

**Estudo do peptídeo-C da proinsulina e de peptídeos oriundos da sua região C-terminal por ressonância magnética nuclear.**

**Daniel Ferreira Silva**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências: Física Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt  $\alpha$

**USP/IFSC/SBI**

São Carlos - 2005



**8-2-001708**

**IFSC-USP** SERVIÇO DE BIBLIOTECA  
DE SÃO CARLOS

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IFSC - SBI
CLASS.....
CUTTER.....
TOMBO...1108.....

Silva, Daniel Ferreira

“Estudo do peptídeo-C da proinsulina e de peptídeos oriundos da sua região C-terminal por ressonância magnética nuclear”

Daniel Ferreira Silva – São Carlos, 2005

Dissertação (Mestrado) – Área de Física Aplicada do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

2005 - Páginas: 120

Orientador: Prof. Dr. Richard Charles Garratt

1. Ressonância magnética; 2. Peptídeos; 3. Proinsulina

I. Título



**MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO DE DANIEL FERREIRA SILVA, APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO, EM 21/09/2005.**

**COMISSÃO JULGADORA:**

**Prof. Dr. Richard Charles Garratt (Orientador e Presidente) – IFSC/USP**

**Profa. Dra. Ana Paula Valente Lacerda de Almeida – UFRJ**

**Dr. Luiz Alberto Colnago – EMBRAPA**

"O Amor não é um ato de fé. É um sentimento que temos e devemos cultivar constantemente para que Ele exista."

Daniel F. Silva

A meu papai Tarzan, mamãe Jane e meus irmãos Lucas e Thiago pelo sacrifício, compreensão e amor. A minha nova família que está por surgir...

## **Agradecimentos**

- À pesquisadora Dra. Claudia Elisabeth Munte pela incansável paciência, consideração, amizade e orientação, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.
- Ao Prof. Dr. Richard Charles Garrat pela coragem, confiança e apoio incondicional a este trabalho.
- Aos colegas e amigos da sala 08 e do IFSC.
- À Profa. Dra. Ana Paula Valente e aos colegas do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear – CNRMN - UFRJ - Rio de Janeiro.
- À Dra. Telma Pertinhes e a Maurício pelo apoio ao trabalho.
- A todas as pessoas que não participaram diretamente desse trabalho, mas foram importantes para mim para a conclusão dessa dissertação.

## Resumo

O peptídeo-C da proinsulina foi considerado, por muito tempo, apenas um subproduto da síntese de insulina e sem nenhuma atividade fisiológica. A ele era atribuída apenas a função do correto enovelamento da insulina madura. Estudos recentes em pacientes diabéticos e em modelos animais tem demonstrado, porém, que o peptídeo-C possui uma função fisiológica ativa, possivelmente via interação com um receptor acoplado a uma proteína-G presente em alvos de membranas celulares. Esses resultados recuperaram o interesse na estrutura da molécula, tendo sido demonstrado que a parte mais ordenada do peptídeo-C humano, de 31 resíduos, é seu pentapeptídeo C-terminal, uma região capaz de, sozinha, elucidar muitas das respostas celulares atribuídas à molécula inteira.

No presente trabalho, quatro peptídeos de diferentes comprimentos (respectivamente 8, 7, 6 e 5 resíduos), correspondendo à região C-terminal do peptídeo-C humano, e um correspondendo ao heptapeptídeo final do peptídeo-C do rato, foram estudados usando técnicas de RMN. Todos os espectros foram medidos em 50% TFE / 50% H<sub>2</sub>O, a várias temperaturas dentro do intervalo de 277-303 K, e analisados quanto à presença de estruturas estáveis ou tendências conformacionais, particularmente com respeito à presença de pontes de hidrogênio características de voltas- $\beta$  ou - $\alpha$ . O critério usado para avaliar cada peptídeo incluiu a presença de ROEs característicos de voltas, os valores das constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  e a dependência tanto do deslocamentos químico quanto da intensidade dos picos com a temperatura.

Todos os peptídeos mostraram evidências da formação de voltas reversas, apesar de apresentarem padrões complexos e variações consideráveis entre si. Em nenhum deles foi observado o padrão característico da região C-terminal previamente descrita para o peptídeo-C, sugerindo que essa região não é uma entidade autônoma. A característica mais conservada é a presença provável de uma ponte de hidrogênio envolvendo a carbonila da G<sub>28</sub> e o amido da cadeia principal da Q<sub>31</sub>. Tal suposição é consistente com a conservação da intensidade do pico do próton amídico da cadeia principal da Q<sub>31</sub> com a temperatura. Existe, também, a possibilidade de que o amido da cadeia principal da Q<sub>31</sub> esteja envolvido em uma volta- $\alpha$  com a carbonila do E<sub>27</sub>, conforme observado no peptídeo-C completo.

O peptídeo derivado da região C-terminal do peptídeo-C do rato mostrou um maior número de ROEs do que o correspondente peptídeo humano, além de apresentar várias características únicas. Esses dados sugerem que o peptídeo do rato possa ter uma tendência em adotar uma conformação diferente de seu correspondente humano, uma observação coerente com a especificidade da seqüência do peptídeo-C conforme evidenciada pelos experimentos de reação cruzada.

## Abstract

The C-peptide of pro-insulin has long been considered a by-product of insulin synthesis with no physiological activity. It was believed only to have a role in aiding in the correct folding of the mature insulin molecule. Recent studies however, in diabetic patients and in animal models, have demonstrated that the C-peptide may play a more active physiological role, conceivable via interaction with a G-protein coupled receptor present in target cell membranes. These results have rekindled interest in the structure of the molecule and it has been shown that the most ordered part of the 31-residue human C-peptide is its C-terminal pentapeptide, a region which is alone able to elicit many of the cellular responses attributed to the entire molecule.

In the present work, four peptides of different length (8, 7, 6 and 5 residues respectively), corresponding to the C-terminal region of the human C-peptide and one corresponding to the final heptapeptide of rat C-peptide were studied using NMR techniques. All spectra were measured in 50% TFE / 50% H<sub>2</sub>O at various temperatures within the range 283-303K and analyzed for the presence of stable structures or conformational tendencies, particularly with respect to the presence of hydrogen bonds characteristic of  $\beta$ - or  $\alpha$ -turns. The criteria used to assess each peptide included the presence of ROEs characteristic of reverse turns, the absolute values of the  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  coupling constants and the temperature dependence of both chemical shifts and peak intensity.

All peptides show evidence for the formation of reverse turns although the pattern is complex and varies considerably as a function of the peptide. None show all of the hallmarks of the previously described C-terminus of the C-peptide, suggesting that the C-terminal region is not an autonomous entity. The most conserved feature is the likely presence of a hydrogen bond involving the carbonyl of G<sub>28</sub> and the backbone amide of Q<sub>31</sub>, consistent with the general conservation of the peak height of the latter as a function of temperature. It is also possible that the backbone amide of Q<sub>31</sub> is involved in an  $\alpha$ -turn with the carbonyl of E<sub>27</sub>, as observed in the full C-peptide.

The peptide derived from the C-terminal region of rat C-peptide shows a greater number of ROEs than the corresponding human peptide and presents several unique features. These data seem to suggest that the rat peptide may have a tendency to adopt a different conformation to its human counterpart, an observation which is coherent with the known sequence specificity of C-peptides as evidenced by cross-reaction experiments.



# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes .....	2
1.2. O Peptídeo-C.....	3
1.2.1. Efeito nos níveis de $Ca^{+2}$ intracelular e na MAP quinase.....	5
1.2.2. Efeitos na atividade $Na^+$ , $K^+$ -ATPase e na liberação de Oxido Nítrico .....	5
1.2.3. Fragmentos do peptídeo-C: Região C-terminal .....	7
1.3. Estrutura e conformação de peptídeos .....	9
1.3.1. Voltas .....	10
1.3.2. Classificação de voltas- $\beta$ .....	12
1.4. Espectroscopia por RMN em peptídeos.....	13
1.4.1. O experimento 1-D .....	14
1.4.2. O experimento 2-D .....	15
1.4.3. Aquisição e processamento dos dados do espectrômetro .....	19
1.4.4. Estrutura de pequenas proteínas e peptídeos .....	20
1.4.5. RMN e o estudo estrutural de pequenos peptídeos lineares .....	26
1.5. Objetivos.....	30
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>31</b>
2.1. Preparação das amostras .....	31
2.2. Medidas de RMN.....	32
2.2.1. Espectrômetro Bruker DRX-600: CNRMN-Rio de Janeiro .....	33
2.2.2. Espectrômetro Varian INOVA 500: LNLS-Campinas.....	34
2.2.3. Espectrômetro Bruker DRX 500: Universidade de Regensburg, Alemanha.....	34
2.2.4. Espectrômetro Bruker DRX-600: Universidade de Regensburg, Alemanha .....	35
2.3. Processamento de dados e visualização dos espectros 1-D .....	35
2.4. Processamento de dados e visualização dos espectros 2-D .....	35
<b>3. Resultados e discussão .....</b>	<b>37</b>
3.1. Pep1: LALEGLSQ.....	37

3.1.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidências de voltas.....	37
3.1.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos.....	40
3.1.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura .....	41
3.1.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura:.....	42
3.1.5. Constantes de acoplamento $^3J_{NH\alpha}$ .....	42
3.1.6. Discussão do Pep1 .....	44
3.2. Pep2: ALEGSQ .....	44
3.2.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas .....	44
3.2.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos.....	47
3.2.3. Experimentos 1-D de RMN e sua variação com a temperatura.....	48
3.2.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura.....	49
3.2.5. Constantes de acoplamento $^3J_{NH\alpha}$ .....	49
3.2.6. Discussão do Pep2 .....	51
3.3. Pep3: LEGSLQ .....	51
3.3.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas .....	51
3.3.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos.....	54
3.3.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura .....	55
3.3.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura.....	55
3.3.5. Constantes de acoplamento $^3J_{NH\alpha}$ .....	57
3.3.6. Discussão do Pep3 .....	57
3.4. Pep4: EGSLQ .....	57
3.4.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas .....	58
3.4.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos.....	60
3.4.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura .....	61
3.4.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura.....	61
3.4.5. Constantes de acoplamento $^3J_{NH\alpha}$ .....	61
3.4.6. Discussão do Pep4 .....	63
3.5. Pep5: ALEVARQ .....	63
3.5.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas .....	63
3.5.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos.....	66

3.5.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura .....	67
3.5.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura.....	69
3.5.5. Constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ .....	69
3.5.6. Discussão do Pep5 .....	69
3.6. Peptídeo-C humano: região C-terminal .....	70
3.6.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas .....	70
3.6.2. Variação do deslocamento químico .....	71
3.6.3. Discussão do peptídeo-C humano .....	73
<b>4. Discussão e conclusão.....</b>	<b>74</b>
<b>5. Referências .....</b>	<b>80</b>

<b>Anexo I:</b> Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ para a amostra Pep1 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0). .....	I
<b>Anexo II:</b> Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ para a amostra Pep2 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).....	II
<b>Anexo III:</b> Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ para a amostra Pep3 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).....	III
<b>Anexo IV:</b> Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ para a amostra Pep4 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).....	IV
<b>Anexo V:</b> Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$ para a amostra Pep5 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).....	V
<b>Anexo VI:</b> Deslocamentos químicos $^1\text{H}$ no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE-d2 (600 MHz, 283 K, pH=7,0), relativos ao DSS. Valores retirados da tese de doutorado de Claudia Munte (2001).....	VI
<b>Anexo VII:</b> Deslocamentos químicos $^1\text{H}$ no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE-d2 (600 MHz, 298 K, pH=7,0), relativos ao DSS.....	VIII
<b>Anexo VIII:</b> Deslocamentos químicos $^1\text{H}$ no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE-d2 (500 MHz, 303 K, pH=7,0), relativos ao DSS.....	X

<b>Apêndice A: O fenômeno de ressonância magnética .....</b>	<b>A1</b>
A.1. Espectroscopia por RMN .....	A2
A.2. Saturação e relaxação da magnetização .....	A3
A.3. Mecanismos de relaxação: .....	A4
A.4. Variação da magnetização: equações de Bloch .....	A5
A.5. Deslocamento químico.....	A9
A.6. Espectroscopia por transformada de Fourier: O <i>FID</i> .....	A10
A.6.1. Domínio da frequência e domínio do tempo: pulsos de <i>r.f.</i> .....	A11
A.7. Forma da linha de ressonância .....	A12
A.8. Mecanismo de troca e escala de tempo.....	A12
A.9. “Medida” das distâncias nucleares com RMN: O NOE .....	A14
A.10. Acoplamento escalar ou spin-spin .....	A19
<b>Apêndice B: Instrumentação de RMN: .....</b>	<b>B1</b>

## Figuras

- Figura 1: Clivagem da proinsulina em insulina e peptídeo-C.....3
- Figura 2: Seqüência de aminoácidos do peptídeo-C em várias espécies. Em azul, destaque para os 8 últimos resíduos da região c-terminal.....4
- Figura 3: Classificação de peptídeos segundo sua estrutura secundária.....10
- Figura 4: Estéreo desenhos de exemplos de voltas- $\beta$  com destaque para a distância entre  $C^{\alpha}_i$  e  $C^{\alpha}_{i+3}$  menor que 7 Å. Extraído da referência [36].....13
- Figura 5: Esquema de um experimento de RMN pulsado.....15
- Figura 6: Esquema mostrando a construção da segunda dimensão, com a inclusão do tempo de evolução  $t_1$  e do período de mistura. Extraído da referência [50].....16
- Figura 7: Dependência do NOE/ROE para um sistema homonuclear de dois spin isolados como função do tempo de correlação molecular  $\tau_c$  e da frequência angular dos spin  $\omega_0$ .....19
- Figura 8: Sobreposição do espectro COSY, em azul, com o espectro TOCSY, em vermelho, do pentapeptídeo EGSLQ. Apenas a região de correlação entre prótons HN e os prótons restantes do resíduo é mostrada. As legendas em preto indicam picos comuns aos dois espectros.....20
- Figura 9: Assinalamento seqüencial. Em azul estão as conexões TOCSY, e em vermelho as conexões ROESY da região do fingerprint. As linhas mais grossas representam o caminho do assinalamento seqüencial e as legendas em preto identificam as conexões entre os prótons da cadeia principal dos resíduos.....22
- Figura 10: Exemplo ideal de volta- $\beta$  tipo I e tipo II. São mostradas as conexões  $^1H-^1H$  relevantes. Figura adaptada da referência [56].....28
- Figura 11: Padrão de ROE para elementos de estrutura secundária. A largura da linha é proporcional à intensidade dos ROEs correspondentes. Figura tirada da referência [56]..29
- Figura 12: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep1. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.....38

- Figura 13: Espectro ROESY da região *fingerpint* do Pep1. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.....39
- Figura 14. Espectro TOCSY do Pep1 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerpint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.....41
- Figura 15: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep1: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (c) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....42
- Figura 16: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep1. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....43
- Figura 17: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep2. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600MHz.....45
- Figura 18: Espectro ROESY da região *fingerpint* do Pep2. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.....46
- Figura 19. Espectro TOCSY do Pep2 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerpint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.....47
- Figura 20: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep2: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (c) próton amino do glutamina<sub>31</sub>.....49
- Figura 21: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep2. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....50

- Figura 22: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep3. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.....52
- Figura 23: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep3. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.....53
- Figura 24. Espectro TOCSY do Pep3 em 283 K. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.....54
- Figura 25: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep3: (a) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (b) próton amino da serina<sub>29</sub>; (c) próton amino da leucina<sub>30</sub>; (d) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....55
- Figura 26: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep3. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....56
- Figura 27: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep4. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.....58
- Figura 28: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep4. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.....59
- Figura 29: Espectro TOCSY do Pep4 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.....60
- Figura 30: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep4: (a) próton amino da serina<sub>29</sub>; (b) próton amino da leucina<sub>30</sub>; (c) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....61

- Figura 31: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep4. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....62
- Figura 32: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep5. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600MHz.....64
- Figura 33: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep5. As legendas em vermelho são as restrições consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.....65
- Figura 34. Espectro TOCSY do Pep5 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.....66
- Figura 35: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep5: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da valina<sub>28</sub>; (c) próton amino da alanina<sub>29</sub>; (d) próton amino da arginina<sub>30</sub>; (e) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....67
- Figura 36: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep5. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.....68
- Figura 37: Diferença dos deslocamentos químicos com relação aos valores tabelados [56] para os prótons H $\alpha$  e HN (cadeia principal) do peptídeo-C humano em 283 K (azul), 298 K (vinho) e 303 K (amarelo).....72
- Figura A1: À esquerda temos o espectro <sup>1</sup>H RMN a várias temperaturas da BPTI em D<sub>2</sub>O (0.01 M, pH7.8; 360MHz). À direita temos a simulação desse espectro. A região de 6.0 até 8.5 ppm é mostrada. Nesta figura pode-se ver o efeito da taxa de troca no espectro. A troca ocorre com o giro do anel aromático; os números correspondem aos prótons do anel. Extraído da referência [56].....A14
- Figura A2: Espectro A esquerda temos o gráfico da variação da função densida espectral, em função de  $\omega$ , para vários valores do tempo de correlação  $\tau_c$  A direita temos a variação



- de  $T_1$  com  $\tau_c$ . Notar a correspondência de linhas nos dois diagramas. Extraído da referência [75].....A14
- Figura B1: Esquema experimental de um espectrômetro.....B1
- Figura B2: Esquema experimental para detecção em quadratura. O sinal recebido pelo probe e pré-amplificado é separado em dois canais paralelos. O sinal em cada canal é misturado com um sinal de referência, filtrado com um áudio-filtro passa-baixa, e digitalizado. A componente real (coseno-modulado) e a imaginária (seno-modulado) são obtidas por deslocamento da fase relativa ao sinal de referência por  $90^\circ$ . Extraído da referência [75].....B4

## Tabelas

Tabela 1: Ângulos torcionais da cadeia principal de voltas- $\beta$ .....	12
Tabela 2: Padrão de distância em estruturas enoveladas e não enoveladas.....	28
Tabela 3: Experimentos de RMN realizados nas amostras.....	33
Tabela 4: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep1.....	40
Tabela 5: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep2.....	47
Tabela 6: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep3.....	54
Tabela 7: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep4.....	60
Tabela 8: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep5.....	66
Tabela 9: Restrições úteis para a verificação de voltas no pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano.....	71

## Abreviações e Siglas

1-D, 2-D, 3-D,4-D	Uni-, bi-, tri-,quadri-dimensional
AURELIA	Automatic resonance line assignment
CD	Circular dichroism spectroscopy
CNS	Crystallography and NMR system
COSY	Correlated spectroscopy
DQF	Double-quantum-filter
DSS	Sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate
FID	Free induction decay
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
RMN ou NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NOE	Nuclear Overhauser enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser-effect spectroscopy
ROESY	Rotational Nuclear Overhauser-effect spectroscopy
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TPPI	Time-propotional phase-incrementation

## Símbolos

$B_0$	Amplitude do campo magnético estático
$B_1$	Amplitude do campo magnético de rádio-freqüência
$B_{rf}(t)$	Campo magnético de rádio-freqüência
$\mathbf{B}(t)$	Vetor de campo magnético
Da	Dalton (1 Da = massa de um átomo de $^1\text{H}$ )
$\delta$	Deslocamento químico (ppm)
$\Delta B_0$	Amplitude do campo magnético reduzido
$\Delta t$	Intervalo de tempo
$E$	Energia
$\gamma$	Fator giromagnético
$h=2\pi\hbar$	Constante de Planck
$I$	Número quântico de momento angular de spin
$\mathbf{I}$	Vetor de momento angular
$I_z$	Componente $z$ do vetor de momento angular
$J(\omega)$	Função de densidade espectral
${}^N J_{IJ}$	acoplamento escalar de $n$ -ligações, entre o spin $I$ e o spin $j$
$K_B$	Constante de Boltzmann
$M$	Número quântico magnético
$M_0$	Magnetização no equilíbrio
$\mathbf{M}(T)$	Vetor de magnetização
$\boldsymbol{\mu}$	Vetor de momento magnético
$\mu_0$	Permissividade do vácuo
$\mu_z$	Componente $z$ do vetor de momento magnético

$\nu_0$	Frequência de ressonância de Larmor em Hertz
$\omega$	Velocidade angular
$\omega_0$	Frequência angular de ressonância de Larmor
$\omega_{RF}$	Frequência angular do campo de rf
$\Omega$	“offset” do campo estático reduzido
pH	$-\log a(\text{H}^+)$ (a = Atividade)
$R_1$	Taxa de relaxação longitudinal ou spin-rede
$R_2$	Taxa de relaxação transversal ou spin-spin
$S(\omega)$	Sinal no domínio da frequência
$S(t_2, t_1)$	Sinal no domínio do tempo
$\sigma$	Blindagem nuclear isotrópica
$T_1$	Tempo de relaxação longitudinal ou spin-rede
$T_2$	Tempo de relaxação transversal ou spin-spin
$\tau_c$	Tempo de correlação

# 1. Introdução

Desde o século XVIII, com os estudos taxionômicos iniciais de *Lineu*, a biologia moderna vem estudando e classificando os seres vivos do ponto de vista morfológico e fisiológico de seus componentes básicos. Com o advento de novas técnicas de investigação, esse horizonte expandiu-se para o nível celular, com a microscopia óptica e eletrônica, e molecular, com técnicas espectroscópicas (ressonância magnética, dicroísmo circular, fluorescência, infravermelho, etc) e de difração de raios-X. Essas técnicas permitem descrever e classificar as estruturas dos seres vivos em nível molecular, possibilitando, também, uma melhor compreensão da função das biomoléculas na manutenção da vida nos seres vivos.

Essa nova biologia, que nasceu em meados do século XX com a solução estrutural por métodos de difração de raios-X das moléculas de ADN [1] e de hemoglobina [2] cristalizadas, recebeu o nome de Biologia Molecular Estrutural. Com isso, percebeu-se, de fato, que muito da função dessas biomoléculas relaciona-se com a sua estrutura tridimensional, sendo fortemente dependente da seqüência de aminoácidos (em proteínas) ou nucleotídeos (em ácidos nucléicos).

A compreensão funcional das biomoléculas e de seus mecanismos, do ponto de vista molecular, está fornecendo novas abordagens na busca do tratamento de doenças e da cura, no aperfeiçoamento racional de espécies para fim específico (organismos geneticamente modificados - OGM) e na pesquisa de novos materiais e dispositivos (chips de ADN). Esses novos campos de trabalho são conhecidos como Química Medicinal ou Planejamento Racional de Fármacos, Engenharia Genética, Engenharia de Proteínas e Nano Biotecnologia.

## 1.1. Diabetes

O número de vítimas de diabetes, segundo a Organização Mundial de Saúde, somava 30 milhões de pessoas em 1985, passou a 80 milhões em 1990, e hoje, esse número está em 170 milhões de pessoas. Muitos pacientes que padecem desse mal (dependendo da sua forma) precisam receber doses diárias de insulina, para que a glicose proveniente dos alimentos possa ser absorvida pelas células do corpo. Portanto, esse hormônio, a insulina, tem um papel central na regulação do metabolismo. Esse foi o primeiro peptídeo, ou hormônio, a ser descoberto [3], ter sua seqüência de aminoácidos determinada [4, 5], sua estrutura tridimensional resolvida com resolução atômica [6], ser quimicamente sintetizado [7, 8], ter identificada a presença de um precursor [9], ser clonado [10] e expresso por bactérias geneticamente modificadas [11]. Em paralelo a esses trabalhos, poucos estudos foram feitos com seu precursor, a proinsulina, e seu outro derivado, o peptídeo de conexão, ou simplesmente peptídeo-C. Essa ausência de trabalhos, principalmente para o peptídeo-C, justificou-se por não ter sido encontrada uma atividade biológica nesses estudos iniciais realizados conjuntamente com a insulina [12]. Porém, a partir de 1992, diversos trabalhos identificaram uma atividade biológica do peptídeo-C, sendo este considerado atualmente um hormônio-peptídico ativo, participando da regulação do metabolismo e contribuindo na prevenção e/ou retardamento de complicações, a longo prazo, em pacientes *diabetes mellitus tipo I* [13].

O interesse deste trabalho é fundamentado nessas evidências de que o peptídeo-C ameniza as complicações de ratos diabéticos-induzidos, melhora a saúde de pessoas *diabetes mellitus tipo I* e, principalmente, liga-se especificamente em alvos celulares, o mesmo ocorrendo com fragmentos oriundos da região C-terminal [13]. Diversos dados sugerem que a região C-terminal possa ser um 'sítio ativo' do peptídeo-C, responsável pela atividade fisiológica do mesmo. Assim, utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear, pretendemos estudar as propriedades conformacionais da região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana e do rato.

