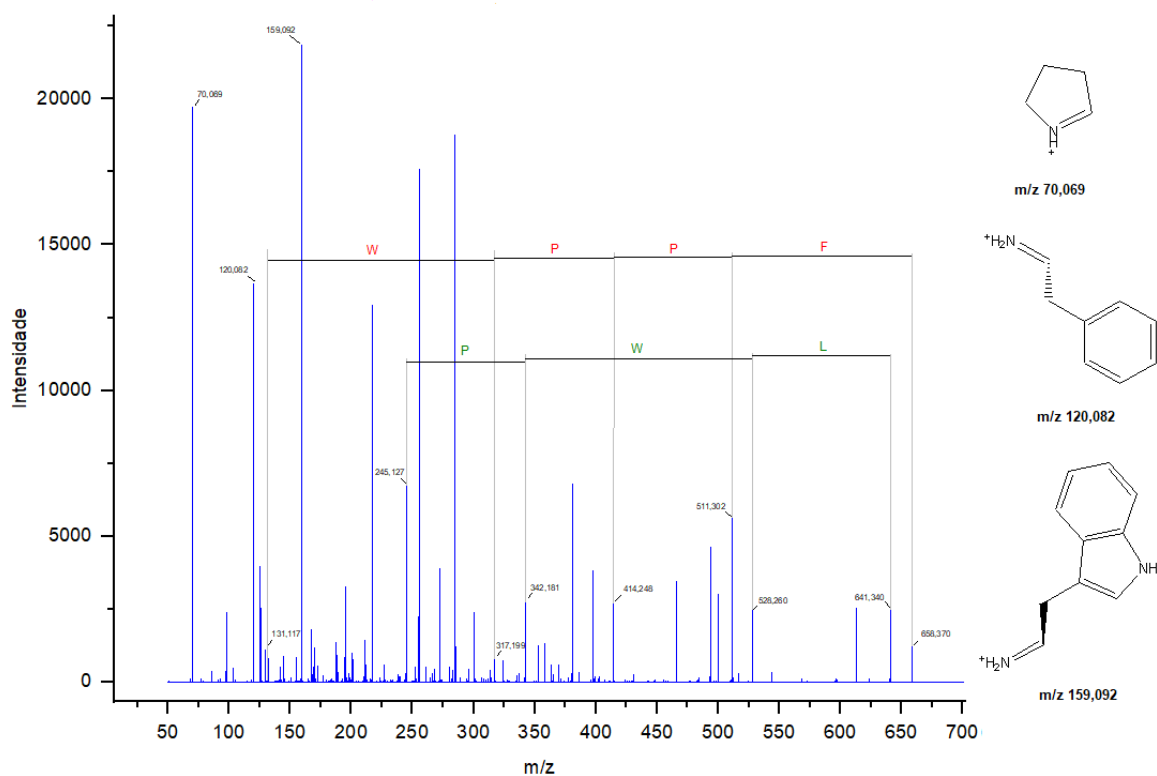


Figura 12. Espectro de MS/MS obtido por QTOF do PaT-2 indicando as séries de íons b (vermelho) e y (verde) e estruturas correspondentes ao pico base ($m/z = 159,092$) e outros picos de alta intensidade referentes a íons imônios.

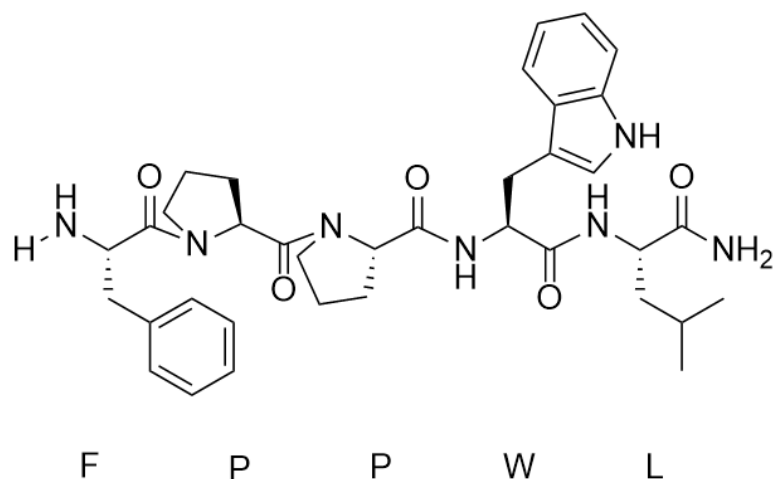


Figura 13. Estrutura linear do PaT-2.

A purificação do peptídeo foi feita com aproximadamente 30 mg solubilizados em 2 mL de água ionizada. Realizou-se duas corridas de 1 mL com concentração 15 mg/mL, com medidas de absorvância feitas em 216 e 280 nm. O gráfico resultante mostra a presença de um pico alongado e com elevada absorvância, referente ao PaT-2 com tempo de retenção de 29,248 minutos (Fig. 14).

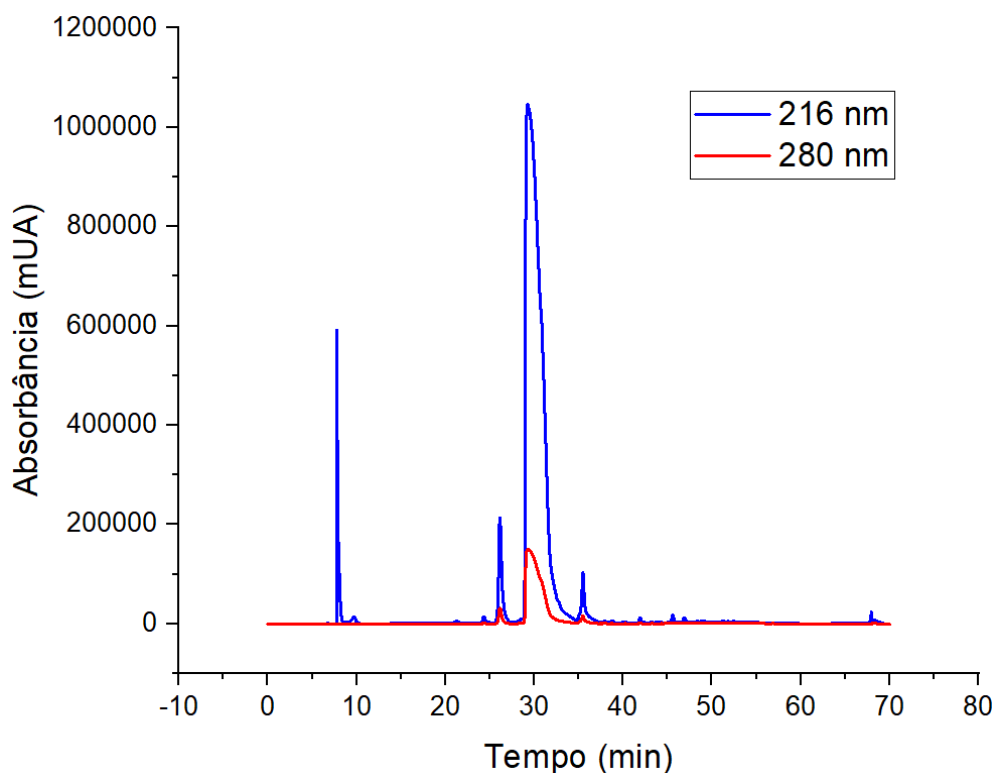


Figura 14. Gráfico de RP-HPLC da purificação do PaT-2, com pico principal apresentando tempo de retenção de 29,248 minutos.

4.2. Predição da estrutura 3D e atividade antioxidante

A síntese do cPaT-2 e posterior ciclização ocorreram para promover interação entre Phe e Trp para avaliação de modulação na atividade redox do peptídeo. Através de uma simulação utilizando serviço online PEP-FOLD, 10 conformações de cPaT-2 foram adquiridas e dispostas na tabela 3.

Tabela 3. Arquivos de simulação com parâmetros de estrutura obtidos por PEP-FOLD.

#	Arquivo	sOPEP (kcal/mol)
# cluster 1 - Size: 1	cPaT-2-model1	-13.23
# cluster 2 - Size: 1	cPaT-2-model2	-13.17
# cluster 3 - Size: 12	cPaT-2-model3	-13.15
	cPaT-2-model3.1	-13.11
	cPaT-2-model3.2	-13.10
	cPaT-2-model3.3	-12.69
	cPaT-2-model3.4	-12.47
	cPaT-2-model3.5	-11.40
	cPaT-2-model3.6	-11.08
	cPaT-2-model3.7	-10.20
	cPaT-2-model3.8	-10.02
	cPaT-2-model3.9	-8.88
	cPaT-2-model3.10	-8.83
cPaT-2-model3.11	-8.81	
# cluster 4 - Size: 1	cPaT-2-model4	-12.77
# cluster 5 - Size: 2	cPaT-2-model5	-12.61
	cPaT-2-model5.1	-10.62
# cluster 6 - Size: 1	cPaT-2-model6	-12.55
# cluster 7 - Size: 3	cPaT-2-model7	-12.53
	cPaT-2-model7.1	-12.12
	cPaT-2-model7.2	-11.04
# cluster 8 - Size: 1	cPaT-2-model8	-12.41
# cluster 9 - Size: 1	cPaT-2-model9	-12.34
# cluster 10 - Size: 1	cPaT-2-model10	-12.31

Utilizando parâmetro sOPEP, uma função que é expressada em termos locais (comprimento e ângulo de ligação, torções das cadeias laterais e ligações peptídicas), termos não ligantes e ligantes de hidrogênio (51). O valor do parâmetro sOPEP mostrado na tabela é dado em kcal/mol e apesar de não representar um valor de energia absoluto e exato, a comparação relativa entre valores é muito acurada. Com isso, as diferenças energéticas de algumas conformações são muito próximas, com o cPaT-2-model1 indicando ser a conformação mais estável do peptídeo. Foi a única conformação que teve seu modelo tridimensional disposto como uma forma preliminar de visualização das possíveis ocupações espaciais do Trp e Phe, ilustrado na figura 15A. Tal estrutura apresenta uma aproximação entre as cadeias laterais aromáticas de Phe e Trp representados como nuvens de coloração marrom, indicando uma possível interação borda-face (Fig. 15B). Observa-se também a proximidade de ambos os resíduos aromáticos da ligação S-S, aproximando os elétrons da nuvem π dos elétrons não ligantes dos átomos de enxofre, podendo ter influência na atividade redox de algum dos sítios reativos.