## 1.2. O Peptídeo-C

O peptídeo-C é gerado a partir do precursor, a proinsulina, sintetizada nas células- $\beta$  das Ilhotas de Langerhans. A proinsulina é rapidamente convertida em proinsulina, através da remoção do peptídeo sinal, ainda no retículo endoplasmático rugoso. Com a passagem pelo complexo de Golgi, se inicia a clivagem proteolítica para gerar o peptídeo-C e a insulina (composta de duas cadeias A e B). Ambos são armazenados em grânulos secretores sendo, eventualmente, lançados na corrente sanguínea em quantidades equimolares. Na biosíntese da insulina e do peptídeo-C (figura 1), duas endopeptidase (proteases ligadas a membranas), pró-hormônio convertases 2 e 3 (PC2 e PC3) clivam a molécula de proinsulina em dois sítios marcados por pares de aminoácidos básicos [14]. A endopeptidase tipo-I (PC3) cliva no sítio da Arg<sub>31</sub>-Arg<sub>32</sub>, a junção B/C da cadeia da proinsulina e a segunda endopeptidase (PC2) cliva o sítio Lys<sub>64</sub>-Arg<sub>65</sub>, a junção C/A. Ambas as enzimas são dependentes de cálcio e possuem um pH ótimo em meio ácido [14]. A enzima carboxil peptidase H subsequêntemente remove os pares de aminoácidos básicos tanto do novo C-terminal da cadeia B quanto da cadeia C, gerando assim a insulina e peptídeo-C maduros.

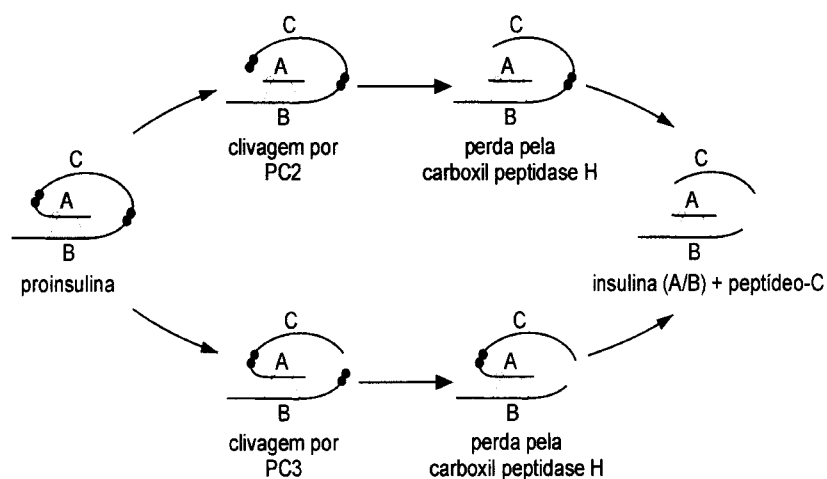


Figura 1: Clivagem da proinsulina em insulina e peptídeo-C.



Pessoas diabéticas dependentes de insulina não recebem o peptídeo-C. Nestes pacientes são observadas várias complicações ao longo do tempo [15], sugerindo que o peptídeo-C possui uma função fisiológica importante. Atualmente, há evidências de um mecanismo de ação específico do peptídeo-C, envolvendo principalmente o pentapeptídeo C-terminal. Tais evidências foram obtidas de uma série de estudos celulares, fisiológicos, bioquímicos e estruturais [13, 16].

A figura 2 mostra um alinhamento entre peptídeos-C de algumas espécies. Em negrito estão destacados os resíduos conservados. Apesar da variabilidade nas seqüências alguns aspectos são conservados, incluindo uma concentração de aminoácidos ácidos no N-terminal, uma região rica em glicinas no centro da molécula e um ácido glutâmico e uma glutamina que definem o início e o fim do pentapeptídeo C-terminal. Os peptídeos denominados por Pep1, Pep2, Pep3, Pep4 e Pep5 se referem à região C-terminal do peptídeo-C e constituem os objetos de estudo desta dissertação.

	1		6		11		16		21		26		31																						
Humano	E	A	E	D	L	Q	V	G	Q	V	E	L	G	G	G	P	G	A	G	S	L	Q	P	L	A	L	E	G	S	L	Q				
Macaco	E	A	E	D	P	Q	V	G	Q	V	E	L	G	G	G	P	G	A	G	S	L	Q	P	L	A	L	E	G	S	L	Q				
Porquinho da índia	E	L	E	D	P	Q	V	E	Q	T	E	L	G	M	G	L	G	A	G	G	L	Q	P	L	A	L	E	M	A	L	Q				
Cachorro	E	V	E	D	L	Q	V	R	D	V	E	L	A	G	A	P	G	E	G	G	L	Q	P	L	A	L	E	G	A	L	Q				
Rato I	E	V	E	D	P	Q	V	P	Q	L	E	L	G	G	G	P	E	A	G	D	L	Q	T	L	A	L	E	V	A	R	Q				
Rato II	E	V	E	D	P	Q	V	A	Q	L	E	L	G	G	G	P	G	A	G	D	L	Q	T	L	A	L	E	V	A	R	Q				
Ovelha	E	V	E	G	P	Q	V	G	A	L	E	L	A	G	G	P	G	A	G	G							L	E	G	P	Q				
Boi	E	V	E	G	P	Q	V	G	A	L	E	L	A	G	G	P	G	A	G	G							L	E	G	P	Q				
Porco	E	A	E	N	P	Q	A	G	A	V	E	L	G	G	G	L	G				L	Q	A	L	A	L	E	G	P	P	Q				
<i>pep1</i>																											L	A	L	E	G	S	L	Q	Q
<i>pep2</i>																											A	L	E	G	S	L	Q	Q	
<i>pep3</i>																											L	E	G	S	L	Q	Q		
<i>pep4</i>																											E	G	S	L	Q	Q			
<i>pep5</i>																											A	L	E	V	A	R	Q		

Figura 2: Seqüência de aminoácidos do peptídeo-C em várias espécies. Em azul, destaque para os oito últimos resíduos da região c-terminal.

Durante muito tempo acreditou-se que a função do peptídeo-C era meramente passiva, no sentido de ser uma peça fundamental para o enovelamento correto da proinsulina. Assim, a sua função biológica seria apenas de permitir o processamento adequado da proinsulina para liberar a insulina madura, sendo então considerado um subproduto da síntese do hormônio principal, a insulina [12]. Porém, mais recentemente foi descrito que o peptídeo-C, quando administrado em concentrações fisiológicas, melhora a função nervosa autônoma e renal [17], além de incrementar

o fluxo sanguíneo no músculo esquelético, a absorção de oxigênio e o transporte de glicose [18, 19]. O peptídeo-C também aumenta o fluxo sanguíneo do braço quando em repouso, o diâmetro arterial braquial e a função sistólica ventricular esquerda em pacientes com *diabetes mellitus* tipo I [20]. Também foram verificados efeitos agudos da função microvascular cutânea [21]. Todos estes dados indicam uma função fisiológica ativa para o peptídeo-C, que deixaria de ser apenas um auxiliar no enovelamento da proinsulina. Em busca de caminhos bioquímicos, e uma melhor compreensão da atividade do peptídeo-C, foi realizado um conjunto de experimentos a partir de 1992 até o momento atual. Alguns deles estão descritos a seguir.

### **1.2.1. Efeito nos níveis de $\text{Ca}^{+2}$ intracelular e na MAP quinase**

Foi demonstrado que tanto o peptídeo-C quanto seu pentapeptídeo C-terminal induzem um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  [22, 23] e que este efeito deve-se a um aumento no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular [22]. A inclusão da toxina de pertussis nos ensaios abole o efeito, sugerindo pela primeira vez que o mecanismo envolve um receptor acoplado a uma proteína-G [23]. Pouco, porém, é conhecido a respeito dos detalhes da via de sinalização. Alguns estudos demonstram que o peptídeo-C também induz fosforilação em MAP (mitogen-activated protein) quinases, ERK 1 e 2 de fibroblastos 3T3 [24]. Novamente o efeito é abolido pela toxina de pertussis ou pelo inibidor de MAP quinase PD98059, indicando o envolvimento do peptídeo-C numa via de sinalização MAP quinase dependente.

### **1.2.2. Efeitos na atividade $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase e na liberação de Oxido Nítrico**

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* [22, 25-28] demonstraram uma atividade do peptídeo-C na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, comprometida em pacientes diabéticos insulino-dependentes. Em um estudo [22], segmentos tubulares renais do rato foram incubados com o peptídeo-C tipo I e II do rato. Em uma janela de concentração de 10-100 nM do peptídeo-C, observou-se um incremento de atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase dependente da concentração, podendo ser bloqueada com um pré-

tratamento dos segmentos tubulares com toxina de pertussis ou com a adição de FK 506, um inibidor específico da proteína  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-dependente fosfatase 2B. Esta enzima desfosforila a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, deixando-a na forma ativa, sugerindo que o peptídeo-C age via um mecanismo que envolve a fosfatase 2B. Esta hipótese é apoiada por experimentos de incubação de segmentos tubulares em meios sem  $\text{Ca}^{2+}$  que abole completamente o caminho de sinalização do peptídeo [22]. Em células tubulares renais humanas também foi verificada atividade semelhante da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, depois de exposta ao peptídeo-C humano [25, 26]. Finalmente, doses supra-fisiológicas de peptídeo-C humano também estimulam a atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase nos nervos ciático de ratos diabete induzidos, corrigindo parcialmente a redução da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase observada nestes animais [27, 28].

Células vermelhas de pacientes diabéticos tipo I mostram baixa atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e perda de plasticidade, sendo esta última característica recuperada expondo as células vermelhas ao peptídeo-C [29, 30]. Células vermelhas tratadas com inibidores específicos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase, como a ouabaina, impedem o efeito do peptídeo-C em restaurar a plasticidade destas células, coerente com os resultados descritos acima.

Estudos independentes indicam que o peptídeo-C também possui ação vasodilatadora, provavelmente estimulando a atividade da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS). Esse efeito pode ser diminuído com o uso de ligantes de cálcio, indicando que este provavelmente ocorre em função do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado pelo peptídeo-C em células endoteliais [31]. Além disso, o peptídeo-C estimula a dilatação das arteríolas em músculo esquelético através de um mecanismo mediado por óxido nítrico (NO) [32]. Isto é coerente com a observação de um aumento no fluxo sanguíneo em músculos tratados com o peptídeo [20]. Efeitos parecidos foram relatados também em rim, pele e nervos no estado diabético. Os autores sugeriram que este efeito possa contribuir para o aumento do fluxo do sangue na pele e no músculo, demonstrado, previamente, em ser humano.

A partir destes dados todos surgiu a hipótese de que o peptídeo-C ativa, via receptor acoplado a uma proteína G, um caminho intracelular dependente de  $\text{Ca}^{+2}$ , que envolve a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase junto com eNOS.

### 1.2.3. Fragmentos do peptídeo-C: Região C-terminal

Estudos recentes por espectroscopia de fluorescência demonstraram uma atividade do pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C em alvos celulares, destacando a importância do  $\text{Glu}_{27}$  [33, 34]. Nesses estudos, todos os resíduos do pentapeptídeo  $\text{E}_{27}\text{GSLQ}_{31}$  foram individualmente substituídos por alanina, sendo determinada a capacidade do peptídeo resultante em deslocar o peptídeo-C humano marcado com rodamina, em membranas celulares tubulares renais humanas. A substituição da  $\text{Gli}_{28}$  por alanina teve pouco efeito, e a reposição dos outros resíduos C-terminais teve efeitos intermediários. Já o ácido glutâmico livre teve uma capacidade de competição de 50% do peptídeo-C, enquanto a alanina livre, o peptídeo-C (resíduos 1-26) e o tetrapeptídeo  $\text{G}_{27}\text{SLQ}_{31}$  não mostraram capacidade de competir com o peptídeo-C humano. Os autores deste trabalho acreditam que o aminoácido carregado  $\text{Glu}_{27}$  modula a interação desta região C-terminal com o receptor (desconhecido) do peptídeo-C. Porém o peptídeo  $\text{E}_{27}\text{VARQ}_{31}$ , correspondendo à região C-terminal do peptídeo-C do rato não foi capaz de competir com o peptídeo-C humano, indicando que os demais resíduos do peptídeo, e não somente o  $\text{Glu}_{27}$ , podem modular a sua atividade [25, 27, 33]. Particularmente interessante é a diferença marcante entre os pentapeptídeos C-terminal de rato e humano, frente a células humanas, indicando especificidade na interação.

Em outros estudos, no caso, a atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase de segmentos tubulares renais do rato [25], tanto o tetrapeptídeo  $\text{V}_{28}\text{ARQ}_{31}$  e o pentapeptídeo  $\text{E}_{27}\text{VARQ}_{31}$  mimetizam a atividade de todo peptídeo-C do rato. Neste caso, portanto, a importância de  $\text{Glu}_{27}$  fica

questionável. Contudo, a relevância do Glu<sub>27</sub> pode ser uma consequência dos métodos utilizados serem diferentes. Já o pentapeptídeo E<sub>27</sub>GSLQ<sub>31</sub>, referente à região c-terminal do peptídeo-C humano, mimetiza 75% dessa atividade [25], novamente mostrando um grau de seletividade. Em suma, esses experimentos cruzados, de peptídeo-C do rato e fragmentos da região C-terminal do peptídeo-C humano em células do rato somadas a experimentos com peptídeo-C humano e fragmentos da região C-terminal do peptídeo-C do rato em células humanas, suportam a visão que o segmento C-terminal é um sítio ativo do peptídeo-C. Os autores suspeitam que a carga no Glu<sub>27</sub>, pelo menos no caso do peptídeo-C humano, possui um papel relevante para essa atividade, visto que, nesses estudos, este único aminoácido possui 50% da atividade do peptídeo-C [33].

Um trabalho recente [35] sobre a conformação do peptídeo-C em uma solução de 50% TFE / 50% H<sub>2</sub>O, analisada por ressonância magnética nuclear, também mostrou evidências de que o pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano possui uma ordenação maior do que o resto da cadeia. Na estrutura observada, os resíduos E<sub>27</sub>GSL<sub>30</sub> estão localizados na região  $\gamma_L$  do gráfico de Ramachandran, formando uma conformação volta- $\beta$  tipo III'. A presença do TFE nestes experimentos provavelmente diminui as pontes de hidrogênio do peptídeo-C com as moléculas da água, permitindo que as pontes passem a ser intramoleculares, provocando a estabilização da estrutura observada e indicando uma tendência estrutural para o peptídeo. Tais preferências podem ser indícios da conformação ativa que o peptídeo poderia assumir num micro-ambiente hidrofóbico, por exemplo, na hora de interagir com o seu receptor hipotético. Isso pode ocorrer no ambiente em que se encontram o(s) receptor(es) do peptídeo-C e de sua região C-terminal, possivelmente um receptor acoplado a uma proteína G. Interações ligante-receptor freqüentemente ocorrem sem a presença de moléculas de água na interface, o que permitiria esta região C-terminal iniciar sua estruturação para a ligação complementar ao receptor, de forma semelhante ao ambiente menos aquoso proporcionado

pela solução de 50% TFE / 50% H<sub>2</sub>O. Contudo, o desconhecimento desse receptor impede um estudo mais profundo dessa interação.

Há estudos com seqüências reversas do peptídeo-C, como também na forma de D-aminoácidos (enantio), sugerindo uma atividade que não depende de interações quirais com receptores estereoespecíficos ou sítios de ligação [27]. Também foi mostrado nesse mesmo estudo que fragmentos do peptídeo-C sem a região C-terminal, ou sem as porções C- e N-terminais, exerceram atividade similar ao peptídeo-C natural. Já o des(13-17) peptídeo-C não exerceu, no estudo, nenhuma atividade. A seqüência primária desta região mais central do peptídeo-C é altamente conservada nos mamíferos, coerente com a manutenção de uma atividade biológica para esta porção. Esse estudo indica a existência de um segundo mecanismo de ação do peptídeo-C, possivelmente por interações não quirais, não envolvendo a região C-terminal. Estudos de espectroscopia por fluorescência do peptídeo-C são compatíveis com a existência de pelo menos dois diferentes complexos receptor/peptídeo-C, um com baixa afinidade e alta mobilidade e outro com alta afinidade e baixa mobilidade [34].

### **1.3. Estrutura e conformação de peptídeos**

Classicamente o complexo assunto da estrutura protéica pode ser simplificado conforme uma nomenclatura hierárquica que passa desde a estrutura primária da molécula (a seqüência de aminoácidos ligados covalentemente) até a estrutura quaternária (que descreve a organização de subunidades em proteínas oligoméricas). No caso de peptídeos pequenos freqüentemente uma descrição apenas dos níveis da estrutura primária e secundária é suficiente.

A estrutura secundária da cadeia polipeptídica, onde um padrão definido de ângulos da cadeia principal  $\phi$  e  $\psi$  é observado, constitui os elementos ditos como regulares, ou

ordenados. As conformações restantes são caracterizadas como irregulares, ou não-ordenadas. Os elementos ordenados podem ser subdivididos em periódicos ou homo-confôrmeros, e, aperiódicos ou hetero-confôrmeros, segundo o esquema da figura 3:

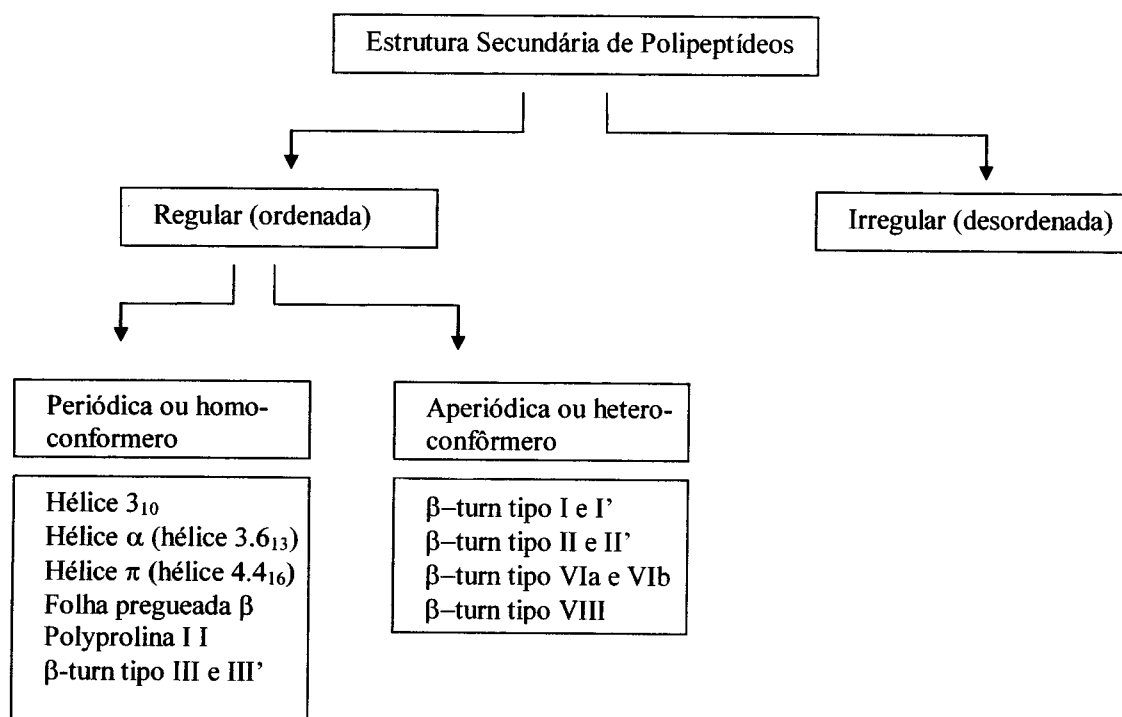


Figura 3: Classificação de peptídeos segundo sua estrutura secundária.

Nas estruturas periódicas, os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  dos resíduos seqüenciais possuem valores similares com pequenas alterações, em harmonia com a terminologia. Nas estruturas regulares aperiódicas e irregulares não há este padrão.

### 1.3.1. Voltas

No caso de peptídeos curtos os tipos de estrutura secundária regular possível são efetivamente limitados aos diversos tipos de volta, por causa do seu próprio tamanho. Existem, teoricamente, voltas- $\pi$  (composta por 6 resíduos), voltas- $\alpha$  (5 resíduos), voltas- $\beta$  (4 resíduos), voltas- $\gamma$  (3 resíduos) e voltas- $\delta$  (2 resíduos), sendo que as voltas- $\beta$  são as mais

encontradas em estruturas protéicas [36]. Venkatachalam (1968) investigou a conformação de 3 unidades amídicas consecutivas identificando as voltas- $\beta$ , estabilizadas por pontes de hidrogênio [37]. Conforme a sua definição, quatro resíduos consecutivos ( $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$  e  $i+3$ ) formam uma volta- $\beta$  quando existe uma ponte de hidrogênio entre a carbonila do resíduo  $i$  e o próton amino do resíduo  $i+3$ . Assim sendo, as voltas- $\beta$  são responsáveis pela existência de uma dobra na cadeia polipeptídica, resultando em uma mudança de sentido em  $\sim 180^\circ$ . Venkatachalam sugeriu uma nomenclatura para os diversos tipos de volta- $\beta$ , baseada nos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  dos resíduos centrais ( $i+1$  e  $i+2$ ), classificando voltas- $\beta$  como sendo do tipo I, II e III e suas imagens especulares I', II' e III'. Estudos subsequentes [38-40], baseados em estruturas cristalográficas, mostraram que voltas- $\beta$  são comuns em proteínas, envolvendo 25% a 30% dos resíduos da molécula. Tais estudos identificaram, porém, que nem todo segmento que inverte o sentido da cadeia polipeptídica necessariamente possui uma ponte de hidrogênio, conforme previamente estipulado por Venkatachalam. Surgiu então uma segunda definição da volta- $\beta$ , mais abrangente, como sendo formada de 4 resíduos quaisquer onde a distância entre os carbonos- $\alpha$  do primeiro ( $i$ ) e do último ( $i+3$ ) resíduo da volta é menor que 7 Å (desde que o segmento não seja parte de uma hélice) [40]. Subseqüentemente foi proposta uma nomenclatura para voltas- $\beta$  baseada nas regiões do diagrama de Ramachandran [41], referindo-se à conformação da cadeia principal dos resíduos  $i+1$  e  $i+2$ . Por exemplo, uma volta tipo I seria definida como uma volta  $\alpha_R\text{-}\gamma_R$ .

Em 1972, Kuntz observou que voltas- $\beta$  consistem, predominantemente, de aminoácidos hidrofílicos, sendo encontradas próximas da superfície das proteínas, com suas cadeias laterais polares apontando para o solvente [42]. Além do papel fundamental das voltas em permitir a formação de uma estrutura globular pela inversão do sentido da cadeia, voltas são freqüentemente sugeridas como sendo bioativas: como ligantes, no reconhecimento imune, em modificações pós-



traducionais e outros processos de reconhecimento [43]. Posteriormente foi sugerido [44] que a presença da volta próxima a um sítio de reconhecimento possa ser acidental, originando-se do fato de que a superfície das proteínas é densamente populada por voltas, as quais carregam os grupos funcionais ativos. Dessa forma, o reconhecimento não seria uma propriedade da conformação (volta), e sim dos grupos laterais que favorecem a ligação intermolecular [44]. Também tem sido sugerido que voltas representam estruturas-sinais em sítios de clivagem em aminoácidos dibásicos de proteínas precursores [45, 46].

No fim da década de 1980, um número suficiente de dados estruturais de difração de raios-X por cristais de proteínas permitiu contabilizar a ocorrência dos 20 aminoácidos nos diversos tipos de volta. Para entender os resultados obtidos faz-se necessário uma descrição da conformação das voltas- $\beta$  mais comuns, dada a seguir.

### 1.3.2. Classificação de voltas- $\beta$

Uma descrição não ambígua de uma volta- $\beta$  exige a definição dos ângulos torcionais  $\phi_{i+1}$ ,  $\psi_{i+1}$  e  $\phi_{i+2}$ ,  $\psi_{i+2}$ , correspondentes ao segundo e terceiro resíduos da volta. Os valores ideais para esses ângulos podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1: Ângulos<sup>c</sup> torcionais da cadeia principal de voltas- $\beta$

Tipo de volta- $\beta$	Valor dos ângulos torcionais da cadeia principal				<sup>a</sup> $\tau$
	$\Phi_{i+1}$	$\Psi_{i+1}$	$\Phi_{i+2}$	$\Psi_{i+2}$	
I	-60	-30	-90	0	45
I'	60	30	90	0	-45
II	-60	120	80	0	1
II'	60	-120	-80	0	-1
III	-60	-30	-60	-30	65
III'	60	30	60	30	-65
VIa <sup>b</sup>	-60	120	-90	0	-4
VIb <sup>b</sup>	-120	120	-60	0	-7
VIII	-60	-30	-120	120	46

<sup>a</sup> Definido pela orientação relativa dos átomos  $C^{\alpha}_i, C^{\alpha}_{i+1}, C^{\alpha}_{i+2}, C^{\alpha}_{i+3}$  da cadeia principal.