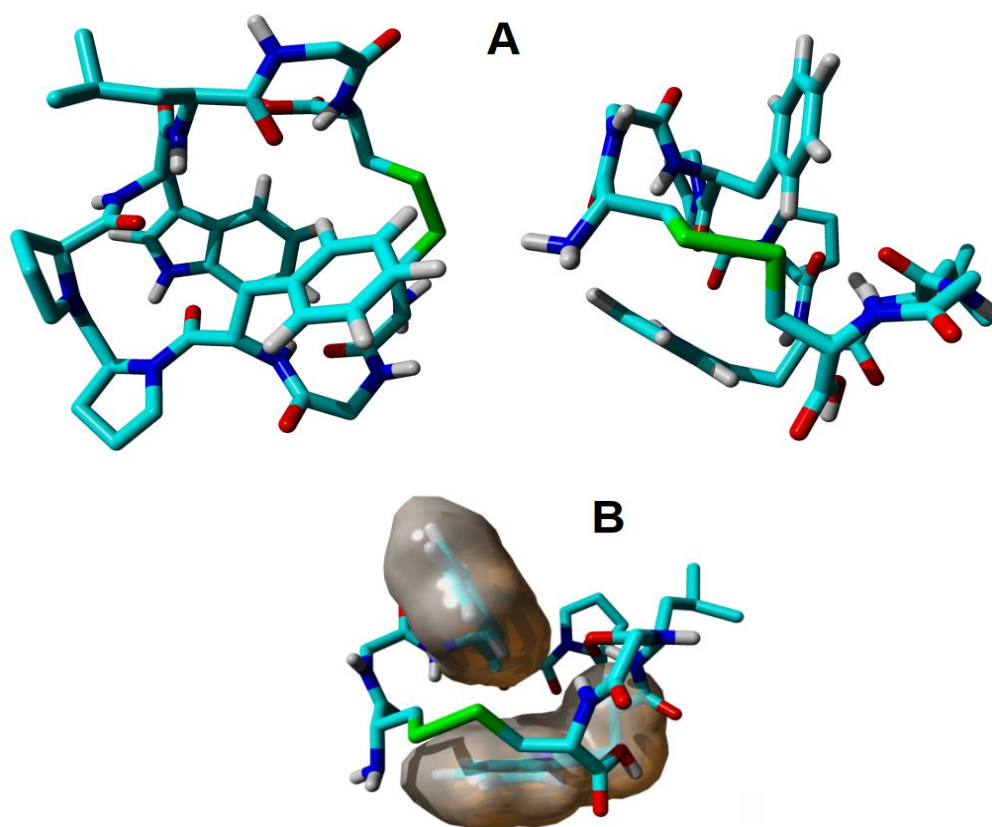


Figura 15. (A) Estrutura de menor energia do cPaT-2 cíclico conforme simulação feita em PEP-FOLD. (B) Destaque de estruturas aromáticas em nuvens de coloração marrom.

Medindo a distância entre os anéis da estrutura mostrada na figura 15B, obtém-se o valor de aproximadamente 4 Å. Segundo Janiak, distâncias entre anéis aromáticos acima de 3,8 Å não são aceitas como interações π devido a seu caráter muito fraco (35). Entretanto, maior aproximação das cadeias é possível conforme o peptídeo adota outras conformações tridimensionais, encurtando a distância entre as faces dos grupos aromáticos para o intervalo ideal de 3,3 a 3,6 Å.

Apesar de a estrutura ilustrada ser a de menor energia de acordo com a simulação, isso não significa que é uma conformação fixa. Em solução aquosa, o peptídeo pode adotar diversos estados conformacionais diferentes. Efeitos como interação intermolecular ou interação com solvente, tratando-se de uma molécula composta em sua maioria por aminoácidos hidrofóbicos, podem levar o cPaT-2 a adotar outras conformações.

Cálculos teóricos para obtenção do modelo de Fukui realizados em colaboração com a Universidade Estadual Paulista foram realizados para prover estimativas da capacidade do cPaT-2 de atuar como doador ou aceptor de elétron e assim avaliando sua atividade antioxidante *in silico* (Fig. 16). A relação entre os cálculos estimativos e a atividade efetiva em ensaios *in vitro* ainda está

sendo estudada, não havendo ainda uma compreensão concreta entre resultados *in silico* e resultados experimentais.

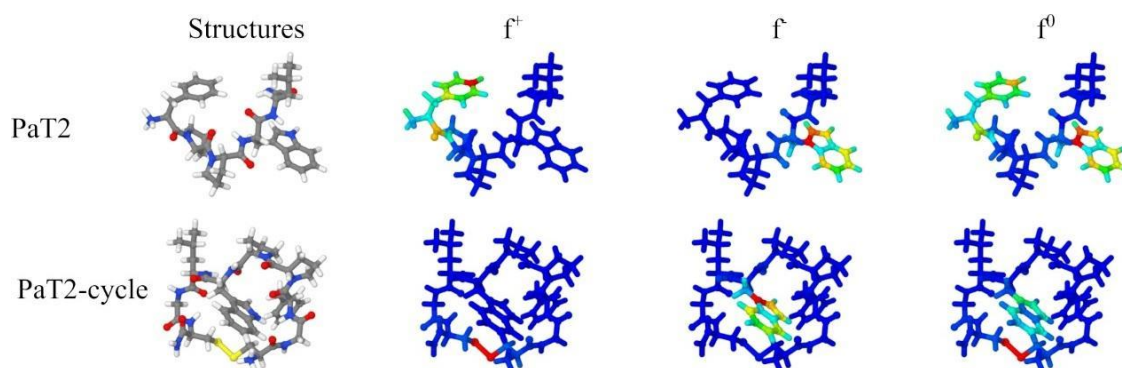


Figura 16. Predição de perfil reacional de PaT-2 e cPaT-2 com agentes doadores de elétrons (f^+), aceptores de elétrons (f) e média entre ambas, indicando reação com radicais livres (f^0). Escala de cores utilizada em função da reatividade do sítio, com vermelho e azul sendo os extremos (muito reativo e não reativo, respectivamente).

Diferentemente da conformação apresentada por simulação utilizando PEP-FOLD, resultados preliminares para os estudos de índice de Fukui ainda não levaram em consideração estabilidade das conformações. Cálculos para encontrar estrutura menos energética e fazer a predição de atividade redox da mesma ainda serão realizados. Com isso, a molécula apresentada é apenas um primeiro olhar para atividade redox e não representa a conformação de menor energia do cPaT-2 cíclico.

Observa-se que para PaT-2, reações com agentes nucleofílicos tendem a ocorrer com o anel aromático do aminoácido Phe, precisamente com o carbono da posição *-para* em relação ao restante da cadeia. No cPaT-2 nota-se que segundo os cálculos, o mesmo grupo não desempenha tal atividade, mas sim os átomos de enxofres ligados entre si (Fig. 16). Em ambos os peptídeos, reações com eletrófilos são mais prováveis de ocorrer com o resíduo de Trp, um aminoácido rico em elétrons com conhecida atividade antioxidante (22), atrelada a efeitos de aromaticidade responsáveis pela estabilização dos produtos obtidos após a acepção de elétrons.

Cálculos realizados com a estrutura do cPaT-2 indicam que os átomos de enxofre dominam a atividade redox da molécula, comportamento que inicialmente não era previsto. Cys é um aminoácido com atividade antioxidante relatada na literatura (18, 22, 52, 53). Em um estudo com diversos peptídeos com atividade antioxidante contendo Cys em suas sequências, Yang et al. concluíram que a capacidade de reação com espécies radiculares não dependia da presença de Cys livre, mas que sua atividade estava atrelada com a taxa de consumo dessas espécies (53). Alguns exemplos de peptídeos antioxidantes

que contém esse aminoácido são Andersonin-AOP1 (FLPGLECVW), VH12 (VKYVSPTCGPCH) e salamandrin-I (FAVWGCADYRGY-NH₂) (52-54). Cys age através da doação de hidrogênio da sulfidril (-SH) ou por doação de elétrons do átomo de enxofre (20, 22). Entretanto, o efeito mostrado segundo os cálculos mostra como sendo o sítio mais reativo para aceitação de elétrons, possibilitando a redução para sulfidril e abertura da molécula. Na análise do espectro de massa do cPaT-2 antes de sofrer a oxidação, presença da molécula na forma cíclica já era encontrada, indicando que ligações dissulfeto eram formadas mesmo não estando em um meio oxidante. Com isso, se torna pouco plausível a hipótese de que os enxofres envolvidos na ligação dissulfeto sejam bons aceptores com finalidade de a molécula deixar de ser cíclica e adquirir uma conformação espacial menos energética.

Análise dos índices Ra e Rd do mapa aceitador-doador do cPaT-2 em comparação com L-carnonisa, GHK e glutathiona (peptídeos antioxidantes naturais) e PaT-2 e dois análogos, mostram que o peptídeo em sua forma cíclica age como um mal doador de elétrons, mas muito bom aceitador (Fig. 17). Ambas as características apresentam valores consideravelmente maiores do que os relatados para as moléculas utilizadas como comparação, sendo necessário o uso da quebra dos eixos para incluir valores referentes a cPaT-2. Analisando em termos de orbital de fronteira, infere-se que os orbitais LUMO dos enxofres são de baixa energia permitindo melhor aproximação com o HOMO do nucleófilo e menor barreira energética na interação. Comparando cPaT-2 com a glutathiona, um tripeptídeo disperso em todos os organismos vivos e poderoso antioxidante responsável por inibição de radicais livres e sinalizador de equilíbrio redox no organismo (56), nota-se que no papel de acceptor de elétrons, cPaT-2 exhibe atividade consideravelmente maior. Apesar de possuir Trp, cPaT-2 é dado como um mal doador de elétrons, levando isso em conta teoriza-se que a proximidade da ligação dissulfeto com o anel indol na conformação utilizada para realização dos cálculos possa ter algum papel nesse comportamento.