<sup>b</sup> Com uma ligação peptídica cis entre o resíduo  $i+1$  e  $i+2$ .

<sup>c</sup> Valores em graus.

As voltas- $\beta$ , por definição, precisam possuir uma distância máxima de 7 Å entre os átomos  $C^\alpha_i$  e  $C^\alpha_{i+3}$  (figura 4), sendo que os resíduos da volta não podem pertencer a uma hélice [47]. Além dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  dos resíduos  $i+1$  e  $i+2$ , o valor da angularidade  $\tau$  [48], definida pela orientação relativa dos quatro  $C^\alpha$  da volta- $\beta$  (ou seja, o ângulo diédrico definido pelos  $C^\alpha$  do resíduo  $i$  a  $i+3$ ), deve estar no intervalo  $-90^\circ < \tau < 90^\circ$  (tabela 1).

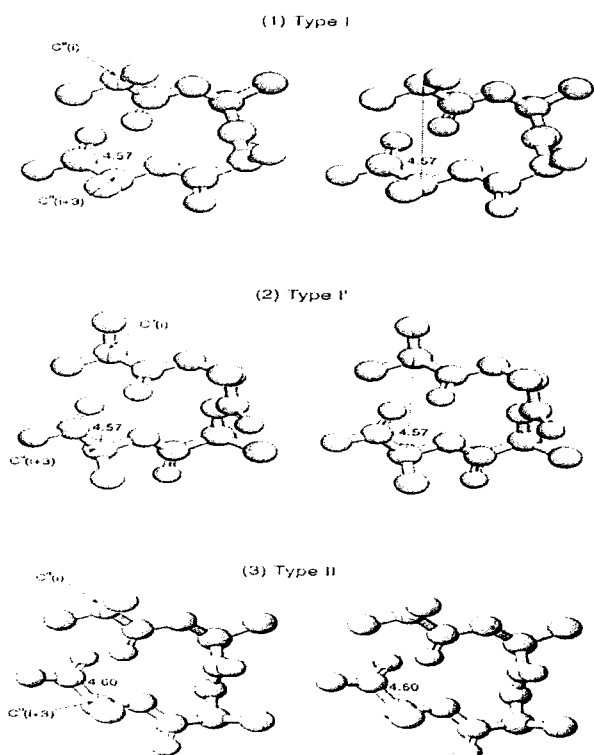


Figura 4: Estéreo desenhos de exemplos de voltas- $\beta$  com destaque para a distância entre  $C^\alpha_i$  e  $C^\alpha_{i+3}$  menor que 7 Å. Extraído da referência [36].

#### 1.4. Espectroscopia por RMN em peptídeos

Em 1946, Felix Bloch e Edward Purcell consolidaram um experimento que permitiu o surgimento de uma nova área na ciência: a Ressonância Magnética Nuclear, ou RMN [49]. Este experimento demonstrou a absorção e emissão de radiação de radiofrequência por um sistema material, quando submetido a um campo magnético. Em 1949 o primeiro experimento no domínio do tempo [50], ou seja, a detecção do *FID* (*Free Induction Decay*), foi realizado, sendo aperfeiçoado na década de 50 por Erwin L. Hahn, considerado o pai da RMN pulsada [50]. O *FID* é o sinal gerado na bobina de detecção pela variação da magnetização que

precessiona ao redor do campo magnético na frequência de Lamor do sistema em estudo. Ele possui a informação das frequências dos núcleos que absorveram a radiação de excitação. Com isso, a RMN é, então, uma forma de espectroscopia, estando fundamentada na diferença entre os níveis de energia associados ao momento magnético do spin nuclear quando imerso em um campo magnético. Uma descrição mais detalhada, envolvendo os conceitos básicos da ressonância magnética nuclear, pode ser encontrada no apêndice A.

Em seqüência ao desenvolvimento da técnica de RMN, no ano de 1958, surgiram os primeiros espectros unidimensionais de proteínas e aminoácidos [51, 52]. Percebeu-se a capacidade de RMN em distinguir proteínas enoveladas de não enoveladas, como também suas mudanças conformacionais. Contudo, foi somente com a introdução de técnicas de RMN 2-D, e posteriormente 3-D e 4-D [50], que a determinação estrutural de proteínas por RMN passou a ganhar um caráter prático. A grande visão de Kurt Wüthrich foi perceber que a magnetização em um resíduo não é transferida para resíduos vizinhos, via acoplamento escalar  $^3J$ , devido à existência de mais de três ligações químicas separando quaisquer prótons entre eles. Isso permitiu a identificação de cada resíduo como um sistema de spin isolado no espectro TOCSY e/ou COSY de RMN, com sua respectiva associação na cadeia principal com o uso do espectro NOESY/ROESY [53].

#### **1.4.1. O experimento 1-D**

No decorrer da década de 60, Richard Ernst e Weston Anderson aperfeiçoaram a técnica de espectroscopia por RMN, permitindo a excitação simultânea dos spins nucleares com pulsos de radiofrequência, criando a espectroscopia de RMN pulsada por transformada de Fourier [50]. O experimento consiste de pulsos com um tempo de duração suficientemente curto, para que, no domínio das frequências, obtenha-se uma janela espectral com as frequências de Lamor dos núcleos a serem irradiados na amostra. A combinação do tempo e da potência da radiação permite

obter pulsos específicos, como, por exemplo, o pulso de  $\pi/2$  (ou  $90^\circ$ ) no qual a população de núcleos atômicos no estado excitado e no estado fundamental é igualada. Imediatamente após a irradiação, um sinal variável no tempo pode ser detectado e gravado. Este sinal oscila com a frequência e amplitude da magnetização dos núcleos atômicos, daí o nome espectroscopia. O sinal, adquirido no domínio do tempo em uma ou mais acumulações (repetições) para aumentar a relação sinal/ruído, é transformado (via transformada de Fourier) para o domínio das frequências<sup>1</sup>, resultando no espectro. Um esquema pode ser visto na figura 5.

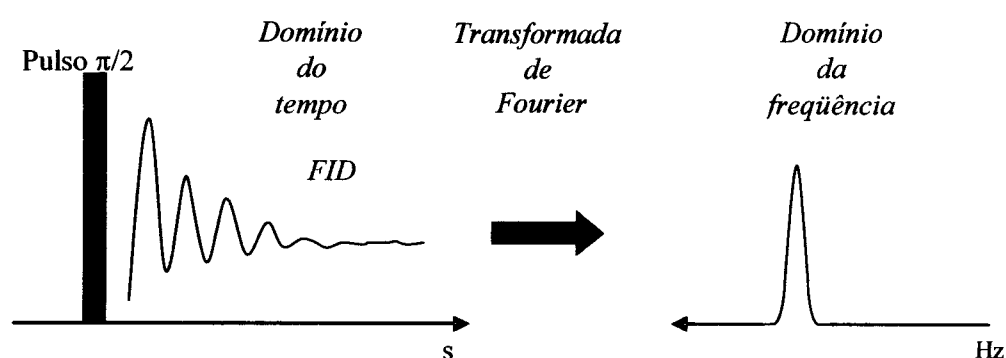


Figura 5: Esquema de um experimento de RMN pulsado.

Atualmente existem vários experimentos de RMN 1-D desenvolvidos para o estudo das propriedades químicas e físicas da matéria. Para peptídeos e, principalmente, proteínas, os espectros 1-D de prótons se tornam extremamente complexos e difíceis de serem analisados, em função da grande quantidade de núcleos de hidrogênio nas amostras.

#### 1.4.2. O experimento 2-D

Em 1971, Jean Jeener propôs, em uma escola de verão em Basko Polje, na Iugoslávia, a medida de espectros bidimensionais por transformada de Fourier com o uso de seqüências de dois pulsos. Essa seqüência é a mestra de todo um conjunto de seqüências de pulso para a realização de experimentos bidimensionais [50].

<sup>1</sup> Consultar Apêndice para detalhes

### A construção da segunda dimensão

Nos experimentos bidimensionais a dimensão indireta pode ser construída adicionando-se ao experimento 1-D um período de evolução  $t_1$  e um período de mistura (figura 6). O período  $t_1$  é variado progressivamente e em cada período de aquisição um *FID* é gravado, com suas acumulações (repetições). A quantidade de períodos  $t_1$  define o número de linhas do espectro 2-D, ou seja, a resolução da dimensão indireta. A intensidade e variação do sinal, para cada *FID* gravado, será uma função  $S$  de  $t_1$  e  $t_2$ . A transformada de Fourier de  $S(t_2, t_1)$  com respeito a  $t_1$  fornece a dimensão indireta, vertical, e em relação a  $t_2$  a dimensão direta, horizontal.

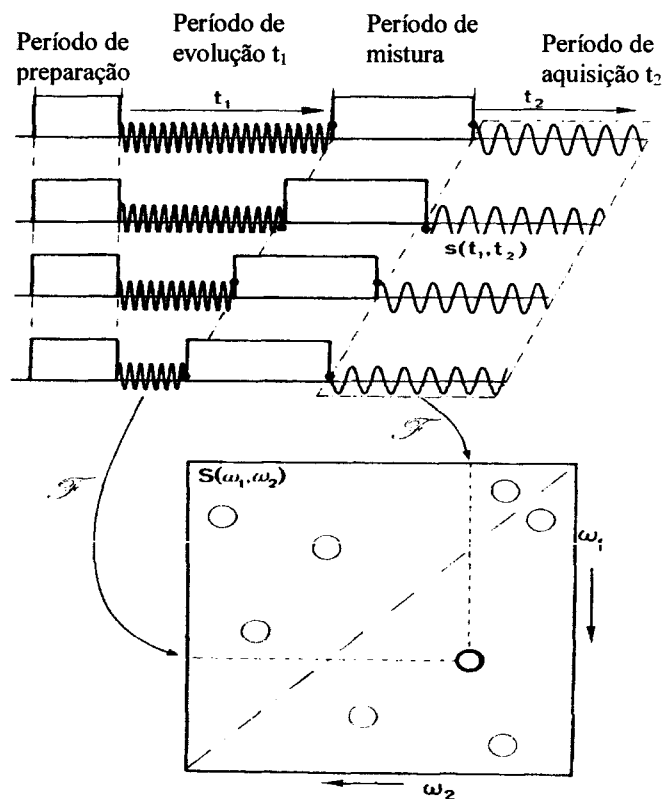


Figura 6: Esquema mostrando a construção da segunda dimensão, com a inclusão do tempo de evolução  $t_1$  e do período de mistura. Extraído da referência [50].

Em experimentos 2-D homonucleares, o espectro resultante (figura 6) possui picos na diagonal que representam basicamente o espectro 1-D; fora da diagonal, os picos são resultados da transferência de coerência entre os spins ocorrida durante o período de mistura, por algum

mecanismo de interação. Dependendo do tipo de mistura, caminhos de relaxação distintos podem ser escolhidos, e as correlações dos picos no espectro bidimensional de RMN terão significados diferentes. Os dois mecanismos mais importantes são: a interação dipolar (pelo espaço) e o acoplamento escalar (pela ligação química). Explorando esses mecanismos de transferência de coerência, os experimentos básicos 2-D homonucleares ( $^1\text{H}$ ) COSY, TOCSY, NOESY e ROESY foram formulados, sendo que cada um deles traz informações distintas e complementares da amostra em estudo.

### ***O experimento COSY***

O experimento COSY (COrrelation SpectroscopY) está fundamentado na transferência de magnetização de um próton para outro próton através dos elétrons responsáveis pela ligação química. Devido ao momento magnético que o elétron possui, este pode adquirir a magnetização<sup>2</sup> do momento magnético de um núcleo e ceder a outro núcleo via ligação química. Essa interação dos núcleos, mediada pelos elétrons, gera a estrutura fina no espectro de ressonância 1-D, sendo denominada de acoplamento  $J$ .

Uma vez que o experimento COSY faz uso do acoplamento  $^3J$ , a transferência de magnetização ocorre desde que os prótons estejam separados por até três ligações químicas, compartilhando o mesmo acoplamento escalar. Este experimento é útil, em peptídeos e proteínas, para distinguir, por exemplo, os prótons  $\text{H}\beta$  e  $\text{H}\gamma$  das cadeias laterais de resíduos como o glutamato, a metionina ou outros que possuam grupos metileno  $\beta$  e  $\gamma$ . Os prótons  $\text{H}\beta$  possuem um acoplamento escalar  $^3J$  com o próton  $\text{H}\alpha$ , mas os  $\text{H}\gamma$  não. Isso acontece porque os  $\text{H}\gamma$  estão a mais que três ligações químicas do próton  $\text{H}\alpha$ , enquanto que os prótons  $\text{H}\beta$  e  $\text{H}\alpha$  estão separados por três ligações químicas. Desta forma, o espectro COSY apresentará picos decorrentes do acoplamento dos prótons  $\text{H}\alpha$  com os prótons  $\text{H}\beta$ , mas não com os  $\text{H}\gamma$ .

---

<sup>2</sup> De forma mais geral usa-se o termo *coerência do estado* do momento magnético do núcleo. Essa nomenclatura é mais útil para a formulação das seqüências de pulso e faz parte do formalismo da mecânica quântica.

### ***O experimento TOCSY***

O experimento TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) é capaz de correlacionar *todos* os prótons de um mesmo sistema de spin, via acoplamento  $^3J$ , em um experimento de RMN 2-D homonuclear. A magnetização pode ser retransmitida de núcleo em núcleo via acoplamento  $^3J$ , portanto, o experimento TOCSY mostra-se útil para identificar subunidades bem definidas da molécula, como os resíduos em proteínas e peptídeos e os anéis em açúcares.

### ***O experimento NOESY***

O experimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) explora a interação dipolar existente entre um par de prótons suficientemente próximos. Os núcleos magnéticos dos átomos comportam-se como barras magnéticas, permitindo que a magnetização possa ser transferida por uma interação de dipolo através do espaço. Exceto quando  $\omega_0\tau_c$  é em torno de 1, quanto mais próximos o par de núcleos, maior será a taxa dessa transferência e mais intenso será o pico, o NOE (Nuclear Overhauser Enhancement), no espectro. Em um espectro NOESY, o volume  $V$  de um pico de correlação entre 2 prótons está relacionado com a distância  $r$  entre eles, na forma

$$V \propto \frac{1}{r^6}, \quad (2)$$

A distância máxima entre os núcleos que permite ocorrer a transferência de magnetização é por volta de 5 Å.

### ***O experimento ROESY***

O experimento ROESY (Rotary-frame Overhauser Effect Spectroscopy) também explora o efeito Overhauser nuclear para obter a informação espacial da amostra em estudo. Ele é utilizado quando a amostra possui uma massa molecular da ordem de 1-2 KDa. Moléculas com essa massa molecular geralmente possuem um tempo de correlação  $\tau_c$  de 0,3 a 3 ns. Para espectrômetros de

RMN com frequência de Larmor de 600 MHz, o produto  $\omega_0\tau_c$  é em torno de 1. Nessas condições, o experimento NOESY possui um sinal muito fraco ou até mesmo nulo, o que não ocorre com o experimento ROESY. A figura 7, a seguir, mostra a dependência da intensidade do NOE e do ROE com o produto  $\omega_0\tau_c$ .

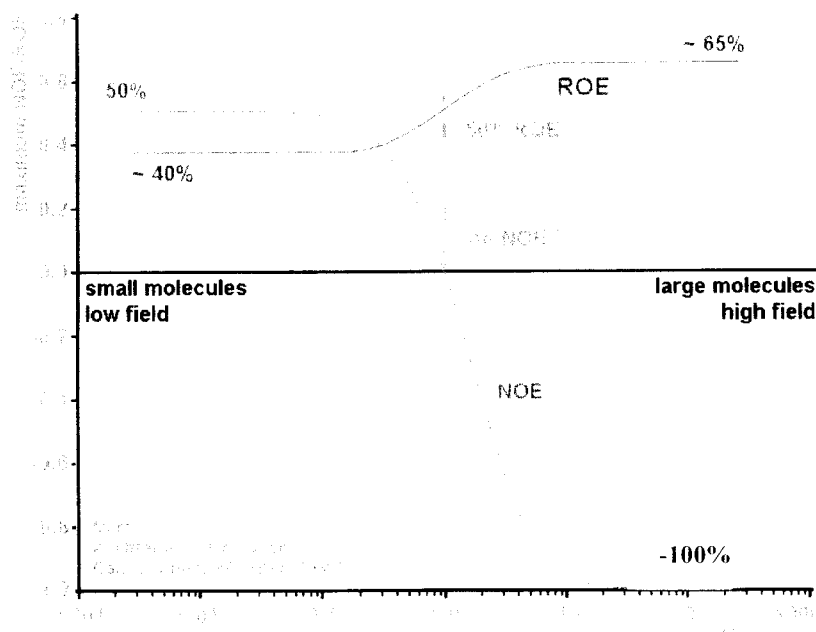


Figura 7: Dependência do NOE/ROE para um sistema homonuclear de dois spin isolados como função do tempo de correlação molecular  $\tau_c$  e da frequência angular dos spin  $\omega_0$ .

#### 1.4.3. Aquisição e processamento dos dados do espectrômetro

A determinação estrutural de peptídeos e pequenas proteínas por RMN-2D homonuclear envolve o uso de experimentos COSY, ROESY/NOESY e TOCSY. Normalmente usa-se 4K de resolução digital na dimensão direta e 1K de resolução digital na dimensão indireta para a gravação do *FID*, e entre 8 e 32 acumulações (repetições). Esses experimentos são adquiridos no domínio do tempo, precisando ser processados para o domínio das frequências. Para tal, são utilizados softwares como o XWINNMR (Bruker), ou o NmrPipe [54]. Para visualização dos espectros e tratamento dos dados, softwares como o AURELIA (Bruker) ou o NmrView podem ser usados [55].



#### 1.4.4. Estrutura de pequenas proteínas e peptídeos

A seguir será descrita a estratégia utilizada para a determinação de estrutura de proteínas pequenas (até 8KDa) e peptídeos [56]. Para fins ilustrativos foram utilizados espectros obtidos para o pentapeptídeo EGSLQ.

##### *Assinalamento dos sistemas de spin*

Inicialmente deve-se identificar o padrão dos sistemas de spin dos resíduos com os espectros COSY e TOCSY. A posição das linhas de ressonância no espectro é característica de cada resíduo e do elemento de estrutura secundária a qual ele pertence.

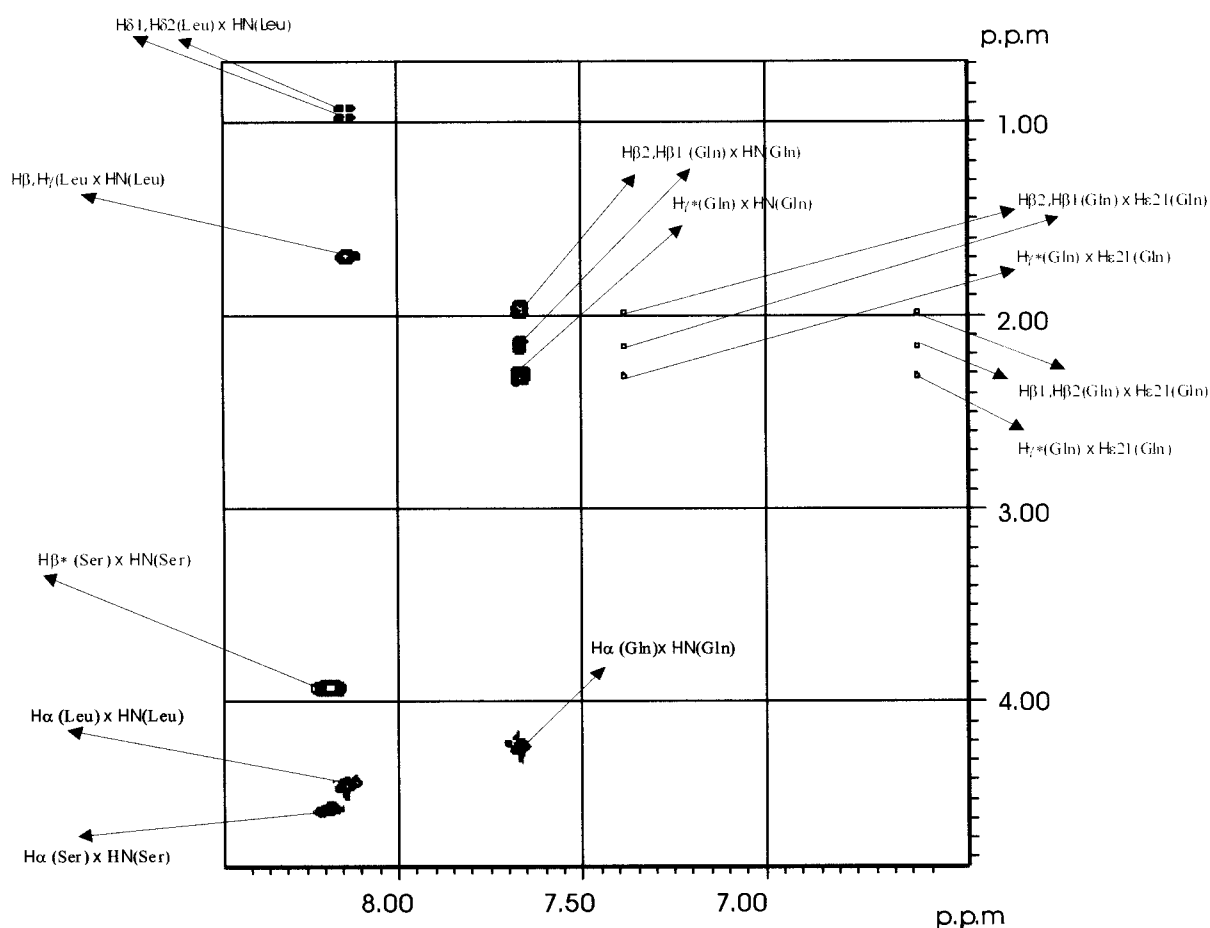


Figura 8: Sobreposição do espectro COSY, em azul, com o espectro TOCSY, em vermelho, do pentapeptídeo EGSLQ. Apenas a região de correlação entre prótons HN e os prótons restantes do resíduo é mostrada. As legendas em preto indicam picos comuns aos dois espectros.

Um exemplo de espectros COSY e TOCSY é mostrado na figura 8 (região de correlação com os prótons HN). Pode-se observar a presença de picos de correlação entre os prótons HN com os demais prótons do mesmo resíduo no experimento TOCSY. Já no experimento COSY apenas picos de correlação entre HN e H $\alpha$  (do mesmo resíduo) ocorrem.

### ***Assinalamento seqüencial***

Com o uso do espectro NOESY (para proteínas e peptídeos maiores de 1 kDa) ou do espectro ROESY (para peptídeos pequenos), faz-se o assinalamento seqüencial a fim de ordenar os sistemas de spin, já identificados nos espectros COSY e TOCSY, na seqüência correta da cadeia polipeptídica. Isso é feito com o uso das conexões seqüenciais  $d_{\alpha N}(i,i+1)$ , sempre presentes no espectro NOESY e ROESY de RMN, por representarem distâncias sempre menores que 5 Å, independentemente da estrutura da cadeia polipeptídica. Na figura 9 é mostrada a região *fingerprint* (região das correlações HN-H $\alpha$ ) de espectros sobrepostos TOCSY e ROESY. Pode-se observar a presença de picos  $d_{\alpha N}(i,i+1)$  no espectro ROESY (em vermelho) que conectam resíduos seqüenciais da cadeia polipeptídica. Partindo-se da linha de ressonância H $\alpha$  do glutamato N-terminal, uma conexão é observada para o próton amino do aminoácido seguinte, a glicina, apenas no espectro ROESY. Este próton amino da glicina faz uma conexão intra-resíduo com seus prótons H $\alpha$ , portanto, também visível no espectro TOCSY. Por sua vez, esses prótons H $\alpha$  estão próximos do próton amino do resíduo seguinte, a serina, sendo visível essa conexão espacial apenas no espectro ROESY. Este processo chama-se assinalamento seqüencial e segue até o encontro com uma prolina (por não possuir próton amino) ou até o fim da cadeia polipeptídica (no exemplo, a glutamina).

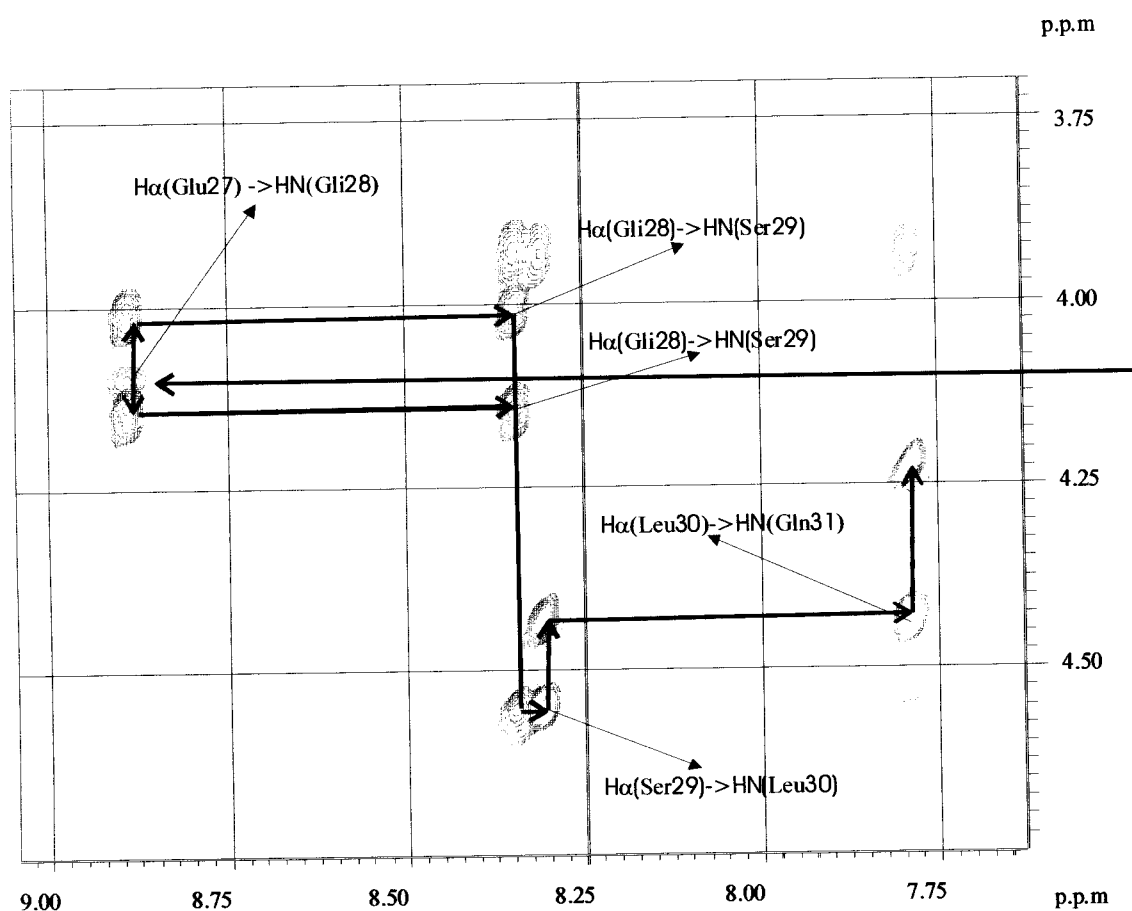


Figura 9: Assinalamento seqüencial. Em azul estão as conexões TOCSY, e em vermelho as conexões ROESY da região do fingerprint. As linhas mais grossas representam o caminho do assinalamento seqüencial e as legendas em preto identificam as conexões entre os prótons da cadeia principal dos resíduos.

### *Extração da informação estrutural do espectro de RMN*

Uma vez identificados e assinalados os picos de correlação dos espectros, duas informações básicas podem ser extraídas: distâncias interprotônicas, utilizando o volume dos NOE (ou ROE) do espectro NOESY (ROESY), e ângulos da ligação química, utilizando o acoplamento  $^3J$  do espectro COSY.

As distâncias obtidas do espectro NOESY (ROESY) variam de 1.8Å até 5Å, sendo relacionados com o volume do NOE (ROE) conforme descrito em 4.2.4. A equação (5) pode ser reescrita como:

$$V \approx \frac{cnst}{r^6}, \quad (6)$$

Uma das formas de determinar a constante *cnst* da equação (6) é usando o volume do pico de correlação entre um par de prótons metílenos de um resíduo qualquer e fazendo  $r = 1.8 \text{ \AA}$  (distância usual entre os prótons metílenos). Com isso, podem-se converter em distâncias os volumes dos NOEs (ROEs) do espectro NOESY (ROESY). Existem atualmente dois métodos de atribuir essas distâncias: o primeiro é colocando um erro superior e inferior à distância encontrada do volume do NOE (ROE) que dependa do par de prótons envolvidos, variando de 20% até 80% [57]. O outro é agrupar em três caixas de distância que variam de 1.8 a 2.7 Å, 1.8 a 3.7 Å e 1.8 a 5.0 Å, de acordo com o volume do NOE (ROE) [56].

Também é possível usar o valor do acoplamento escalar  ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$  entres os prótons HN e H $\alpha$  do espectro COSY como restrição. O acoplamento  ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$  possui a informação do ângulo torcional  $\phi$  da cadeia polipeptídica [58]. A equação de Karplus relaciona, empiricamente, os valores dos acoplamentos  ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$ , obtidos para cada resíduo do espectro COSY, com os ângulos torcionais  $\phi$  da molécula [59]. Usualmente o erro experimental dos ângulos torcionais é de  $\pm 30^\circ$ .

#### ***Do espectro para a estrutura: software para cálculo de dinâmica molecular***

De posse dessas restrições experimentais, é construída uma lista a qual contém os dados de entrada para uma dinâmica molecular restringida. Um dos programas utilizados para o cálculo da estrutura é o CNS, usando protocolos de *simulated annealing* (SA) [60]. Este consiste de um campo de força de poço quadrado baseado em parâmetros empíricos e nas restrições de RMN. Este potencial converge a conformações que reduzirão as violações das restrições experimentais e empíricas durante o ciclo de aquecimento – resfriamento. Além das restrições de RMN, os termos do campo de força consistem dos comprimentos das ligações, dos ângulos torcionais e dos termos repulsivos de Van der Waals, sendo estes os parâmetros

empíricos. Com exceção do termo de Van der Waals, os dois primeiros termos referem-se às conformações das ligações covalentes da molécula.

Em dados de entrada contendo menos de quatro restrições por resíduo, uma convergência para uma única família conformacional é improvável. O resultado será a presença de diversas conformações compatíveis com as mesmas restrições experimentais. Dentre os motivos que influenciam um número baixo de restrições por resíduo estão: ambigüidade no espectro e/ou ausência de restrições NOEs (ROEs). Para moléculas flexíveis e/ou estendidas conformacionalmente é comum um número reduzido de NOEs (ROEs), visto que essas moléculas populam a região  $\beta\beta_p$  do gráfico de Ramachandran. As conformações permitidas nesta região não incluem conectividades NOEs (ROEs) de intervalo intermediário, ou seja, entre par de prótons distantes de 2, 3 e 4 resíduos na cadeia polipeptídica; somente NOEs (ROEs) seqüenciais devem ser visualizados<sup>3</sup>.

#### ***Restrições complementares: verificação da presença de pontes de hidrogênio***

A identificação de pontes de hidrogênio através de medidas de RMN pode ser de grande utilidade para a determinação estrutural de uma proteína. A informação pode ser utilizada na forma de restrição experimental de distância adicional, no caso mais simples em que é identificado o doador e presumido o aceptor da ponte de hidrogênio.

Uma das maneiras mais simples e mais utilizadas em RMN para a identificação de prótons doadores em pontes de hidrogênios é através das taxas de troca de prótons amino. Para tal, a amostra liofilizada é redissolvida em D<sub>2</sub>O e imediatamente submetida a uma seqüência de medidas 1-D ou experimentos COSY de curta duração, em intervalos de tempo pequenos e fixos. No caso de amostras isotopicamente enriquecidas com <sup>15</sup>N experimentos <sup>15</sup>N-HSQC rápidos são os mais adequados. Em decorrência da troca dos prótons amino com o D<sub>2</sub>O é esperado que a intensidade de

---

<sup>3</sup> Mais sobre o padrão de conectividades pode ser encontrado na secção 1.4.5

seu sinal decaía rapidamente com o tempo, exceto quando houver um impedimento a essa troca, como no caso de prótons envolvidos em pontes de hidrogênio ou prótons inacessíveis ao solvente. Apesar de ser amplamente utilizada em proteínas, a técnica apresenta um grande problema em peptídeos: as taxas de troca são extremamente rápidas e, portanto, muito difíceis de serem medidas.

Outra técnica bastante utilizada em RMN é através do uso dos coeficientes de temperatura como indicadores de ligações de hidrogênio. Tanto em proteínas quanto em peptídeos uma mudança significativa no deslocamento químico dos prótons amino pode ser observada variando-se a temperatura da amostra. De uma forma geral ocorre um deslocamento para mais alto campo com o aumento da temperatura, resultando em um coeficiente de temperatura  $\Delta\delta/\Delta K$  negativo. Foi demonstrado experimentalmente [61, 62] que, em proteínas, os prótons amino livres apresentam um valor  $\Delta\delta/\Delta K$  menor que -4.5 ppb/K, enquanto que em prótons amino envolvidos em pontes de hidrogênio esse valor é maior que -4.5 ppb/K, podendo, inclusive, se tornar positivo. Tal comportamento pode ser explicado pela própria natureza da ponte de hidrogênio: o grupo carbonil causa, sobre o próton amino, um deslocamento para baixo campo; com o aumento da temperatura a ponte de hidrogênio impede que o próton amino sofra um deslocamento acentuado para mais alto campo. Já o deslocamento químico dos prótons não envolvidos em pontes de hidrogênio intramolecular é mais sensível ao incremento da temperatura, com um deslocamento mais acentuado para mais alto campo. Foi demonstrado [62] que, em proteínas globulares, o coeficiente do deslocamento químico pela temperatura do próton amino praticamente não é influenciado pelo grau de acessibilidade ao solvente, ao contrário da taxa de troca, fortemente correlacionada com a exposição na superfície da proteína. Isso corrobora a assunção estabelecida de que a taxa de troca lenta para próton amino *sempre* implica em ponte de hidrogênio. Novamente, a técnica apresenta deficiências na sua aplicação em peptídeos, existindo diversos exemplos de falha na regra com relação ao valor de  $\Delta\delta/\Delta K$ . Por exemplo, em um estudo realizado com um peptídeo desestruturado [63] foi encontrado um valor excepcionalmente baixo para um dos coeficientes de temperatura.

Outros experimentos demonstraram, posteriormente, que esse próton amino se encontrava, porém, envolvido em uma ponte de hidrogênio transiente. O baixo coeficiente de temperatura encontrado pôde ser atribuído à perda de estrutura secundária com o aquecimento, efeito dominante que mascarou a contribuição vinda da ponte de hidrogênio. Conclui-se, portanto, que em peptídeos os coeficientes de temperatura refletem a soma de dois fatores: (i) a dependência das pontes de hidrogênio com os valores de  $\Delta\delta/\Delta K$  conforme caracterizado acima, e (ii) um segundo termo proveniente da perda de estrutura com o aumento da temperatura [62].

Em amostras dissolvidas em soluções aquosas, a dependência da intensidade das linhas de ressonância NH com a temperatura também pode ser utilizada como parâmetro para verificação de sua acessibilidade ao solvente. Nos prótons que não trocam com a água a intensidade de seu sinal se mantém constante com o aumento da temperatura, enquanto que, com o aumento da taxa de troca, o sinal diminui conforme é aumentada a temperatura. Essa diminuição de intensidade se deve ao pulso de pré-saturação da água: com o aumento da temperatura os prótons HN da amostra passam a trocar mais rapidamente com os prótons da água e são, dessa forma, também pré-saturados.

#### 1.4.5. RMN e o estudo estrutural de pequenos peptídeos lineares

A técnica de espectroscopia por RMN pulsada vem sendo utilizada por diversos grupos de pesquisa para o estudo de peptídeos lineares<sup>4</sup> menores que 30 resíduos. Diferentemente de proteínas, em pequenos peptídeos lineares não é esperada uma estrutura única para a cadeia principal, resultando na presença de várias famílias conformacionais na amostra em solução. O espectro de RMN reflete, na maioria dos casos, uma média dessas famílias. As análises de peptídeos podem incluir a determinação das distâncias interprotônicas e da existência de elementos de estrutura regular, a verificação da presença de pontes de hidrogênio e cálculos de dinâmica molecular [56, 60].

---

<sup>4</sup> Estes peptídeos são não-cíclicos, podendo ser: neuropeptídeo, imunopeptídeo ou hormono-peptídeo

### *Elementos estruturados em peptídeos*

Pequenos peptídeos lineares possuem mais de uma conformação, sendo os parâmetros de medida de RMN lentos se comparados às mudanças conformacionais destes peptídeos. Portanto, esses ROEs são independentes, e só podem ser usados com cautela: dois ROEs no espectro podem vir de famílias de conformação diferentes! Esse mesmo motivo impede que as distâncias calculadas, a partir do espectro ROESY, correspondam às distâncias provenientes do padrão de ROEs observados. Por exemplo, o padrão de conectividades no espectro pode ser representativo de uma hélice- $\alpha$ , mas as intensidades dos ROEs podem ser diferentes do que o esperado para uma hélice- $\alpha$ . Isso ocorre devido ao fato de uma parte da amostra não estar na conformação de hélice- $\alpha$ , enfraquecendo ou fortalecendo a intensidade dos sinais. Em geral, espectros ROESY com alta relação sinal/ruído são necessários para que ROEs provenientes de outras conformações menos populada sejam observados. Apesar de não ser rigorosamente correto usar ROEs, não é incomum procurar por um modelo estrutural compatível com essas restrições experimentais [64].

Na tabela 2 podem ser visualizadas as conectividades espaciais usualmente encontradas em peptídeos lineares. A existência de fortes conexões  $d_{\alpha N}(i,i+1)$ , com ausência de conexões  $d_{NN}(i,i+1)$ , permite sugerir que os ângulos torcionais da cadeia principal dos resíduos envolvidos populam a região- $\beta$  (cadeia estendida) do gráfico de Ramachandran. A presença da conexão  $d_{NN}(i,i+1)$  indica que o conjunto conformacional do peptídeo inclui estruturas locais na cadeia peptídica com ângulos diedrais da cadeia principal populando as regiões  $\alpha_L$  ou  $\alpha_R$ . A ocorrência de extensas conexões  $d_{NN}(i,i+1)$  e  $d_{\alpha N}(i,i+1)$  na seqüência primária é um bom indicador de uma mediação conformacional entre ambas as regiões  $\alpha_R$  e  $\beta$  do espaço  $\phi$  e  $\psi$  [63].



Tabela 2: Padrão de distância em estruturas enoveladas e não enoveladas [65].

Estrutura	NOE observado	Distância interprotônica
<b>Estado não enovelado:</b>		
Região $\beta$	$d_{\alpha N}(i, i+1)$	2.2-2.7 Å
Região $\alpha_R$	$d_{NN}(i, i+1)$	1.9-3.0 Å
<b>Estado enovelado:</b>		
Hélice	$d_{NN}(i, i+1)$	2.6-2.8 Å
	$d_{\alpha N}(i, i+3)$	3.3-3.4 Å
	$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$	2.5-5.1 Å
Volta reversa	$d_{NN}(i+2, i+3)$	2.4 Å
	$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	3.3-3.6 Å

A observação simultânea de conexões localizadas  $d_{NN}(i+2, i+3)$  e  $d_{\alpha N}(i+1, i+3)$  entre pares de resíduos isolados, em alguns peptídeos, geralmente indica uma estrutura local altamente preferencial, semelhante a uma volta- $\beta$  tipo II, para o qual os ângulos  $\phi$  e  $\psi$  do terceiro resíduo da volta ( $i+2$ ) localizam-se na região  $\alpha_L$  [65]. Nestes casos, a conexão  $d_{NN}(i+1, i+3)$  possui um valor entre 3.8 e 4.3 Å, gerando um ROE muito fraco, geralmente não observado em peptídeos flexíveis devido à existência e promediação de outras conformações que não necessariamente possuem essa proximidade para este par de prótons. Na figura 10 é mostrado um modelo para os dois tipos de voltas- $\beta$ , mais comuns, tipo I e tipo II.

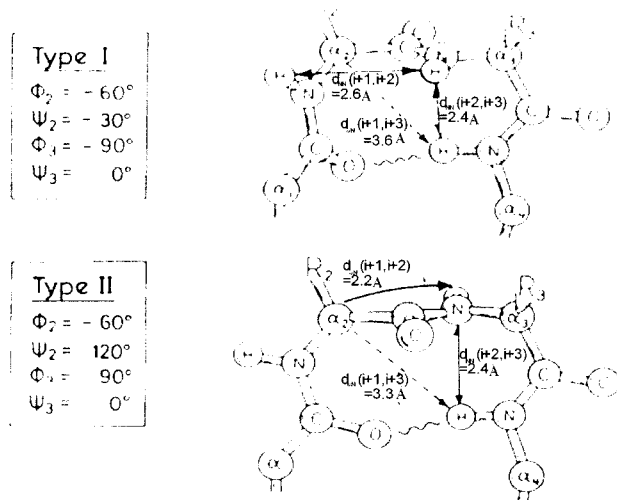


Figura 10: Exemplo ideal de volta- $\beta$  tipo I e tipo II. São mostradas as conexões  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  relevantes. Figura adaptada da referência [56].

O padrão de ROE esperado para os elementos de estrutura secundária pode ser visto na figura 11. Analisando-se apenas os ROEs sequenciais poderá ser verificada somente a população relativa para cada resíduo na região  $\alpha_R$  e  $\beta$  do gráfico de Ramachandran. A existência ou não de ROEs de intervalo intermediário da cadeia principal ( $i \rightarrow i+2$ ,  $i \rightarrow i+3$ ,  $i \rightarrow i+4$ ) é o melhor diagnóstico de estrutura secundária regular. Estes ROEs imediatamente identificam uma população significativa de elementos estruturados, no conjunto de conformações.

	$\beta, \beta_p$	$\alpha$ -Helix	$3_{10}$ -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha N}(i, i+4)$		=====						
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$		=====	=====					
$d_{\alpha N}(i, i+3)$		=====	=====					
$d_{\alpha N}(i, i+2)$		=====	=====					
$d_{\alpha N}(i, i+2)$				=====	=====	=====	=====	=====
$d_{NN}$	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
$d_{\alpha N}$	=====				=====	=====	=====	=====
$\frac{d_{\alpha N}}{3J_{\alpha N\alpha}}(\text{Hz})$	9 9 9 9 9 9 1 2 3 4 5 6	4 4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6 7	4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6	4 9 1 2 3 4	4 5 1 2 3 4	7 5 1 2 3 4	7 9 1 2 3 4	4 9 1 2 3 4

Figura 11: Padrão de ROE para elementos de estrutura secundária. A largura da linha é proporcional à intensidade dos ROEs correspondentes. Figura tirada da referência [56]

### Verificação da existência de voltas

Conforme descrito em 1.4.5., a presença de certas conectividades ROEs no espectro ROESY de pequenos peptídeos lineares fornece uma evidência crucial para a asserção de uma população de conformero estruturado. Dentre estes elementos estruturados, definidos pelos ângulos torcionais  $\phi$  e  $\psi$  dos resíduos da cadeia polipeptídica, os mais comuns são as voltas- $\beta$ . Porém, na identificação de voltas por  $^1\text{H}$  RMN em peptídeos, uma análise apenas das conectividades ROEs não fornece evidências suficientes de sua existência. Uma análise mais completa deve ser feita, levando-se em consideração três critérios [66]:

- (i) um baixo coeficiente de temperatura deve ser encontrado para o próton amino da cadeia principal HN( $i+3$ ), devido à formação de uma ponte de hidrogênio com o oxigênio da carbonila CO( $i$ );
- (ii) valores pequenos de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  devem ser encontrados para os resíduos ( $i+2$ ) e/ou ( $i+3$ ) em voltas- $\beta$  do tipo I e do tipo II;
- (iii) o conjunto de NOEs ou ROEs  $d_{\text{NN}}(i+2, i+3)$  e  $d_{\alpha\text{N}}(i+1, i+3)$  deve estar presente.

Como, em geral, peptídeos apresentam a coexistência de multiconformações, casos em que os critérios acima são parcialmente satisfeitos podem ser associados à presença de uma volta em uma família conformacional baixamente populada. Em especial o segundo critério (ii) é apenas satisfeito para famílias conformacionais altamente populadas.

## 1.5. Objetivos

O resultado estrutural obtido para o peptídeo-C e os resultados fisiológicos e bioquímicos para os fragmentos oriundos da região C-terminal do peptídeo-C relatados acima estimularam uma investigação da autonomia estrutural dessa região da molécula. Por esta razão foram escolhidos peptídeos, de tamanhos diferentes, da região C-terminal; o menor dos peptídeos (5 resíduos) sendo suficiente para reproduzir a volta III' descrito por Munte *et al* [35] e o maior (8 resíduos) para englobar a região de melhor sobreposição das estruturas descritas por Munte *et al*.

O trabalho a seguir descrito seguiu os seguintes passos:

- Estudo, por RMN, da conformação de pequenos peptídeos referentes à região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana e do rato;
- Comparação dos motivos conformacionais encontrados para os peptídeos, entre si e com a estrutura obtida para o pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano.

## 2. Metodologia

Uma descrição do procedimento experimental será apresentada a seguir, indicando como foram preparadas as amostras, e quais os parâmetros utilizados no experimento de RMN e nos programas usados para o processamento e a análise dos dados obtidos.

### 2.1. Preparação das amostras

As amostras referentes à região C-terminal do peptídeo-C humano

- Pep1 - L<sub>24</sub>ALEGLQ<sub>31</sub>
- Pep2 - A<sub>25</sub>LEGLQ<sub>31</sub>
- Pep3 - L<sub>26</sub>EGSLQ<sub>31</sub>
- Pep4 - E<sub>27</sub>GSLQ<sub>31</sub>

e do rato

- Pep5 - A<sub>25</sub>LEVARQ<sub>31</sub>

foram sintetizadas com o C-terminal livre (na forma de ácido carboxílico, porque representa o C-terminal do peptídeo-C) e liofilizadas pela empresa Genemed Synthesis Inc, sob encomenda, em quantidades de ~3.0 mg. As amostras foram importadas pelo Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural (IFSC-USP). O peptídeo-C humano foi produzido pela empresa Biommm e cedido, já liofilizado, para os estudos em questão. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de preparação. Este consiste em suspendê-las em 2ml de água MilliQ e a seguir liofilizá-las, repetindo o procedimento aproximadamente dez vezes para remover quaisquer resíduos voláteis de síntese. Após este processo foram adicionados, a cada amostra liofilizada, 500 µl da seguinte solução:

- 50% TFE-d<sub>2</sub>
- 50% de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH7.0, contendo 1 mM de azida sódica (fungicida) e 0,1 mM de DSS (referência).

As amostras foram guardadas a 4°C, em tubos de RMN selados com parafilme.

## 2.2. Medidas de RMN

Diversos conjuntos de medidas foram realizados, de acordo com a disponibilidade dos equipamentos. As medidas foram feitas no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear - CNRMN-UFRJ, na cidade do Rio de Janeiro; no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS, em Campinas; e na Universidade de Regensburg, Alemanha<sup>5</sup>.

Para todas as amostras foram adquiridos espectros TOCSY, COSY, ROESY e NOESY, em diferentes temperaturas, com a finalidade de realizar os assinalamentos dos sistemas de spin e buscar por indícios de estruturação dos peptídeos. Adicionalmente foram realizados conjuntos de experimentos 1-D, com o intuito de determinar as taxas de variação do deslocamento químico pela temperatura para os prótons amino, objetivando identificar a presença de pontes de hidrogênio envolvendo esses prótons.

Alguns experimentos puderam ser realizados utilizando-se um cryoprobe. O cryoprobe possui uma bobina de detecção resfriada em baixa temperatura, sendo, dessa forma, mais sensível ao sinal de RMN. Isso permite a detecção de NOEs/ROEs que não são observados em equipamentos de mais baixa relação sinal/ruído, sendo portanto útil na detecção de conformações pouco populada do peptídeo.

A tabela 3 resume os experimentos realizados em cada amostra. Os experimentos serão descritos a seguir.

---

<sup>5</sup> As medidas na Alemanha foram realizadas pela Dra. Claudia Munte

Tabela 3: Experimentos de RMN realizados.