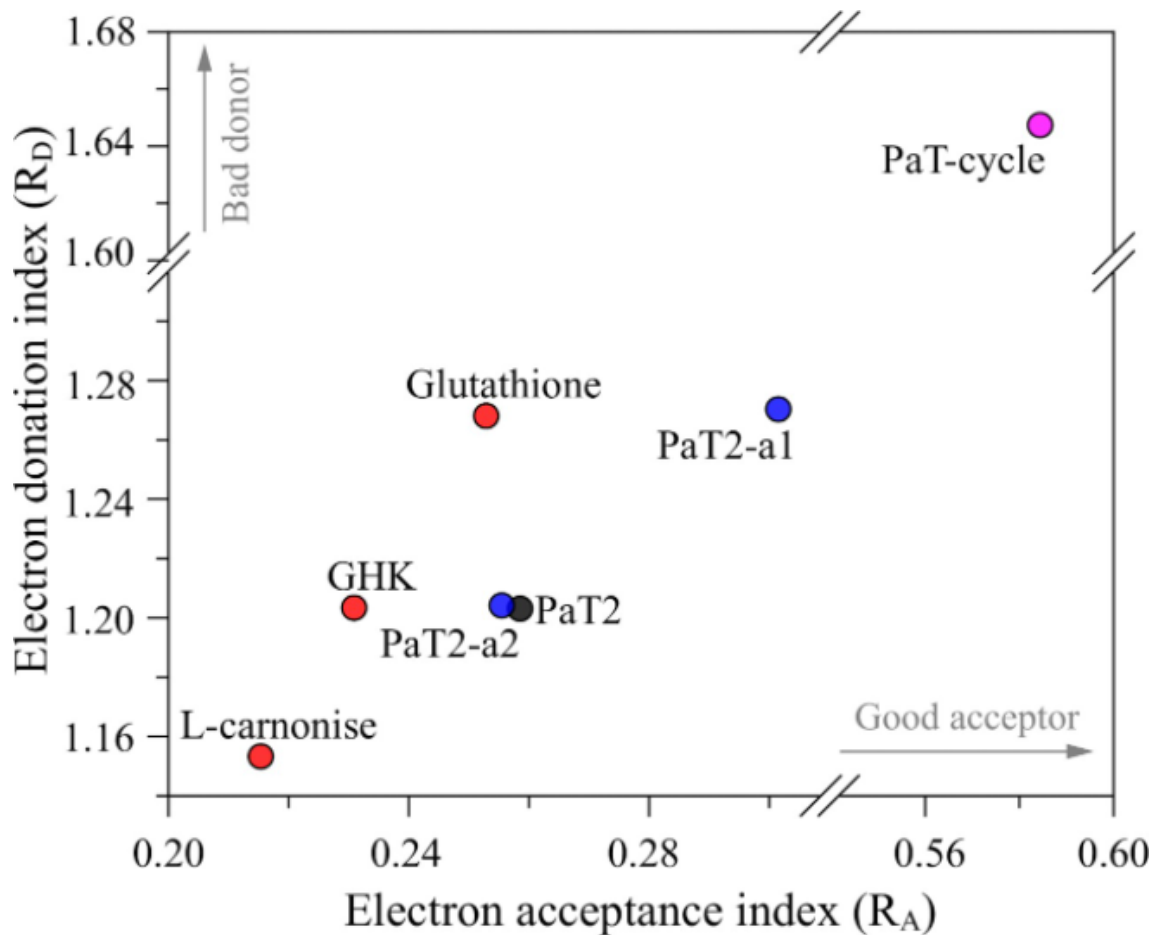


Figura 17. Mapa de doador-aceptor (DAM) para cPaT-2 (rosa), PaT-2 (preto), glutathiona, GHK, L-carnonisa (vermelho), e dois isômeros conformacionais de PaT-2 (azul) (dados não publicados).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo parte de uma triptofilina caracterizada em *Pithecopus azureus* com conhecida atividade antioxidante, em que um análogo cíclico foi sintetizado para gerar aproximação das cadeias aromáticas do peptídeo e analisar a modulação de sua interação com radicais livres reativos. Resultados de predição da conformação tridimensional do análogo cíclico exibem uma estrutura de menor energia que permite aproximação dos resíduos aromáticos de Phe e Trp, porém não há certeza se a distância entre os anéis é ideal para a ocorrência de interação. Cálculos teóricos para predição da atividade redox mostram a ligação S-S como dominante nesse papel, entretanto para esta predição a energia e estabilidade conformacional do peptídeo não foram levados em conta até o presente momento. O programa utilizado para os cálculos ainda é um projeto em desenvolvimento e a relação entre resultados *in silico* e o comportamento experimental ainda não está clara. Estes resultados serão utilizados como guia e mais explorações devem ser feitas para estudar se os dados são preditivos ou não. Estudos com outras conformações podem vir a incentivar interações π -stacking para permitir analisar sua influência em aspectos reacionais com espécies nucleofílicas e eletrofílicas. Ensaio com ABTS e DPPH serão realizados para estudar o real potencial de interação com espécies radiculares *in vitro*, para depois serem feitos testes em culturas celulares, dado que atividade antioxidante química de um composto não necessariamente é expressa em um meio biológico.

REFERÊNCIAS

- 1- Bevins, C L. "Peptides from Frog Skin", [s.d.], 20.
- 2- Wang, Lei, Mei Zhou, Tianbao Chen, Brian Walker, e Chris Shaw. "PdT-2: A Novel Myotropic Type-2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Mexican Giant Leaf Frog, *Pachymedusa Dacnicolor*". *Peptides* 30, nº 8 (agosto de 2009): 1557–61. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.04.019>.
- 3- Wang, Ran, Tianbao Chen, Mei Zhou, Lei Wang, e Chris Shaw. "PsT-1: A New Tryptophyllin Peptide from the Skin Secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, *Phyllomedusa Sauvagei*". *Regulatory Peptides* 184 (junho de 2013): 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.03.017>.
- 4- Ge, Lilin, Peng Lyu, Mei Zhou, Huiling Zhang, Yuantai Wan, Bin Li, Renjie Li, Lei Wang, Tianbao Chen, e Chris Shaw. "AcT-2: A Novel Myotropic and Antimicrobial Type 2 Tryptophyllin from the Skin Secretion of the Central American Red-Eyed Leaf Frog, *Agalychnis Callidryas*". *The Scientific World Journal* 2014 (2014): 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/158546>.
- 5- Erspamer, V., P. Melchiorri, G. Falconieri Erspamer, P.C. Montecucchi, e R. de Castiglione. "Phyllomedusa Skin: A Huge Factory and Store-House of a Variety of Active Peptides". *Peptides* 6 (janeiro de 1985): 7–12. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90343-2](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90343-2).
- 6- Montecucchi, Pier Carlo. "Isolation and Primary Structure Determination of Amphibian Skin Tryptophyllins". *Peptides* 6 (janeiro de 1985): 187–95. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90373-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90373-0).
- 7- Conlon, J. Michael, Thierry Jouenne, Pascal Cosette, David Cosquer, Hubert Vaudry, Christopher K. Taylor, e Peter W. Abel. "Bradykinin-Related Peptides and Tryptophyllins in the Skin Secretions of the Most Primitive Extant Frog, *Ascaphus Truei*". *General and Comparative Endocrinology* 143, nº 2 (setembro de 2005): 193–99. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.04.006>.
- 8- Shi, Daning, Xinping Xi, Lei Wang, Yitian Gao, Chengbang Ma, Hang Chen, Mei Zhou, Tianbao Chen, e Chris Shaw. "Baltikinin: A New Myotropic Tryptophyllin-3 Peptide Isolated from the Skin Secretion of the Purple-Sided Leaf Frog, *Phyllomedusa Baltea*", 2016, 10.
- 9- Chen, Tianbao, David F. Orr, Martin O'Rourke, Ceola McLynn, Anthony J. Bjourson, Stephen McClean, David Hirst, Pingfan Rao, e Chris Shaw. "Pachymedusa Dacnicolor Tryptophyllin-1: Structural Characterization, Pharmacological Activity and Cloning of Precursor cDNA". *Regulatory Peptides* 117, nº 1 (janeiro de 2004): 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2003.08.004>.
- 10- Wang, Ran, Yangjun Lin, Tianbao Chen, Mei Zhou, Lei Wang, e Chris Shaw. "Molecular Cloning of a Novel Tryptophyllin Peptide from the Skin of the Orange-Legged Monkey Frog, *Phyllomedusa Hypochondrialis*". *Chemical Biology & Drug Design* 83, nº 6 (junho de 2014): 731–40. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12287>.

- 11- Yang, Hailong, Xu Wang, Xiuhong Liu, Jing Wu, Cunbao Liu, Weiming Gong, Zhiqiang Zhao, et al. "Antioxidant Peptidomics Reveals Novel Skin Antioxidant System". *Molecular & Cellular Proteomics* 8, nº 3 (março de 2009): 571–83. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800297-MCP200>.
- 12- Tran, Thi Thanh Nha, Dinh Phien Tran, Van Cuong Nguyen, Thi Dieu Thuan Tran, Thi Thu Thuy Bui, e John Hamilton Bowie. "Antioxidant Activities of Major Tryptophyllin L Peptides: A Joint Investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and Radical Scavenging Experiments". *Journal of Peptide Science* 27, nº 4 (abril de 2021). <https://doi.org/10.1002/psc.3295>.
- 13- Barbosa, Eder Alves, Ana Oliveira, Alexandra Plácido, Renato Socodato, Camila C. Portugal, Ana Carolina Mafud, Alicia S. Ombredane, et al. "Structure and Function of a Novel Antioxidant Peptide from the Skin of Tropical Frogs". *Free Radical Biology and Medicine* 115 (fevereiro de 2018): 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.001>.
- 14- Nimse, Satish Balasaheb, e Dilipkumar Pal. "Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms". *RSC Advances* 5, nº 35 (2015): 27986–6. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>.
- 15- Di Marzo, Noemi, Elisa Chisci, e Roberto Giovannoni. "The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells". *Cells* 7, nº 10 (4 de outubro de 2018): 156. <https://doi.org/10.3390/cells7100156>.
- 16- Meng, Dan, Peng Zhang, Lingling Zhang, Hong Wang, Chi-Tang Ho, Shiming Li, Fereidoon Shahidi, e Hui Zhao. "Detection of Cellular Redox Reactions and Antioxidant Activity Assays". *Journal of Functional Foods* 37 (outubro de 2017): 467–79. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.008>.
- 17- Wong, Fai-Chu, Jianbo Xiao, Shaoyun Wang, Kah-Yaw Ee, e Tsun-Thai Chai. "Advances on the Antioxidant Peptides from Edible Plant Sources". *Trends in Food Science & Technology* 99 (maio de 2020): 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.012>.
- 18- Liu, Cunbao, Jing Hong, Hailong Yang, Jing Wu, Dongying Ma, Dongsheng Li, Donghai Lin, e Ren Lai. "Frog Skins Keep Redox Homeostasis by Antioxidant Peptides with Rapid Radical Scavenging Ability". *Free Radical Biology and Medicine* 48, nº 9 (1º de maio de 2010): 1173–81. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.036>.
- 19- Pouzo, L B. "Antioxidant Status, Lipid and Colour Stability of Aged Beef from Grazing Steers Supplemented with Corn Grain and Increasing Levels of Flaxseed", [s.d.], 40.
- 20- Power, O., P. Jakeman, e R. J. FitzGerald. "Antioxidative Peptides: Enzymatic Production, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Potential Applications of Milk-Derived Antioxidative Peptides". *Amino Acids* 44, nº 3 (março de 2013): 797–820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>.
- 21- França, M.B., A.D. Panek, e E.C.A. Eleutherio. "Oxidative Stress and Its Effects during Dehydration". *Comparative Biochemistry and Physiology Part A:*