Experimento/Equipamento	283 K		293 K		303 K	
	500Mhz	600Mhz	500Mhz	600Mhz	500Mhz	600Mhz
<b>Pep1</b>						
COSY	x		x			x
TOCSY	x		x			x
NOESY						x
ROESY	x		x			x
<b>Pep2</b>						
COSY	x		x	x <sup>a</sup>		x
TOCSY	x		x	x <sup>a</sup>		x
NOESY						x
ROESY	x	x <sup>a</sup>	x	x <sup>a</sup>		x
<b>Pep3</b>						
COSY	x		x			x
TOCSY	x		x			x
NOESY						x
ROESY	x		x			x
<b>Pep4</b>						
COSY	x		x			x
TOCSY	x		x			x
NOESY						x
ROESY	x	x <sup>a</sup>	x			x
<b>Pep5</b>						
COSY	x		x	x <sup>a</sup>	x	x
TOCSY	x		x	x <sup>a</sup>	x	x
NOESY					x	x
ROESY	x	x <sup>a</sup>	x	x <sup>a</sup>	x	x
Experimento/Equipamento	283 K		298 K		303 K	
	500Mhz	600Mhz	500Mhz	600Mhz	500Mhz	600Mhz
<b>Peptídeo-C humano</b>						
COSY		x <sup>b</sup>		x	x	
TOCSY		x <sup>b</sup>		x	x	
NOESY		x <sup>b</sup>		x	x	
ROESY		x <sup>b</sup>		x	x	

x<sup>a</sup> Medida realizada com o uso do cryoprobe

x<sup>b</sup> Medida foram trabalho da tese de doutorado de Munte CE.

### 2.2.1. Espectrômetro Bruker DRX-600: CNRMN-Rio de Janeiro

Os espectros das 5 amostras Pep1, Pep2, Pep3, Pep4 e Pep5 foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX-600, operando na frequência de ressonância do próton de 600 MHz. Todas as medidas foram realizadas em 303 K. O sinal da água foi suprimido com pré-saturação seletiva. Os espectros ROESY e NOESY foram adquiridos com tempo de mistura

de 200 ms. O espectro TOCSY foi adquirido com um tempo de spin-lock de 80 ms, usando a seqüência MLEV-17. O espectro COSY foi obtido segundo *Rance et al*, com detecção em quadratura (DQD-COSY) [67]. Todos os espectros foram adquiridos no modo TPPI, com ganho de ~500x, resolução digital de 4k na dimensão direta e 1k na dimensão indireta, com 8 acumulações por *FID* e uma janela espectral de 12 ppm. Os experimentos 2-D foram intercalados com experimentos 1-D para verificação da integridade da amostra. O tempo de máquina foi tipicamente de 24 horas por amostra.

Adicionalmente foram realizados experimentos TOCSY, COSY, ROESY e NOESY no peptídeo-C humano, com parâmetros idênticos aos descritos acima, porém a 298 K.

### **2.2.2. Espectrômetro Varian INOVA 500: LNLS-Campinas**

Utilizou-se um espectrômetro Varian INOVA 500, operando na frequência de próton de 500 MHz, para medir uma seqüência de espectros 1-D a cada 3 K em um intervalo de temperatura de 285 K até 303 K, das amostras Pep2 e Pep5. Esses espectros foram adquiridos com 16k de resolução digital e largura espectral de 12 ppm. Adicionalmente foram refeitos os experimentos 2-D NOESY, ROESY, COSY, TOCSY no pep5, com os mesmos parâmetros dos experimentos realizados no CNRMN, e no peptídeo-C humano, a 303 K.

### **2.2.3. Espectrômetro Bruker DRX 500: Universidade de Regensburg, Alemanha**

Utilizando um espectrômetro Bruker DRX500, operando na frequência de próton de 500 MHz, espectros COSY, ROESY e TOCSY foram adquiridos para as amostras Pep1, Pep2, Pep3, Pep4 e Pep5, nas temperaturas de 293 K e 283 K. Foram utilizados os mesmos parâmetros das medidas realizadas no CNRMN. Adicionalmente foram realizadas, para os 5 peptídeos, seqüências de experimentos 1-D, entre 277 K e 303 K em intervalos de 2 K; todos os espectros foram adquiridos com pulso de pré-saturação da água, 64k de resolução digital e uma janela espectral de 14 ppm. O ganho foi mantido constante. Uma curva de calibração de

temperatura para o espectrômetro foi feita com auxílio de uma amostra constituída de um capilar selado contendo metanol, imerso em D<sub>2</sub>O.

#### **2.2.4. Espectrômetro Bruker DRX-600: Universidade de Regensburg, Alemanha**

Foram realizados experimentos em um espectrômetro Bruker DRX600, operando na frequência de próton de 600 MHz e equipado com um cryoprobe. Espectros ROESY, COSY e TOCSY foram obtidos na temperatura de 293 K para as amostras Pep2 e Pep5. Em 283 K apenas experimentos ROESY foram realizados nas amostras Pep2, Pep4 e Pep5.

### **2.3. Processamento de dados e visualização dos espectros 1-D**

Os espectros 1-D foram processados e visualizados com o uso do programa XWINNMR (Bruker). Os dados foram multiplicados por uma função de janela exponencial, com uma largura de 0.3 Hz. A transformada de Fourier foi realizada com 64k de resolução digital. O espectro foi referenciado usando a ressonância dos grupos metil do DSS (0 ppm). Apesar do ganho constante no processo de aquisição dos espectros, a normalização das intensidades dos picos foi controlada com o sinal do DSS e com os sinais de prótons alifáticos dos resíduos.

### **2.4. Processamento de dados e visualização dos espectros 2-D**

O programa XWINNMR foi utilizado para realização das transformadas de Fourier nas duas dimensões e para o ajuste das fases e da linha de base. Foi usado 4k de resolução digital na dimensão direta, e uma função de janela multiplicação-gaussiana com uma largura de -6Hz para o envelope exponencial e de 0.12Hz para o envelope Gaussiano. O valor de 0.12Hz faz a gaussiana ter seu valor máximo após 12% do tempo de aquisição do sinal. Na dimensão indireta foram



utilizados 2k de resolução digital, e uma função de janela multiplicação-gaussiana com uma largura de -8Hz para o envelope exponencial e de 0.1Hz para o envelope gaussiano. Os espectros foram referenciados usando a ressonância dos grupos metil do DSS (0 ppm).

Os espectros foram visualizados e analisados com o uso do programa AURELIA (Bruker). As linhas de ressonância foram assinaladas em acordo com os primeiros princípios propostos por Würthlich [57].

### 3. Resultados e discussão

O assinalamento completo dos átomos de  $^1\text{H}$  para as amostras Pep1, Pep2, Pep3, Pep4, Pep5 e Peptídeo-C humano, nas temperaturas medidas, pode ser encontrado nos anexos 1 a 8. Tanto os espectros ROESY quanto os espectros NOESY das 5 primeiras amostras (Pep1 a Pep5) apresentaram uma baixa quantidade de picos inter-residuais, inviabilizando o cálculo estrutural. Para estes peptídeos foram analisadas apenas as conexões existentes, buscando a possibilidade de uma volta existir ou não, e sua estabilidade com a temperatura. Também foi realizada uma análise dos espectros NOESY para a região C-terminal do peptídeo-C em 283 K, 298 K e 303 K (região *fingerprint*).

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para cada uma das amostras, separadamente. Uma comparação entre os cinco peptídeos e o peptídeo-C humano será feita no final (conclusão).

#### 3.1. Pep1: LALEGLSLQ

O Pep1, mais longo entre os cinco peptídeos medidos, corresponde aos 8 últimos resíduos da região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana. Seu assinalamento seqüencial  $^1\text{H}$  completo e suas constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  podem ser encontrados no anexo 1.

##### 3.1.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidências de voltas

Nas figuras 12 e 13 estão, respectivamente, as regiões amino-amino e *fingerprint* do espectro ROESY nas três temperaturas medidas. Com esses espectros podemos identificar a ausência ou presença dos ROEs  $d_{\text{NN}}(i+2, i+3)$  e  $d_{\alpha\text{N}}(i+1, i+3)$ , relevantes para a verificação de voltas, e sua manutenção ou não com a mudança da temperatura.

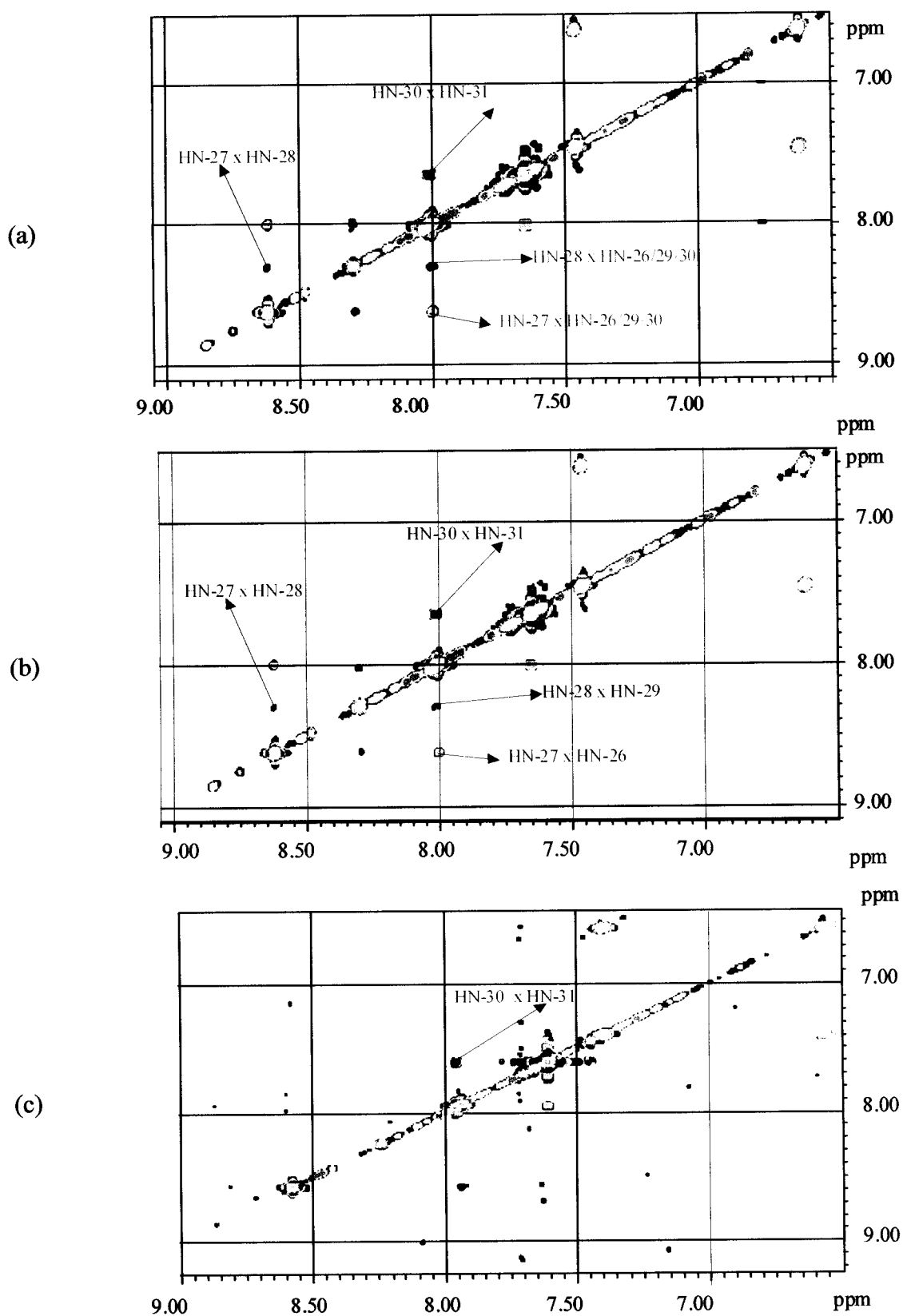


Figura 12: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep1. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.

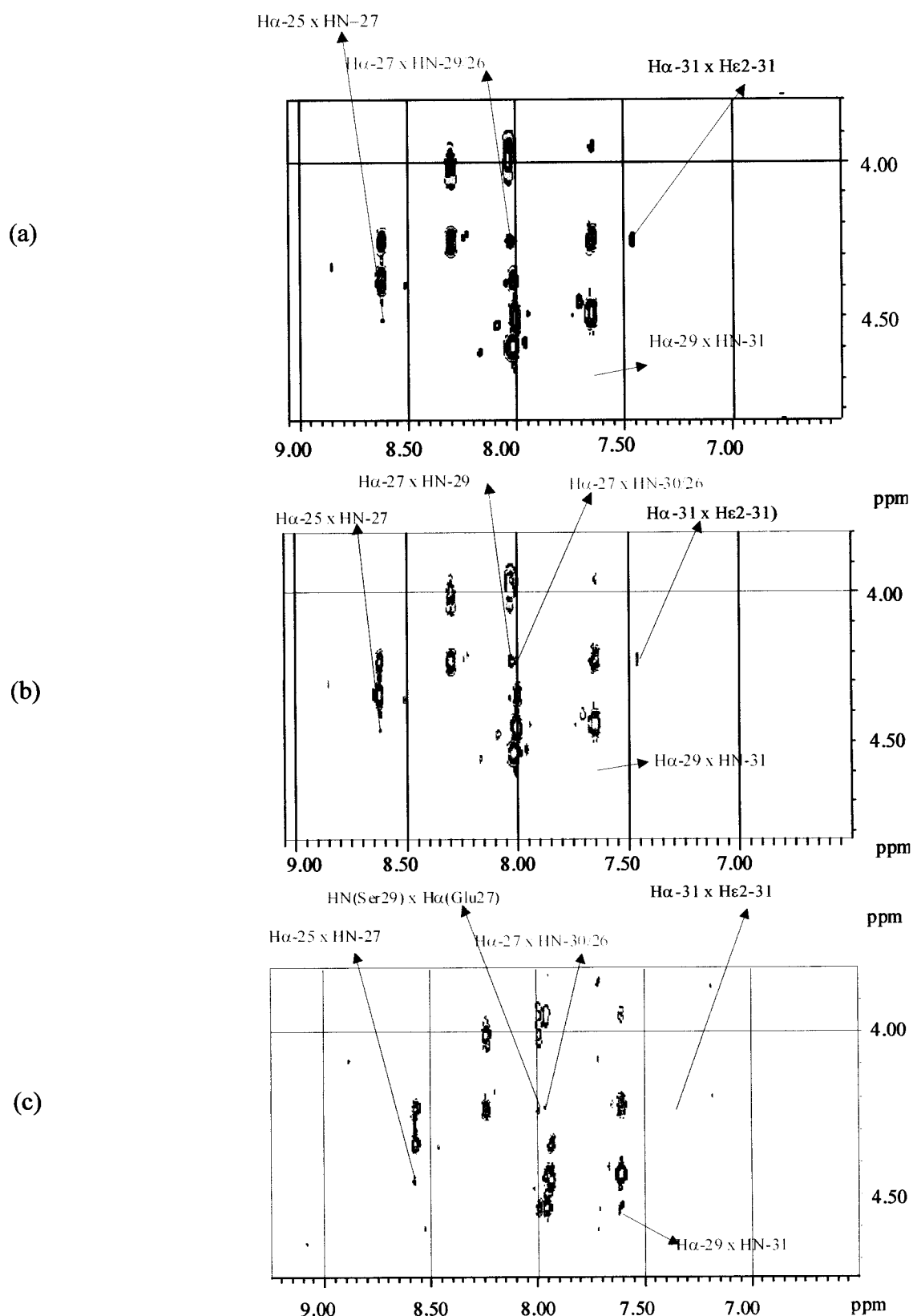


Figura 13: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep1. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.

Na tabela 4 dois conjuntos de ROEs podem ser observados às temperaturas de 283 K e 293 K:  $d_{\alpha N}(A_{25}E_{27})$  com  $d_{NN}(L_{26}E_{27})$  e  $d_{\alpha N}(E_{27}S_{29})$  com  $d_{NN}(G_{28}S_{29})$ . Tais ROEs são indícios fortes da existência de voltas envolvendo os resíduos  $L_{24}ALE_{27}$  e  $L_{26}EGS_{29}$ . A ambigüidade dos resíduos  $Leu_{26}$ ,  $Ser_{29}$  e  $Leu_{30}$ , em 283 K, desaparece em 293 K. Já a 303 K tais voltas não parecem existir, uma vez que os ROEs  $d_{NN}(L_{26}, E_{27})$  e  $d_{NN}(G_{28}, S_{29})$  estão ausentes no espectro. Em contrapartida, surge um novo ROE  $d_{\alpha N}(S_{29}, Q_{31})$ , que, em conjunto com o ROE  $d_{NN}(L_{30}, Q_{31})$ , indica a presença de uma nova volta envolvendo os resíduos  $G_{28}SLQ_{31}$ . Há indícios da existência desse novo ROE  $d_{\alpha N}(S_{29}, Q_{31})$  nas duas outras temperaturas, porém o sinal é tão fraco que não pode ser distinguido, com total confiabilidade, do ruído.

Tabela 4: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep1.

restrição	283 K – 500 MHz	293 K – 500 MHz	303 K – 600 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$A_{25}E_{27}; E_{27}S_{29}^a$	$A_{25}E_{27}; E_{27}S_{29}$	$A_{25}E_{27}; E_{27}S_{29}; S_{29}Q_{31}$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$L_{26}^aE_{27}; E_{27}G_{28}; G_{28}S_{29}^a; L_{30}^aQ_{31}$	$L_{26}E_{27}; E_{27}G_{28}; G_{28}S_{29}; L_{30}Q_{31}$	$L_{30}Q_{31}$

<sup>a</sup> Ambigüidade, nessa temperatura, dos prótons amino dos resíduos  $Leu_{26}$ ,  $Ser_{29}$  e  $Leu_{30}$ .

### 3.1.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos

Conforme pode ser observado no espectro TOCSY na figura 14a os prótons  $H\delta$  da leucina<sub>26</sub> e leucina<sub>30</sub> estão não degenerados, com deslocamentos químicos bastante próximos aos valores tabelados (*random coil*) [56]. O mesmo pode ser observado para os prótons  $H\gamma$  e  $H\beta$  do ácido glutâmico<sub>27</sub>, ambos degenerados. Os prótons  $H\beta$  da glutamina<sub>31</sub> estão não degenerados e os prótons  $H\gamma$  estão degenerados; as linhas de ressonância de ambos são próximas aos valores tabelados randômicos [56], estando em acordo com conformações não estruturadas. Na figura 14b observa-se que a glicina<sub>28</sub> e a serina<sub>29</sub> possuem seus prótons  $H\alpha$  e  $H\beta$ , respectivamente, degenerados, típico de resíduos não envolvidos em uma estrutura secundária bem definida, com

linhas de ressonância em regiões próximas de conformações não estruturadas. Esse padrão repetiu-se nas três temperaturas medidas. De uma maneira geral, os valores para os deslocamentos químicos encontrados são compatíveis com uma estrutura irregular para o Pep1.

Pode-se verificar, ainda na figura 14b, a presença outras famílias conformacionais menos populadas (sinais fracos) evidenciadas por diferentes valores de deslocamento químico do próton do grupo amino dos resíduos glicina<sub>28</sub>, serina<sub>29</sub> e glutamina<sub>31</sub>. É interessante observar que, para a serina<sub>29</sub>, ocorre a quebra de degenerescência de seus prótons H $\beta$  em uma dessas conformações mais fracas, indicativo de que este resíduo está mais congelado, na escala de tempo de RMN, para uma das famílias conformacionais do peptídeo em solução.

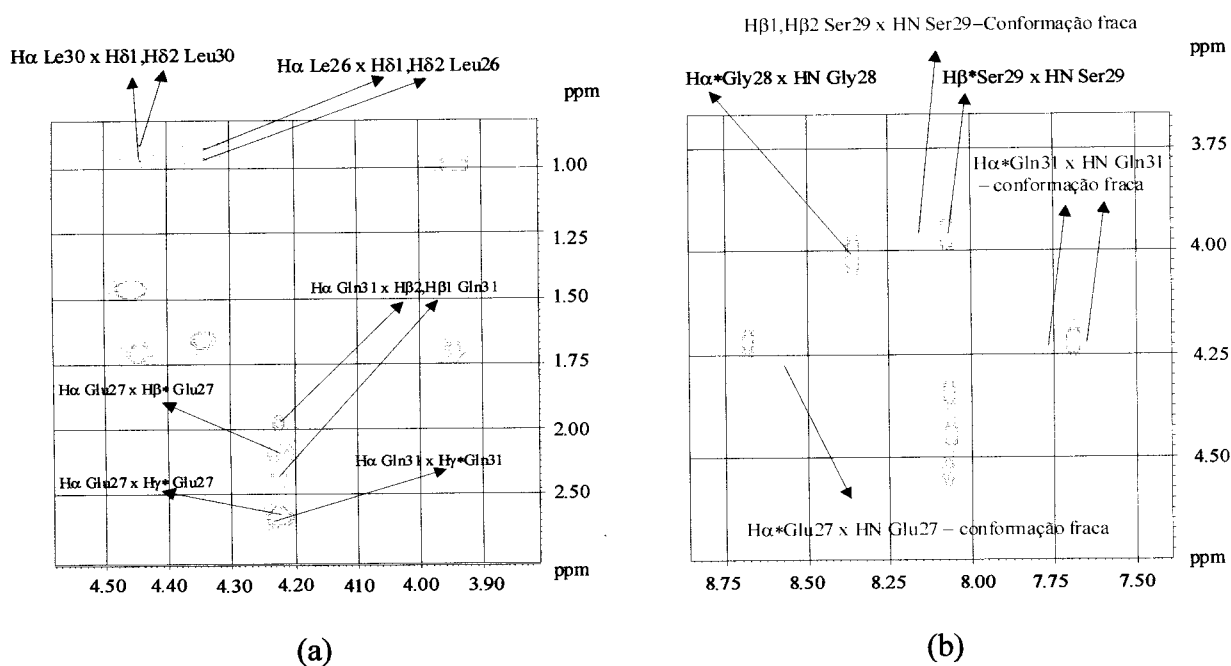


Figura 14. Espectro TOCSY do Pep1 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.

### 3.1.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura

A partir dos experimentos 1-D realizados às diferentes temperaturas, construiu-se uma tabela dos deslocamentos químicos  $\delta$  pela temperatura  $T$  para os prótons amino. Regressões

lineares foram realizadas com o uso do programa ORIGIN (Microcal) (figura 15). Somente os resíduos ácido glutâmico<sub>27</sub>, glicina<sub>28</sub> e glutamina<sub>31</sub> foram analisados, pois os demais prótons amino apresentam ambigüidade no espectro 1-D. As regressões lineares possuem um coeficiente de correlação maior que 0,99, sendo as taxas  $\Delta\delta/\Delta T$  de -6.2 ppb/K, -6.4 ppb/K, e -4.3 ppb/K respectivamente para os prótons HN do ácido glutâmico<sub>27</sub>, glicina<sub>28</sub> e glutamina<sub>31</sub>.

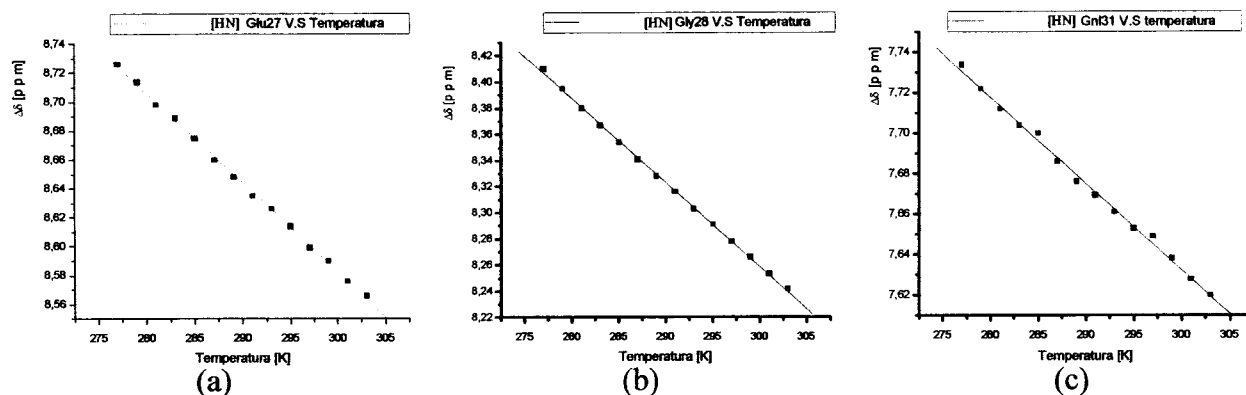


Figura 15: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep1: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (c) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.1.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura:

Na figura 16 vemos os espectros 1-D para a região de prótons amino em diversas temperaturas. Pode-se observar que, com o incremento da temperatura, as linhas de ressonância para os prótons amino da leucina<sub>26</sub>, ácido glutâmico<sub>27</sub>, glicina<sub>28</sub>, serina<sub>29</sub> e leucina<sub>30</sub> tornam-se mais largas e fracas. Exceção é o próton amino da glutamina<sub>31</sub>, que mantém a intensidade do sinal nesse incremento da temperatura, indicativo de estar pouco acessível ao solvente.