- Molecular & Integrative Physiology* 146, nº 4 (abril de 2007): 621–31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>.
- 22- Zou, Tang-Bin, Tai-Ping He, Hua-Bin Li, Huan-Wen Tang, e En-Qin Xia. “The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins”. *Molecules* 21, nº 1 (12 de janeiro de 2016): 72. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>.
- 23- Aguilar-Toalá, Jose Eleazar, e Andrea M. Liceaga. “Cellular Antioxidant Effect of Bioactive Peptides and Molecular Mechanisms Underlying: Beyond Chemical Properties”. *International Journal of Food Science & Technology* 56, nº 5 (maio de 2021): 2193–2204. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14855>.
- 24- Chan, Kin M., Eric A. Decker, e Cameron Feustman. “Endogenous Skeletal Muscle Antioxidants”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34, nº 4 (julho de 1994): 403–26. <https://doi.org/10.1080/10408399409527669>.
- 25- Tonolo, F., M. Sandre, S. Ferro, A. Folda, V. Scalcon, G. Scutari, E. Feller, O. Marin, A. Bindoli, e M. P. Rigobello. “Milk-Derived Bioactive Peptides Protect against Oxidative Stress in a Caco-2 Cell Model”. *Food & Function* 9, nº 2 (2018): 1245–53. <https://doi.org/10.1039/C7FO01646H>.
- 26- Tonolo, Federica, Alessandra Folda, Luca Cesaro, Valeria Scalcon, Oriano Marin, Stefania Ferro, Alberto Bindoli, e Maria Pia Rigobello. “Milk-Derived Bioactive Peptides Exhibit Antioxidant Activity through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway”. *Journal of Functional Foods* 64 (janeiro de 2020): 103696. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>.
- 27- Lorenzo, Jose M., Paulo E.S. Munekata, Belen Gómez, Francisco J. Barba, Leticia Mora, Cristina Pérez-Santaescolástica, e Fidel Toldrá. “Bioactive Peptides as Natural Antioxidants in Food Products – A Review”. *Trends in Food Science & Technology* 79 (setembro de 2018): 136–47. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>.
- 28- Eftekharzadeh, Bahareh, Fariba Khodagholi, Azadeh Abdi, e Nader Maghsoudi. “Alginate Protects NT2 Neurons against H₂O₂-Induced Neurotoxicity”. *Carbohydrate Polymers* 79, nº 4 (17 de março de 2010): 1063–72. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.040>.
- 29- Udenigwe, Chibuiké C., e Rotimi E. Aluko. “Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits”. *Journal of Food Science* 77, nº 1 (janeiro de 2012): R11–24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>.
- 30- Martinez, Chelsea R., e Brent L. Iverson. “Rethinking the Term ‘Pi-Stacking’”. *Chemical Science* 3, nº 7 (2012): 2191. <https://doi.org/10.1039/c2sc20045g>.
- 31- Thomas, Annick, Rita Meurisse, Benoit Charlotiaux, e Robert Bresseur. “Aromatic Side-Chain Interactions in Proteins. I. Main Structural Features”. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 48, nº 4 (1º de setembro de 2002): 628–34. <https://doi.org/10.1002/prot.10190>.
- 32- Singh, J., e J.M. Thornton. “The Interaction between Phenylalanine Rings in Proteins”. *FEBS Letters* 191, nº 1 (21 de outubro de 1985): 1–6. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80982-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80982-0).