### 3.1.5. Constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$

O valores encontrados para as constantes de acoplamento são característicos de estruturas desordenadas ( $6 < ^3J_{\text{NH}\alpha} < 8$  Hz). Exceção é o ácido glutâmico<sub>27</sub>, o qual apresentou um valor um valor mais baixo (5.5 Hz em 283 K e 5.3 Hz em 293 K).

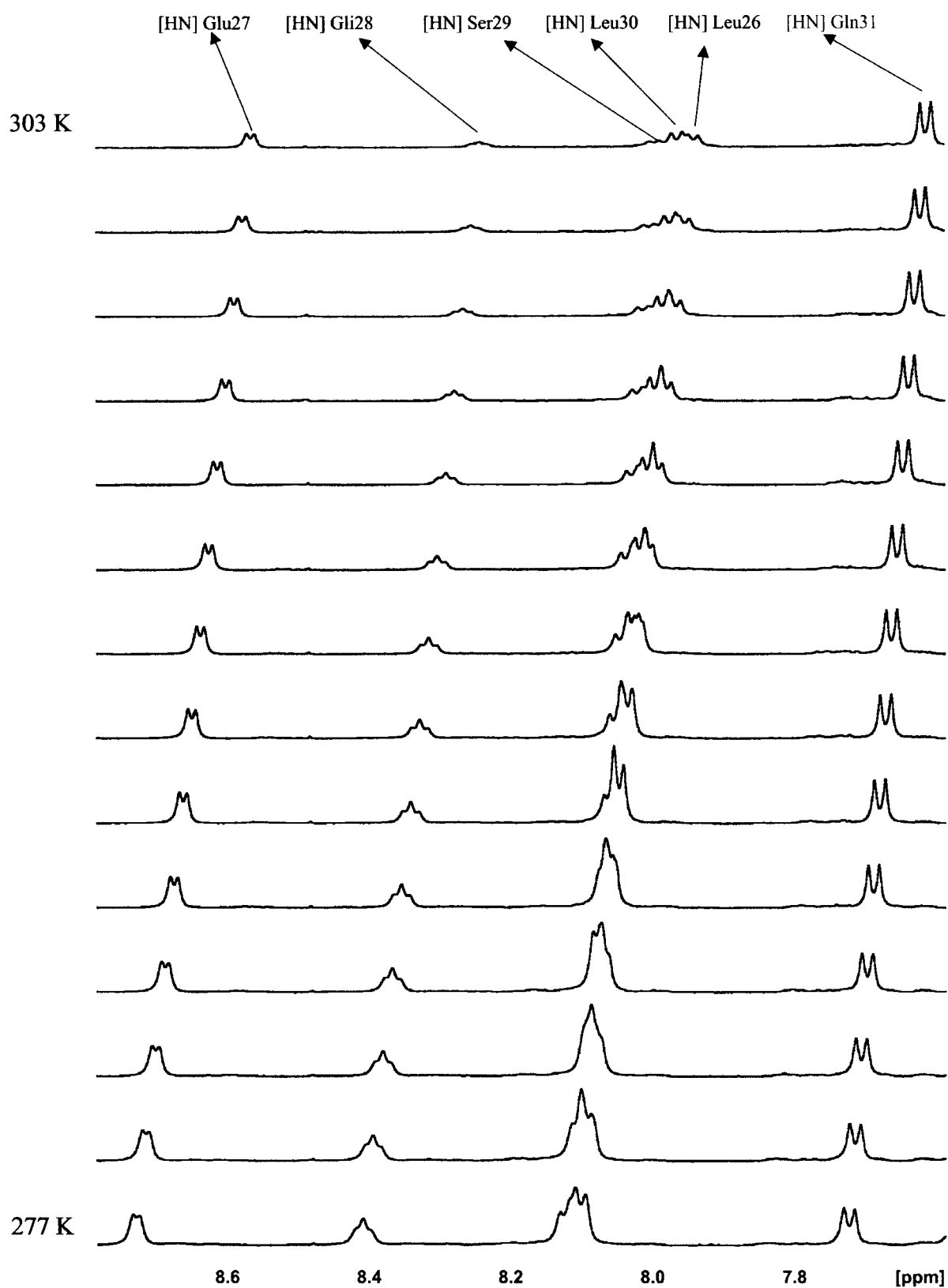


Figura 16: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep1. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.



### 3.1.6. Discussão do Pep1

Este peptídeo mostra uma coexistência de conformações distintas, evidenciado tanto pela presença de resíduos com mais de um valor para seu deslocamento químico HN (“sombras” nos espectros) quanto pela existência de diversas voltas envolvendo os resíduos.

A suposição da existência da volta  $G_{28}SLQ_{31}$ , apesar das ambigüidades presentes com relação aos seus ROEs característicos, é reforçada pelos indícios claros de que o próton HN da cadeia principal da glutamina<sub>31</sub> é doador para uma ponte de hidrogênio ( $\Delta\delta/\Delta T$  mais alto; manutenção da intensidade de seu sinal com a temperatura). A volta parece ser a conformação dominante na mais alta temperatura (303 K). Com a diminuição da temperatura (293 K e 283 K) as populações de duas outras conformações, com voltas  $L_{24}ALE_{27}$  e  $L_{26}EGS_{29}$ , parecem aumentar. Essas duas voltas não preenchem todos os critérios para a existência de voltas pois em nenhuma delas foram detectados indícios experimentais da existência de pontes de hidrogênio, e apenas o ácido glutâmico<sub>27</sub> apresentou um valor mais baixo para seu acoplamento  $^3J_{NH\alpha}$ .

Os valores encontrados para os deslocamentos químicos  $^1H$  das cadeias laterais, próximos aos tabelados [56], são coerentes com radicais expostos e flexíveis.

## 3.2. Pep2: ALEGS LQ

A amostra Pep2 corresponde aos 7 últimos resíduos da região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana. Seu assinalamento seqüencial  $^1H$  completo e suas constantes de acoplamento  $^3J_{NH\alpha}$  podem ser encontrados no anexo 2.

### 3.2.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas

As figuras 17 e 18 mostram, respectivamente, as regiões amino e *fingerpint* do espectro ROESY nas três temperaturas medidas.

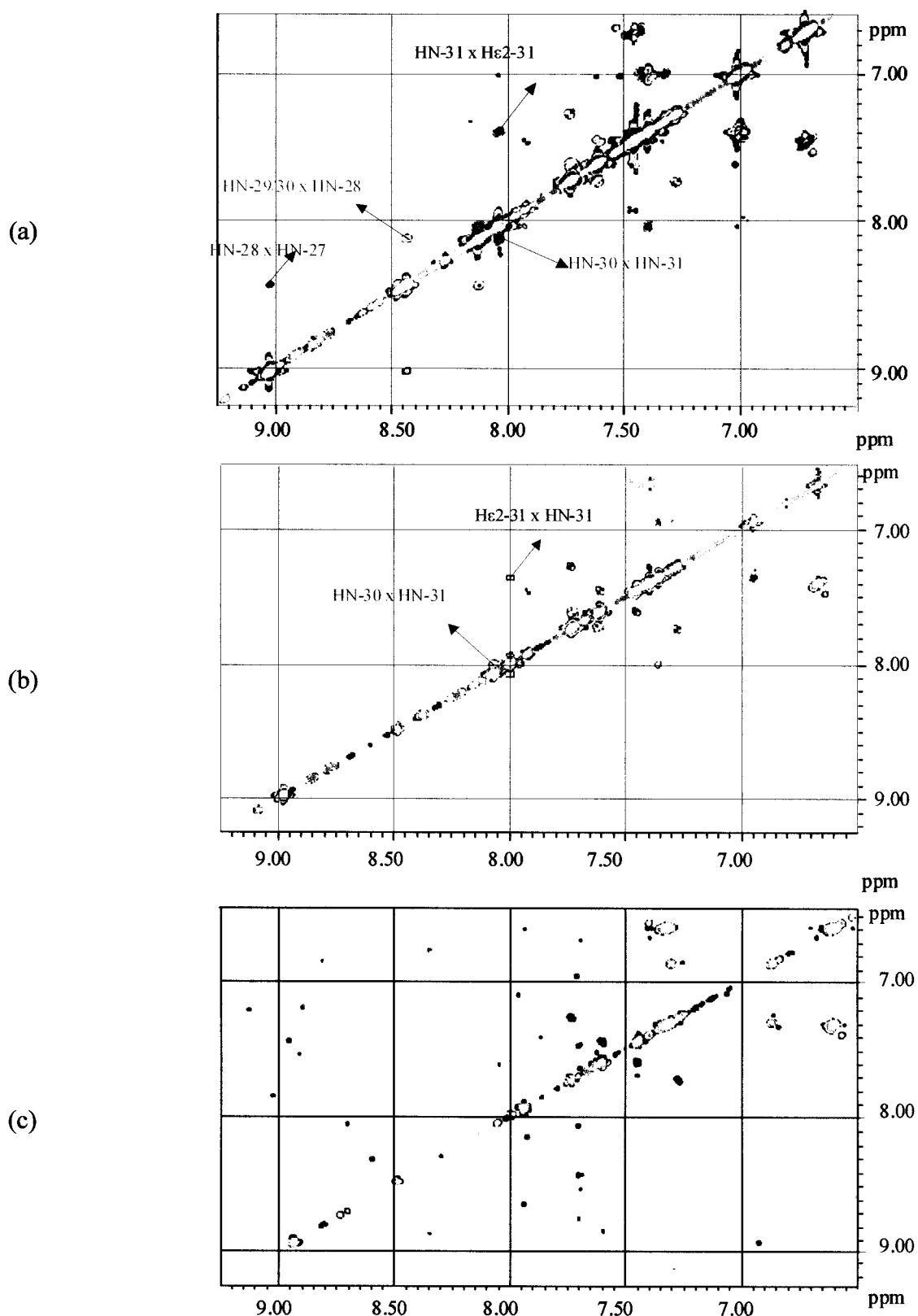


Figura 17: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep2. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600MHz.

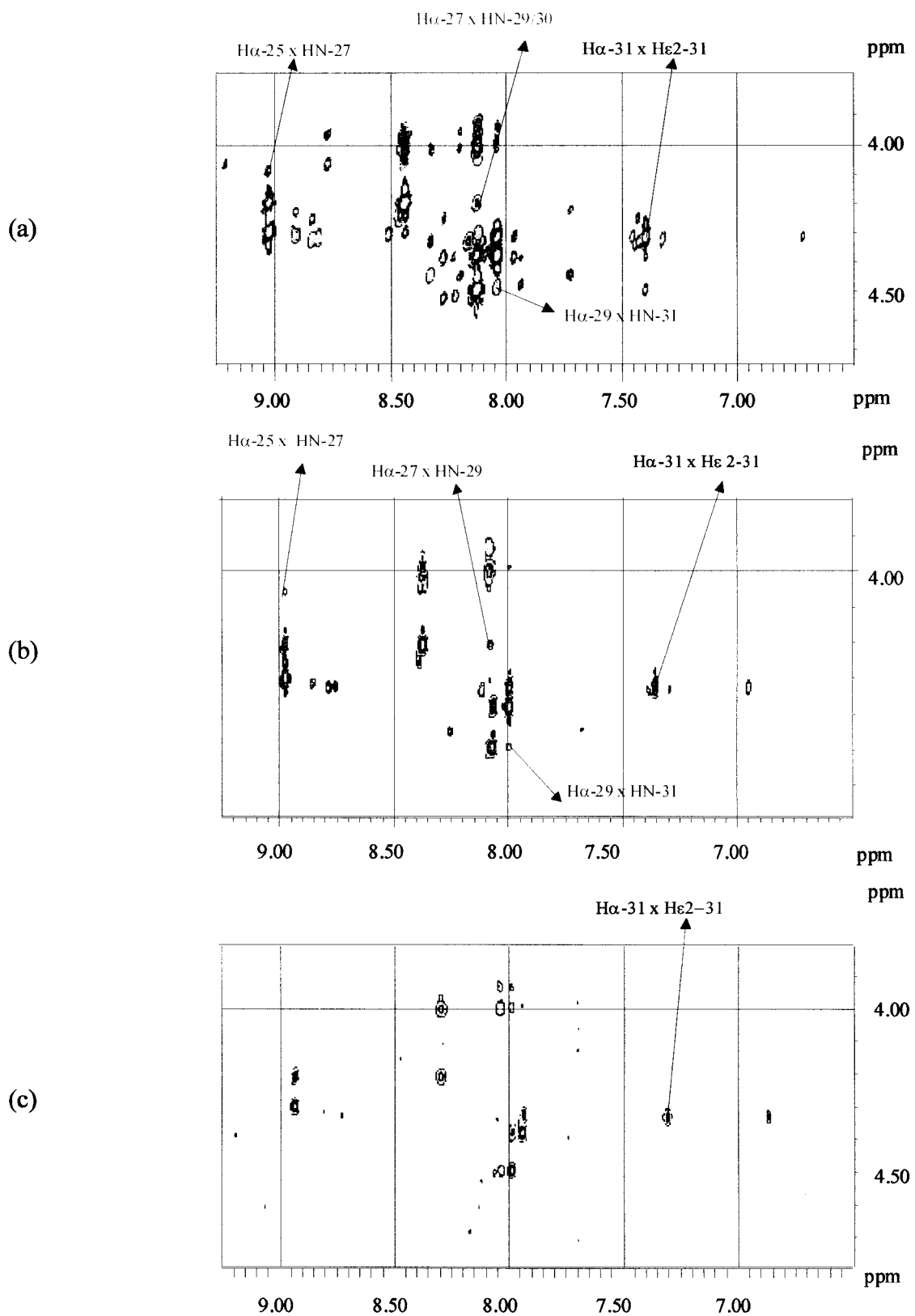


Figura 18: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep2. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.

Conforme esquematizado na tabela 5, dois conjunto de ROEs  $d_{\alpha N}(E_{27}, S_{29})$  com  $d_{NN}(G_{28}, S_{29})$ , e  $d_{\alpha N}(S_{29}, Q_{31})$  com  $d_{NN}(L_{30}, Q_{31})$  estão presentes a 283 K, sendo indícios fortes da existência de voltas envolvendo os resíduos  $L_{26}EGS_{29}$  e  $G_{28}SLQ_{31}$ . Em 293 K somente o conjunto de ROEs compatível com a presença da volta envolvendo os resíduos  $G_{28}SLQ_{31}$  permanece. Já em 303 K, nenhum indício de elementos de estrutura secundária pôde ser encontrado.

Tabela 5: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep2.

restrição	283 K – 600 MHz	293 K – 600 MHz	303 K – 600 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$A_{25}E_{27}; E_{27}S_{29}^a; S_{29}Q_{31}$	$E_{27}S_{29}; S_{29}Q_{31}$	$x^b$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$E_{27}G_{28}; G_{28}S_{29}^a; L_{30}^aQ_{31}$	$L_{30}Q_{31}$	$x^b$

<sup>a</sup> Ambigüidade, nessa temperatura, dos prótons amino dos resíduos  $Ser_{29}$  e  $Leu_{30}$ .

<sup>b</sup> x indica que a restrição não existe.

### 3.2.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos

A figura 19 mostra as regiões amino e *fingerprint* do espectro TOCSY para o Pep2 a 283 K.

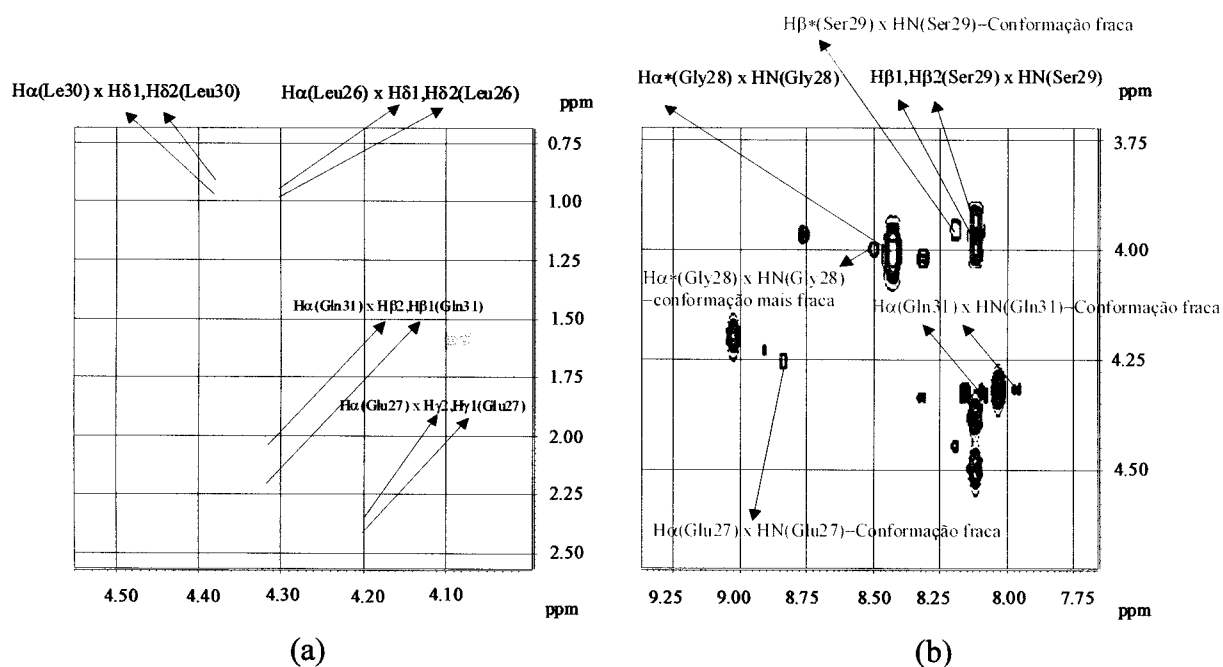


Figura 19. Espectro TOCSY do Pep2 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerpint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.

Pode-se observar (figura 19a) a quebra de degenerescência dos prótons H $\delta$  na leucina<sub>26</sub> e na leucina<sub>30</sub>, com deslocamentos químicos próximos aos valores tabelados [56]. O ácido glutâmico<sub>27</sub> possui prótons H $\beta$  degenerados e prótons H $\gamma$  não degenerados. A glutamina<sub>31</sub> possui prótons H $\beta$  não degenerados e prótons H $\gamma$  degenerados. É interessante observar (figura 19b) que a serina<sub>29</sub> possui os prótons H $\beta$  não degenerados, característicos de uma estrutura mais travada, enquanto que a glicina<sub>28</sub> possui seu par de prótons H $\alpha$  degenerados, característicos de conformações mais flexíveis. O padrão é mantido nas três temperaturas medidas.

Nos espectros do Pep2 também é visível a existência de outras conformações, evidenciada por diferentes valores de deslocamento químico para os prótons amino (figura 19b) do ácido glutâmico<sub>27</sub>, glicina<sub>28</sub>, serina<sub>29</sub> e glutamina<sub>31</sub>. O ácido glutâmico<sub>27</sub> possui três conformações visíveis no espectro, sendo uma delas muito mais intensa que as demais. A serina<sub>29</sub> possui uma população mais intensa com seus prótons H $\beta$  não degenerados, e outra mais fraca cujos prótons H $\beta$  estão degenerados. A glicina<sub>28</sub> apresenta outras conformações em 283K e 293 K, que, porém, desaparecem em 303 K. Curiosamente o próton da cadeia lateral H $\epsilon$ 2 da glutamina<sub>31</sub> se apresenta em dois conjuntos conformacionais visíveis, com distintos deslocamentos químicos. Uma das conformações apresenta ROEs intra-residuais deste próton (H $\epsilon$ 2) com os próton HN e H $\alpha$ , enquanto que na outra conformação o ROE (intra-residual) ocorre com o próton H $\gamma$ . Esses ROEs, oriundos de conformações distintas da glutamina<sub>31</sub>, indicam que o processo de troca conformacional do resíduo (ou mesmo da molécula) é lento o suficiente para ser distinguível na escala de tempo de RMN.

### 3.2.3. Experimentos 1-D de RMN e sua variação com a temperatura

A figura 20 mostra o comportamento do deslocamento químico  $\delta$  dos prótons amino com a temperatura  $T$ . O coeficiente de correlação da regressão foi de 0.99. As taxas de variação do

deslocamento químico pela temperatura  $\Delta\delta/\Delta T$  foram de  $-5.7$  ppb/K,  $-6.7$  ppb/K, e  $-4.4$  ppb/K, respectivamente, para o ácido glutâmico<sub>27</sub>, a glicina<sub>28</sub> e a glutamina<sub>31</sub>.

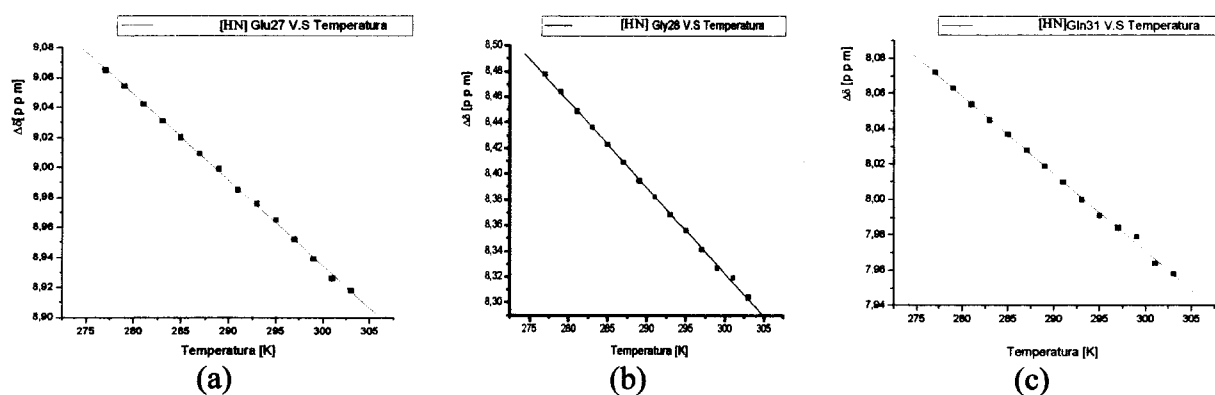


Figura 20: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep2: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (c) próton amino do glutamina<sub>31</sub>.

O comportamento dos 3 resíduos no Pep2 é similar ao encontrado no Pep1: os deslocamentos químicos do próton amino comportam-se linearmente com a temperatura para o intervalo medido, e apenas para a glutamina<sub>31</sub> a taxa  $\Delta\delta/\Delta T$  obtida indica a presença de ponte de hidrogênio intramolecular.

### 3.2.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura

A figura 21 mostra a variação do espectro 1-D para a região de prótons amino. Pode-se observar que, com o incremento da temperatura, todas as linhas de ressonância se tornam mais largas e fracas, não havendo, portanto, indícios da existência de pontes de hidrogênio envolvendo os prótons de grupos amino do Pep2.

### 3.2.5. Constantes de acoplamento ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$

O valores encontrados para as constantes de acoplamento são característicos de estruturas desordenadas ( $6 < {}^3J_{\text{NH}\alpha} < 8$  Hz). Exceção é o ácido glutâmico<sub>27</sub>, o qual apresentou um valor um valor mais baixo (4.9 Hz em 283 K e 5.0 Hz em 293 K).