- 33- Sinnokrot, Mutasem Omar, e C. David Sherrill. "High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of Π - π Interactions in Benzene Dimers". *The Journal of Physical Chemistry A* 110, n° 37 (1° de setembro de 2006): 10656–68. <https://doi.org/10.1021/jp0610416>.
- 34- Williams, Jeffrey Huw, Jeremy Karl Cockcroft, e Andrew Nicholas Fitch. "Structure of the Lowest Temperature Phase of the Solid Benzene–Hexafluorobenzene Adduct". *Angewandte Chemie International Edition in English* 31, n° 12 (dezembro de 1992): 1655–57. <https://doi.org/10.1002/anie.199216551>.
- 35- Janiak, Christoph. "A Critical Account on π - π Stacking in Metal Complexes with Aromatic Nitrogen-Containing Ligands †". *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, n° 21 (2000): 3885–96. <https://doi.org/10.1039/b003010o>.
- 36- Thomas, Annick, Rita Meurisse, e Robert Brasseur. "Aromatic Side-Chain Interactions in Proteins. II. Near- and Far-Sequence Phe-X Pairs". *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 48, n° 4 (1° de setembro de 2002): 635–44. <https://doi.org/10.1002/prot.10191>.
- 37- Maji, Samir K., Lei Wang, Jason Greenwald, e Roland Riek. "Structure-Activity Relationship of Amyloid Fibrils". *FEBS Letters* 583, n° 16 (20 de agosto de 2009): 2610–17. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.003>.
- 38- Chourasia, Mukesh, G. Madhavi Sastry, e G. Narahari Sastry. "Aromatic–Aromatic Interactions Database, A2ID: An Analysis of Aromatic π -Networks in Proteins". *International Journal of Biological Macromolecules* 48, n° 4 (maio de 2011): 540–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.008>.
- 39- Hansen, Paul R., e Alberto Oddo. "Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis". In *Peptide Antibodies*, organizado por Gunnar Houen, 1348:33–50. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2015. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_5.
- 40- Pires, Diego Arantes Teixeira, Marcelo Porto Bemquerer, e Claudia Jorge do Nascimento. "Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis". *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 20, n° 1 (março de 2014): 53–69. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9366-8>.
- 41- Subirós-Funosas, Ramon, Rafel Prohens, Rafael Barbas, Ayman El-Faham, e Fernando Albericio. "Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion ^[1]". *Chemistry - A European Journal* 15, n° 37 (21 de setembro de 2009): 9394–9403. <https://doi.org/10.1002/chem.200900614>.
- 42- Chan, W. e White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, 2000.
- 43- Costa SR. Prospecção, síntese e aplicação de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) da peçonha de *Bothrops sp.* Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2019.
- 44- Fmoc SPPS Protocols for Cysteine-Containing Peptides – Sigma Aldrich.

- 45- Jadaun, Gaurav Pratap Singh, Shruti Dixit, Vandana Saklani, Sanjay Mendiratta, Renu Jain, e Surinder Singh. "HPLC for Peptides and Proteins: Principles, Methods and Applications". *Pharmaceutical Methods* 8, nº 1 ([s.d.]): 6.
- 46- Maupetit, J., P. Derreumaux, e P. Tuffery. "PEP-FOLD: An Online Resource for de Novo Peptide Structure Prediction". *Nucleic Acids Research* 37, nº Web Server (1º de julho de 2009): W498–503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp323>.
- 47- Maia, Rosangela A., Gustavo Ventorim, e Augusto Batagin-Neto. "Reactivity of Lignin Subunits: The Influence of Dehydrogenation and Formation of Dimeric Structures". *Journal of Molecular Modeling* 25, nº 8 (agosto de 2019): 228. <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4130-4>.
- 48- Martínez, Ana, Miguel A. Rodríguez-Gironés, Andrés Barbosa, e Miguel Costas. "Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins". *The Journal of Physical Chemistry A* 112, nº 38 (25 de setembro de 2008): 9037–42. <https://doi.org/10.1021/jp803218e>.
- 49- Cantú, Marcelo Delmar, Emanuel Carrilho, Nelson Arno Wulff, e Mario Sérgio Palma. "Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático". *Química Nova* 31, nº 3 (2008): 669–75. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300034>.
- 50- Steen, Hanno, e Matthias Mann. "The Abc's (and Xyz's) of Peptide Sequencing". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, nº 9 (setembro de 2004): 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>.
- 51- Maupetit, Julien, Philippe Derreumaux, e Pierre Tufféry. "A Fast Method for Large-Scale De Novo Peptide and Miniprotein Structure Prediction". *Journal of Computational Chemistry*, 2009, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21365>.
- 52- Yang, Xinwang, Ying Wang, Yue Zhang, Wen-Hui Lee, e Yun Zhang. "Rich Diversity and Potency of Skin Antioxidant Peptides Revealed a Novel Molecular Basis for High-Altitude Adaptation of Amphibians". *Scientific Reports* 6, nº 1 (abril de 2016): 19866. <https://doi.org/10.1038/srep19866>.
- 53- Trujillo, Madia, Beatriz Alvarez, e Rafael Radi. "One- and Two-Electron Oxidation of Thiols: Mechanisms, Kinetics and Biological Fates". *Free Radical Research* 50, nº 2 (fevereiro de 2016): 150–71. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1089988>.
- 54- Sannasimuthu, Anbazahan, e Jesu Arockiaraj. "Intracellular Free Radical Scavenging Activity and Protective Role of Mammalian Cells by Antioxidant Peptide from Thioredoxin Disulfide Reductase of *Arthrospira Platensis*". *Journal of Functional Foods* 61 (outubro de 2019): 103513. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103513>.
- 55- Plácido, Alexandra, João Bueno, Eder A. Barbosa, Daniel C. Moreira, Jhones do Nascimento Dias, Wanessa Felix Cabral, Patrícia Albuquerque, et al. "The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra Salamandra*)". *Biomolecules* 10, nº 4 (27 de março de 2020): 512. <https://doi.org/10.3390/biom10040512>.

56- Aquilano, Katia, Sara Baldelli, e Maria R. Ciriolo. "Glutathione: New Roles in Redox Signaling for an Old Antioxidant". *Frontiers in Pharmacology* 5 (26 de agosto de 2014). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00196>.