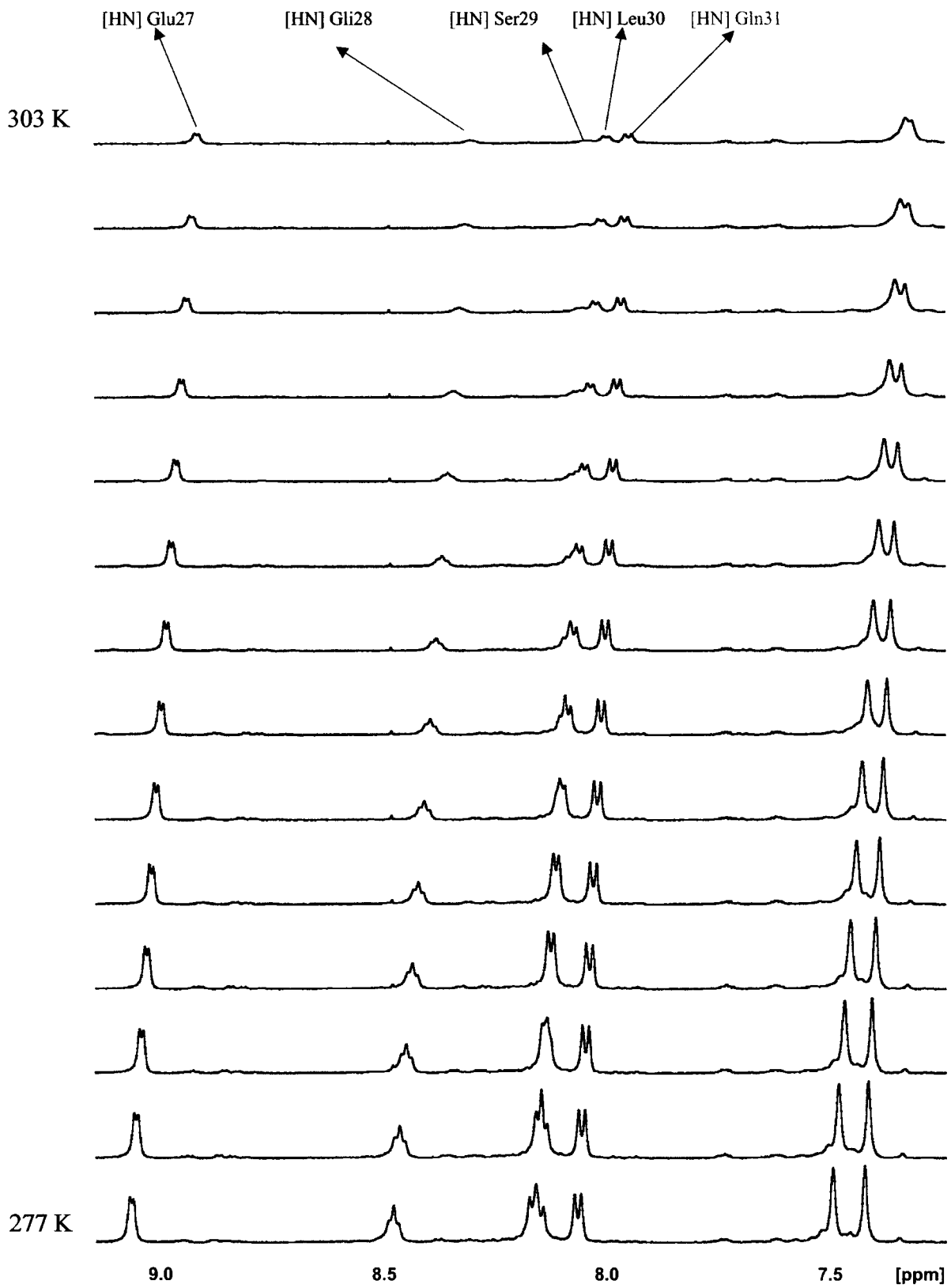


Figura 21: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep2. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.2.6. Discussão do Pep2

O Pep2 apresentou uma dependência significativa com a temperatura na análise de seus contatos ROEs: dentre as duas voltas previstas, envolvendo os resíduos L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub> e G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>, presentes a 283 K, apenas a segunda é mantida a 293 K e nenhuma delas parece existir a 303 K. Não há indícios da existência de pontes de hidrogênio, pois, de acordo com os experimentos 1-D, o peptídeo apresentou enfraquecimento da intensidade de todas as linha de ressonância de prótons amino pela temperatura, indicando um processo de troca com o solvente. As conformações com voltas L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub> e G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub> possivelmente são fracamente populadas em 283 K, e essas populações devem abaixar significativamente com o aumento da temperatura, deixando de ser detectáveis a 303 K.

O próton amino da glutamina<sub>31</sub> apresentou um valor para a taxa  $\Delta\delta/\Delta T$  pouco acima do valor limite (-4.5 ppb/K), comportamento em geral atribuído a uma perda de estruturação do peptídeo. Tal hipótese é coerente com o desaparecimento dos ROEs característicos de voltas com a temperatura.

Exceto pela quebra de degenerescência encontrada para os prótons H $\beta$  da serina<sub>29</sub>, os valores dos deslocamentos químicos dos prótons das cadeias laterais dos resíduos são compatíveis com radicais expostos e flexíveis.

### 3.3. Pep3: LEGSLQ

O Pep3 corresponde aos seis últimos resíduos da região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana. Seu assinalamento seqüencial <sup>1</sup>H completo e suas constantes de acoplamento <sup>3</sup>J<sub>NH $\alpha$</sub>  podem ser encontrados no anexo 3.

#### 3.3.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas



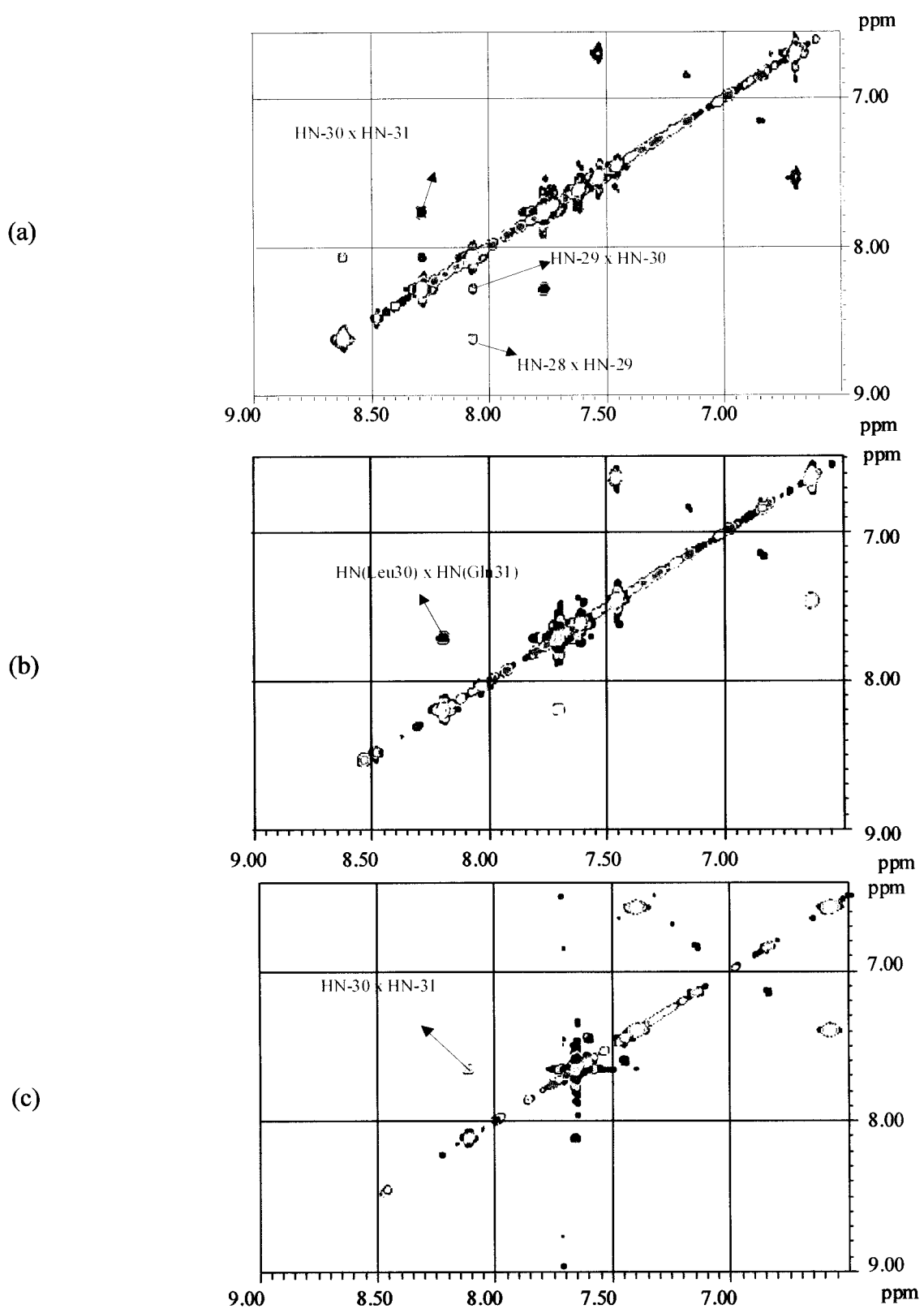


Figura 22: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep3. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.

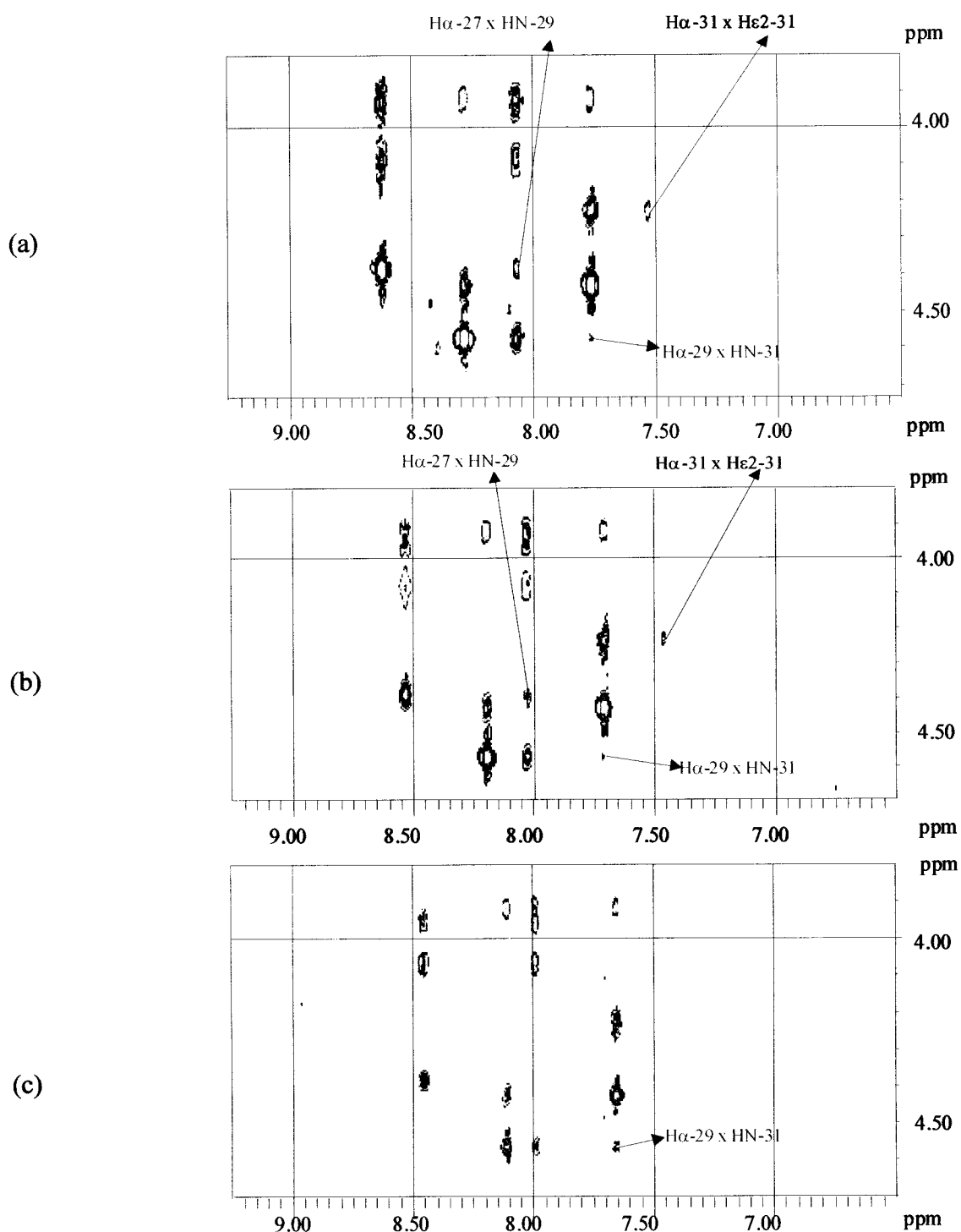


Figura 23: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep3. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 500 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.

Na figura 22 e 23 estão representadas as regiões amino-amino e *fingerprint* do espectro ROESY nas três temperaturas medidas para o Pep3.

Na tabela 6 os conjuntos de ROEs  $d_{\alpha N}(E_{27}, S_{29})$  com  $d_{NN}(G_{28}S_{29})$  e  $d_{\alpha N}(S_{29}, Q_{31})$  com  $d_{NN}(L_{30}Q_{31})$  podem ser observados a 283 K, sendo indícios fortes da existência de duas voltas, envolvendo os resíduos  $L_{26}EGS_{29}$  e  $G_{28}SLQ_{31}$ . Dentre elas apenas a segunda parece se manter a 293 K e 303 K. Em 293 K, apesar da existência da restrição  $d_{\alpha N}(E_{27}, S_{29})$ , o ROE  $d_{NN}(G_{28}S_{29})$  não está visível, e não fornece, portanto, o padrão característicos de volta para os resíduos  $L_{26}EGS_{29}$ .

Tabela 6: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep3.

restrição	283 K – 500 MHz	293 K – 500 MHz	303 K – 600 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$E_{27}S_{29}; S_{29}Q_{31}$	$E_{27}S_{29}; S_{29}Q_{31}$	$S_{29}Q_{31}$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$G_{28}S_{29}; S_{29}L_{30}; L_{30}Q_{31}$	$L_{30}Q_{31}$	$L_{30}Q_{31}$

### 3.3.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos

Pode-se observar, no espectro TOCSY da figura 24, a degenerescência dos prótons H $\delta$  da leucina e de prótons H $\gamma$  do ácido glutâmico<sub>27</sub> e da glutamina<sub>31</sub>, em acordo com os valores tabelados [56]. Os prótons H $\beta$  da serina<sub>29</sub> estão degenerados; já os prótons H $\alpha$  da glicina<sub>28</sub> estão não degenerados, indicando uma conformação mais travada para este resíduo. Multiconformações podem ser vista na figura 24b, principalmente para os prótons HN da leucina<sub>30</sub> e da glutamina<sub>31</sub>.

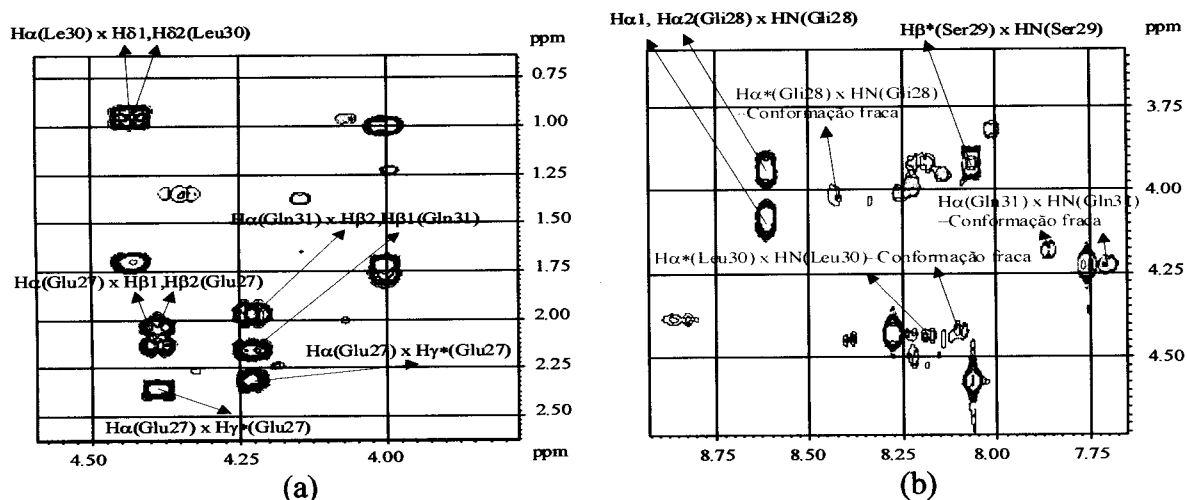


Figura 24. Espectro TOCSY do Pep3 em 283 K. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.

### 3.3.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura

A figura 25 mostra o comportamento do deslocamento químico  $\delta$  dos prótons amino com a temperatura  $T$ . O coeficiente de correlação da regressão foi de 0.99. Os resíduos glicina<sub>28</sub>, serina<sub>29</sub>, leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub> puderam ser analisados; as taxas de variação do deslocamento químico pela temperatura  $\Delta\delta/\Delta T$  foram, respectivamente, -8.5 ppb/K, -3.8 ppb/K, -8.7 ppb/K e -5.5 ppb/K.

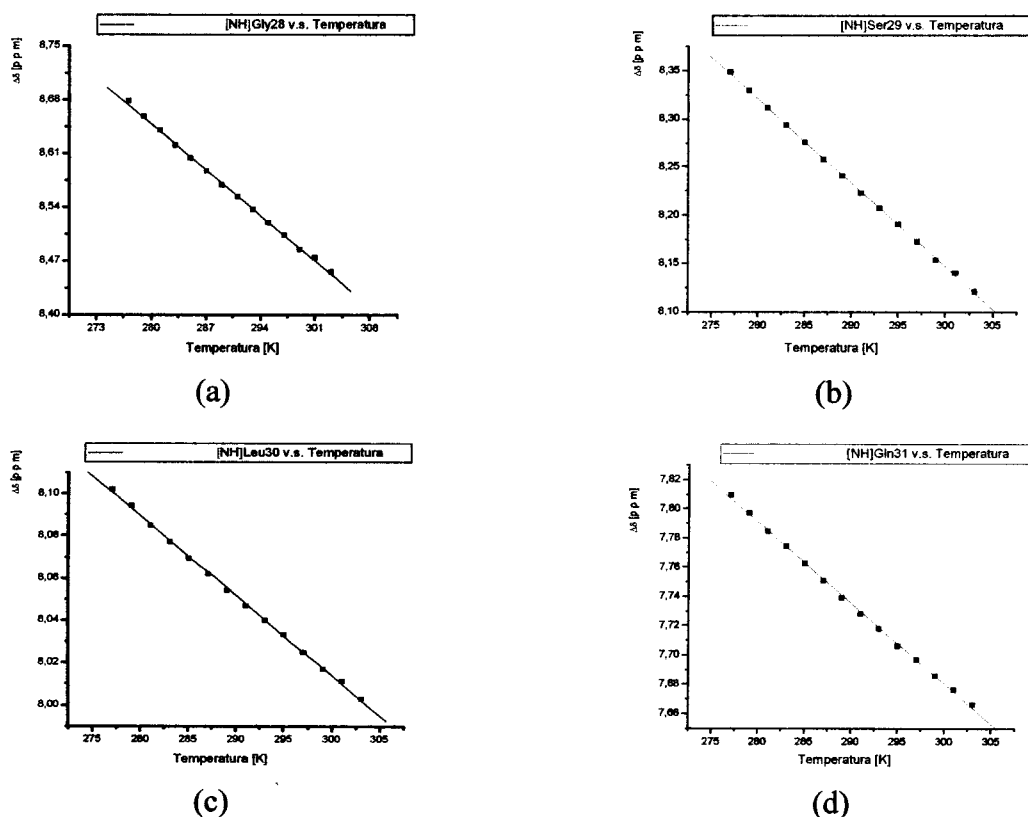


Figura 25: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep3: (a) próton amino da glicina<sub>28</sub>; (b) próton amino da serina<sub>29</sub>; (c) próton amino da leucina<sub>30</sub>; (d) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.3.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura

Na figura 26 temos a variação do espectro 1-D com a temperatura para a região de prótons amino. Pode-se observar que, exceto pela glutamina<sub>31</sub>, as linhas de ressonância para os prótons amino tornam-se mais fracas com o aumento da temperatura.

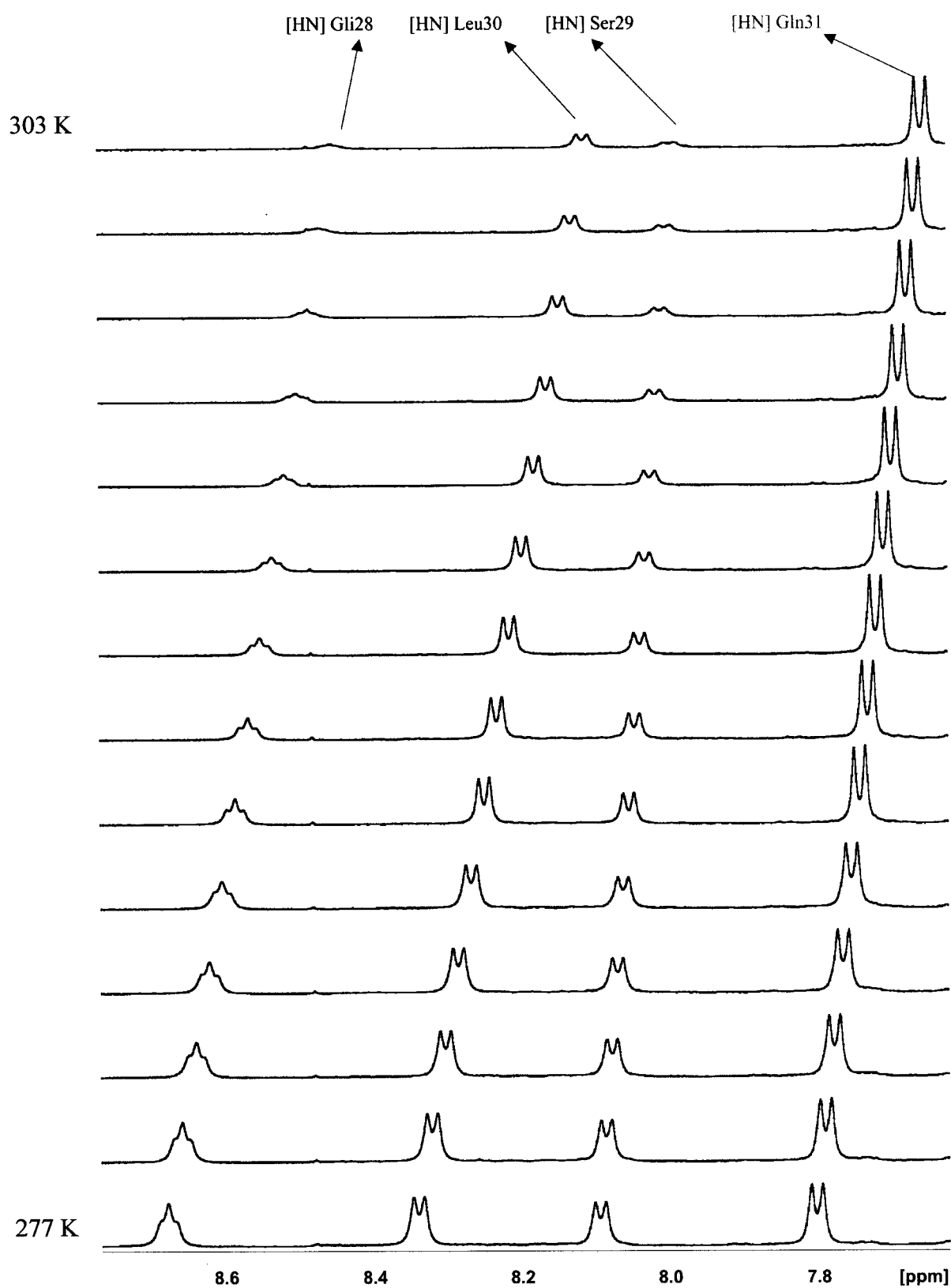


Figura 26: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep3. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.3.5. Constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$

O valores encontrados para  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  são característicos de estruturas desordenadas.

### 3.3.6. Discussão do Pep3

O Pep3 apresenta uma alta população de conformação com volta  $G_{28}SLQ_{31}$ : os ROEs característicos estão presentes e a ponte de hidrogênio envolvendo o quarto resíduo da volta é confirmada pela manutenção da intensidade do sinal de seu próton HN (cadeia principal) com a temperatura. A baixa taxa  $\Delta\delta/\Delta T$  encontrada para o próton HN do ácido glutâmico<sub>31</sub>, está, porém, fora do intervalo característico de átomos envolvidos em pontes de hidrogênio intramolecular, indicando que um segundo processo possa estar contribuindo ao coeficiente de temperatura.

A 283 K uma nova conformação, com uma volta  $L_{26}EGS_{29}$ , começa a aparecer, porém em mais baixa população (não preenche o critério da ponte de hidrogênio). O forte decaimento do sinal HN com a temperatura está em contradição ao valor encontrado para o coeficiente de temperatura da serina<sub>29</sub> (-3.8 ppb/K). Tal fato que pode estar indicando uma perda estrutural do peptídeo com o aumento da temperatura, o que justificaria a perda da volta  $L_{26}EGS_{29}$  com a temperatura.

Com exceção da glicina<sub>28</sub>, que apresentou uma quebra da degenerescência de seus prótons  $H\alpha$ , os valores dos deslocamentos químicos  $^1H$  encontrados para as cadeias laterais dos resíduos são compatíveis com radicais flexíveis e expostos.

## 3.4. Pep4: EGSLQ

O Pep4, mais curto entre os cinco peptídeos medidos, corresponde aos 5 últimos resíduos da região C-terminal do peptídeo-C da proinsulina humana. Seu assinalamento seqüencial  $^1H$  completo e suas constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  podem ser encontrados no anexo 4.

### 3.4.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas

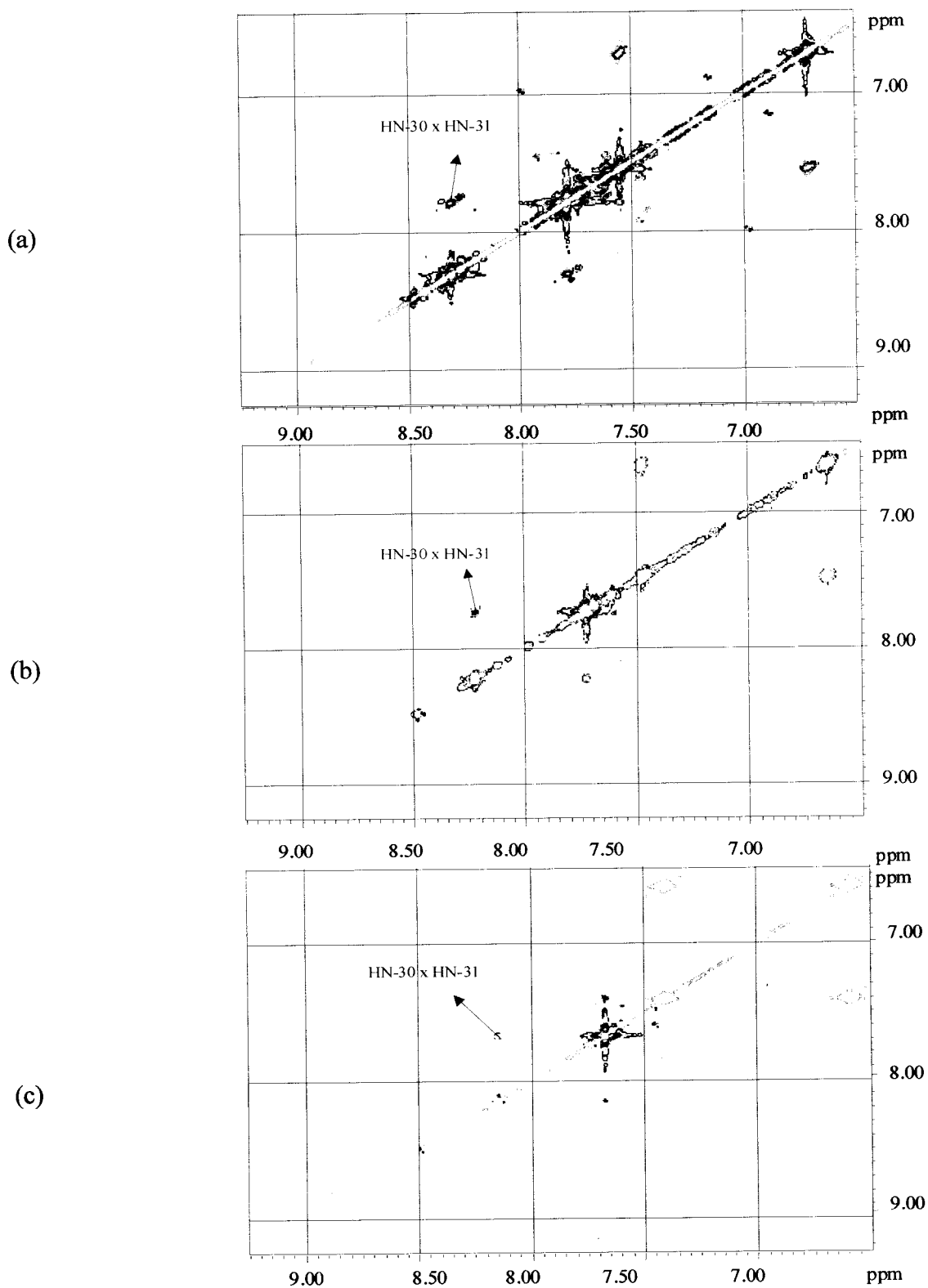


Figura 27: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep4. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600MHz.

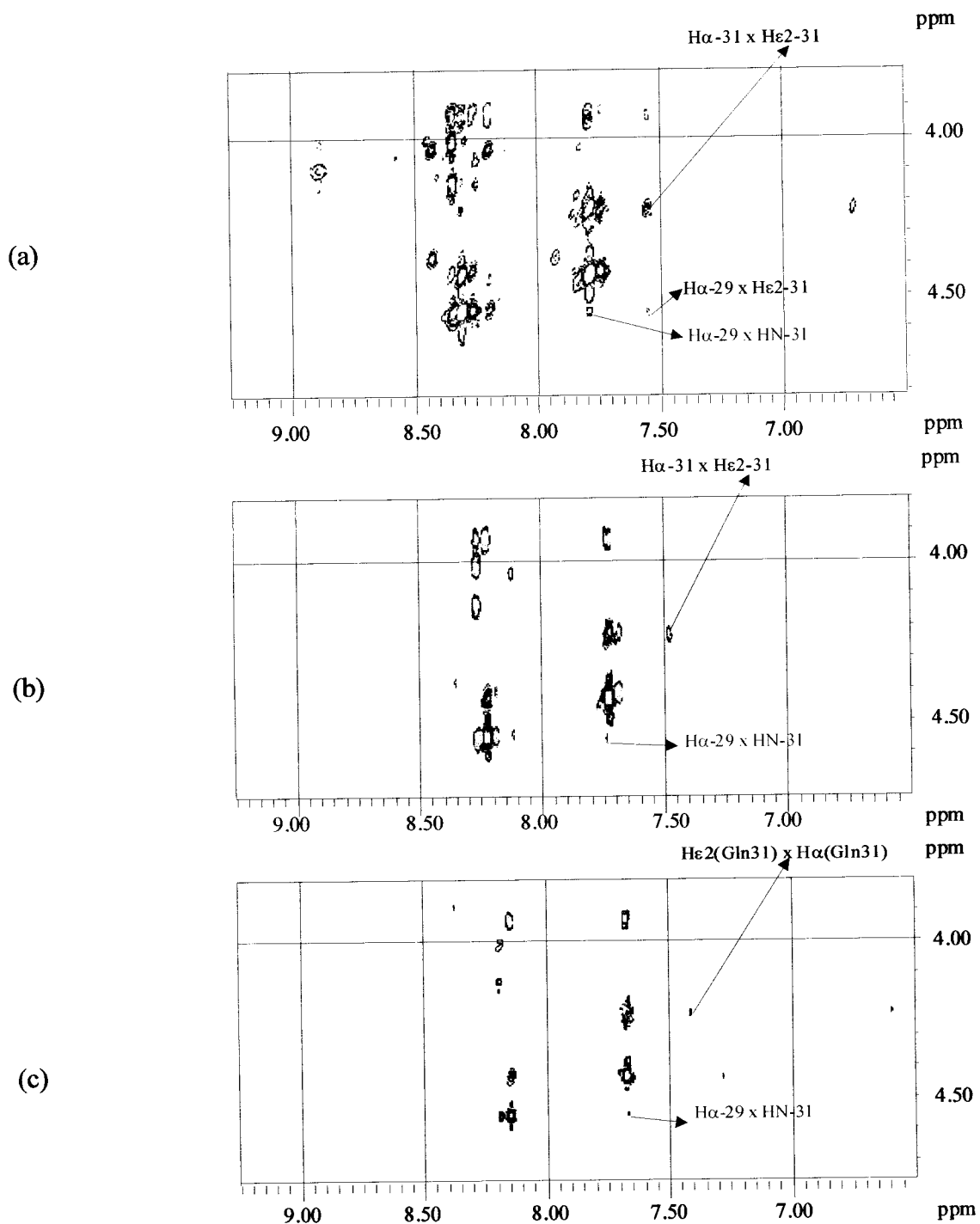


Figura 28: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep4. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 500 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.

As figuras 27 e 28 mostram, respectivamente, as regiões amino-amino e *fingerprint* do espectro ROESY nas três temperaturas medidas. Conforme mostrado na tabela 7, nas três



temperaturas medidas o mesmo conjunto de ROEs é observado:  $d_{\alpha N}(S_{29}, Q_{31})$  com  $d_{NN}(L_{30}, Q_{31})$ , indicando a existência de uma volta envolvendo os resíduos  $G_{28}SLQ_{31}$ .

Tabela 7: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep4.

restrição	283 K – 600 MHz	293 K – 500 MHz	303 K – 600 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$S_{29}Q_{31}$	$S_{29}Q_{31}$	$S_{29}Q_{31}$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$L_{30}Q_{31}$	$L_{30}Q_{31}$	$L_{30}Q_{31}$

### 3.4.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos

A figura 29 mostra o espectro TOCSY para o Pep4. Pode-se observar que os prótons  $H\delta$  da leucina<sub>30</sub> e  $H\beta$  da glutamina<sub>31</sub> estão não degenerados, enquanto que os prótons  $H\beta$  e  $H\gamma$  do ácido glutâmico<sub>27</sub> e  $H\gamma$  da glutamina<sub>31</sub> estão degenerados. Todos os prótons alifáticos possuem seus deslocamentos químicos em acordo com valores tabelados [56]. A presença de outras conformações, envolvendo a serina<sub>29</sub>, leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub>, pode ser vista na figura 29b. Os prótons  $H\alpha$  desse resíduo (glicina<sub>28</sub>) estão não degenerados, indicativo de estar mais travado. Os prótons  $H\beta$  da serina<sub>29</sub> estão degenerados, em acordo com o valor tabelado [56].

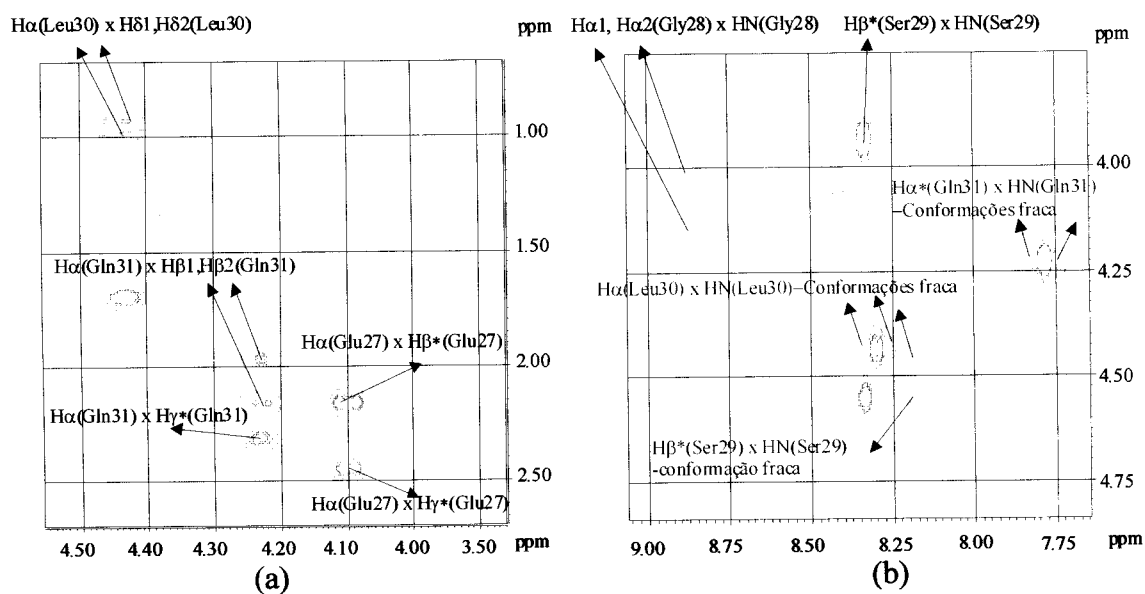


Figura 29. Espectro TOCSY do Pep4 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.

Ao contrário das outras amostras, no Pep4 a linha de ressonância HN do segundo resíduo (glicina<sub>28</sub>) pode ser observada em 283 K, mesmo que com um sinal bastante fraco (figura 29b), sugerindo uma menor taxa de troca desse próton com o solvente na baixa temperatura.

### 3.4.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura

A figura 30 mostra o comportamento do deslocamento químico dos prótons amino com a temperatura. As taxas de deslocamento químico pela temperatura  $\Delta\delta/\Delta T$  obtidas para os prótons amino (cadeia principal) da serina<sub>29</sub>, leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub> foram, respectivamente, -7.4 ppb/K, -7.7 ppb/K e -5.7 ppb/K.

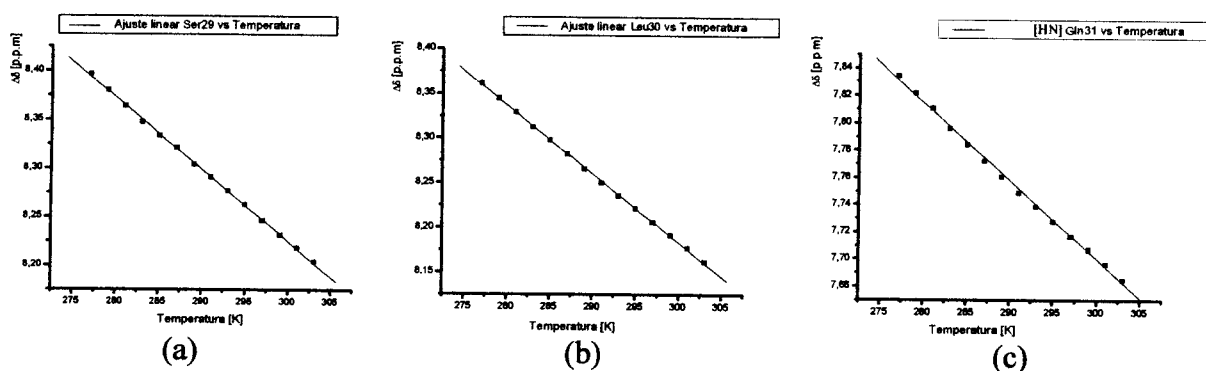


Figura 30: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep4: (a) próton amino da serina<sub>29</sub>; (b) próton amino da leucina<sub>30</sub>; (c) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.4.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura

Na figura 31 é mostrada a variação dos espectros 1-D com a temperatura para a região de prótons amino da cadeia principal. Pode-se observar que, exceto pela glutamina<sub>31</sub>, as linhas de ressonância para os prótons amino se tornam mais fracas com o aumento da temperatura.

### 3.4.5. Constantes de acoplamento $^3J_{NH\alpha}$

O valores encontrados para  $^3J_{NH\alpha}$  são característicos de estruturas desordenadas.

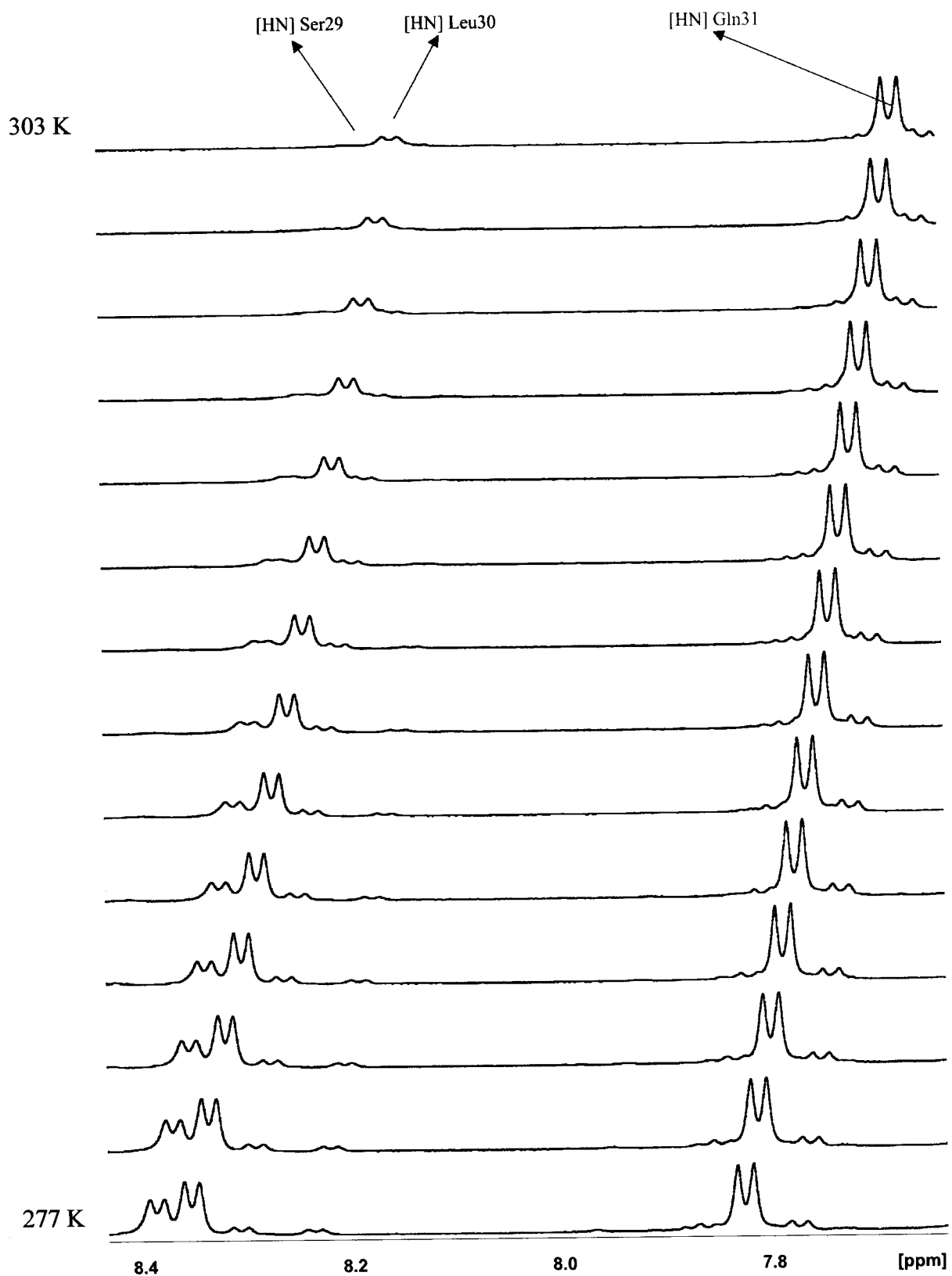


Figura 31: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep4. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

### 3.4.6. Discussão do Pep4

O Pep4 é a única entre as cinco amostras que apresenta apenas uma volta envolvendo os resíduos G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>, nas três temperaturas medidas. Tanto o padrão característico de ROEs está presente quanto a ponte de hidrogênio envolvendo o próton amino (cadeia principal) da glutamina<sub>31</sub> pode ser prevista em função da manutenção da intensidade de seu sinal de ressonância com a temperatura. O peptídeo não apresentou, entretanto, nenhuma taxa  $\Delta\delta/\Delta T$  para seus prótons amino característica de ponte de hidrogênio, o que pode novamente ser indicativo de uma perda estrutural. Conformações distintas estão presentes, conforme evidenciado pela presença de mais de um valor para o deslocamento químico HN dos resíduos (“sombras” nos espectros).

A glicina<sub>28</sub>, segundo resíduo da cadeia e primeiro resíduo da volta, apresentou um comportamento curioso: seus prótons H $\alpha$  estão não-degenerados e os sinais de correlação para com seu próton HN podem ser fracamente observados na baixa temperatura. Nos demais peptídeos os sinais de ressonâncias HN dos primeiros dois resíduos estava completamente ausente, em função de trocas com o solvente. Os valores de deslocamentos químicos <sup>1</sup>H encontrados para as cadeias laterais do Pep4 são compatíveis com radicais expostos e flexíveis.

## 3.5. Pep5: ALEVARQ

O Pep5, idêntico em comprimento ao peptídeo 2, corresponde aos 7 resíduos C-terminais do peptídeo-C da proinsulina do rato. Seu assinalamento seqüencial <sup>1</sup>H completo e suas constantes de acoplamento <sup>3</sup>J<sub>NH $\alpha$</sub>  podem ser encontrados no anexo.

### 3.5.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas

As figuras 32 e 33 mostram, respectivamente, as regiões amino-amino e *fingerprint* do espectro ROESY do Pep5 nas três temperaturas medidas.

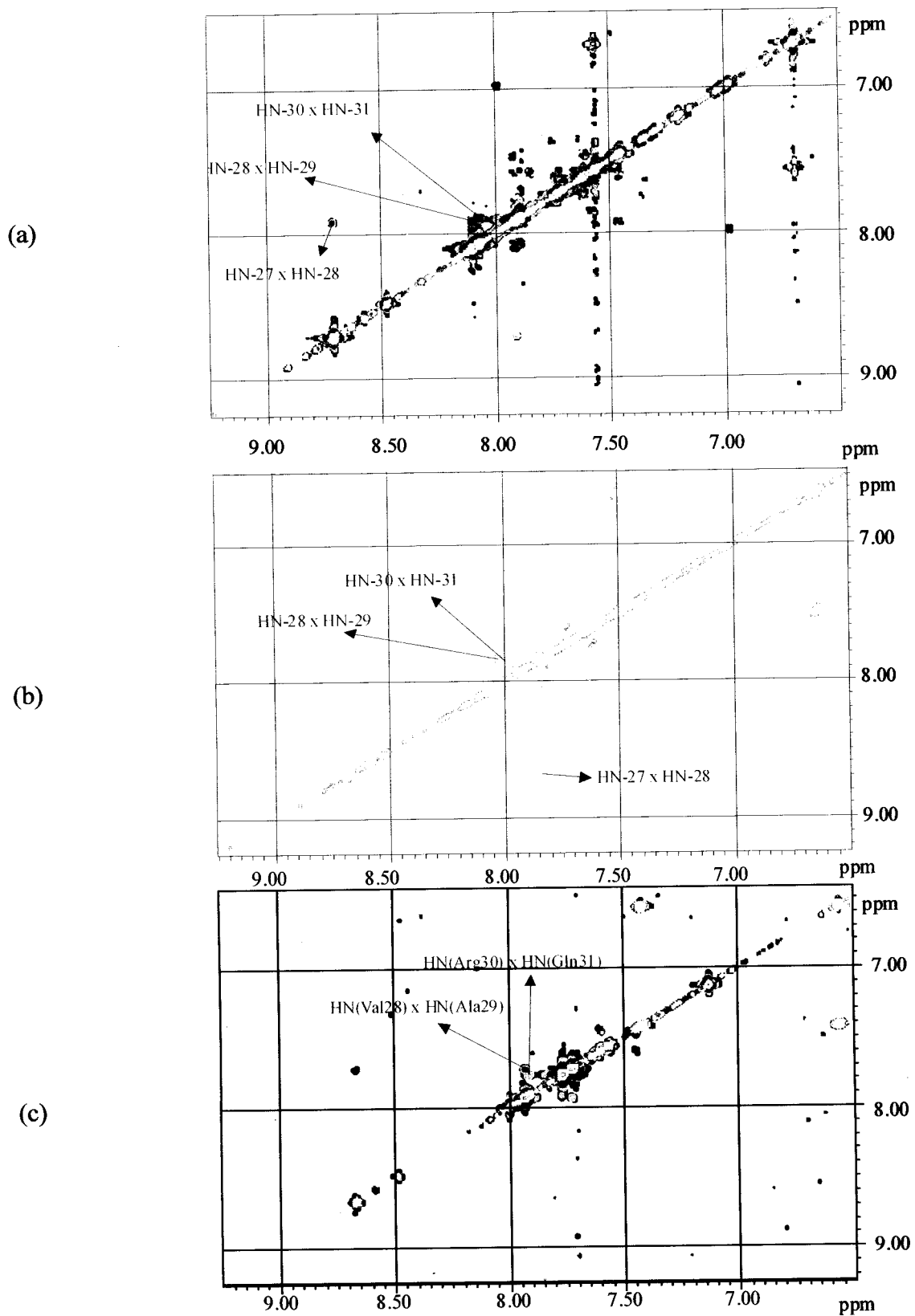


Figura 32: Espectro ROESY da região dos prótons amino do Pep5. As legendas em vermelho são as restrições, quando acompanhadas do respectivo ROE, consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600MHz.

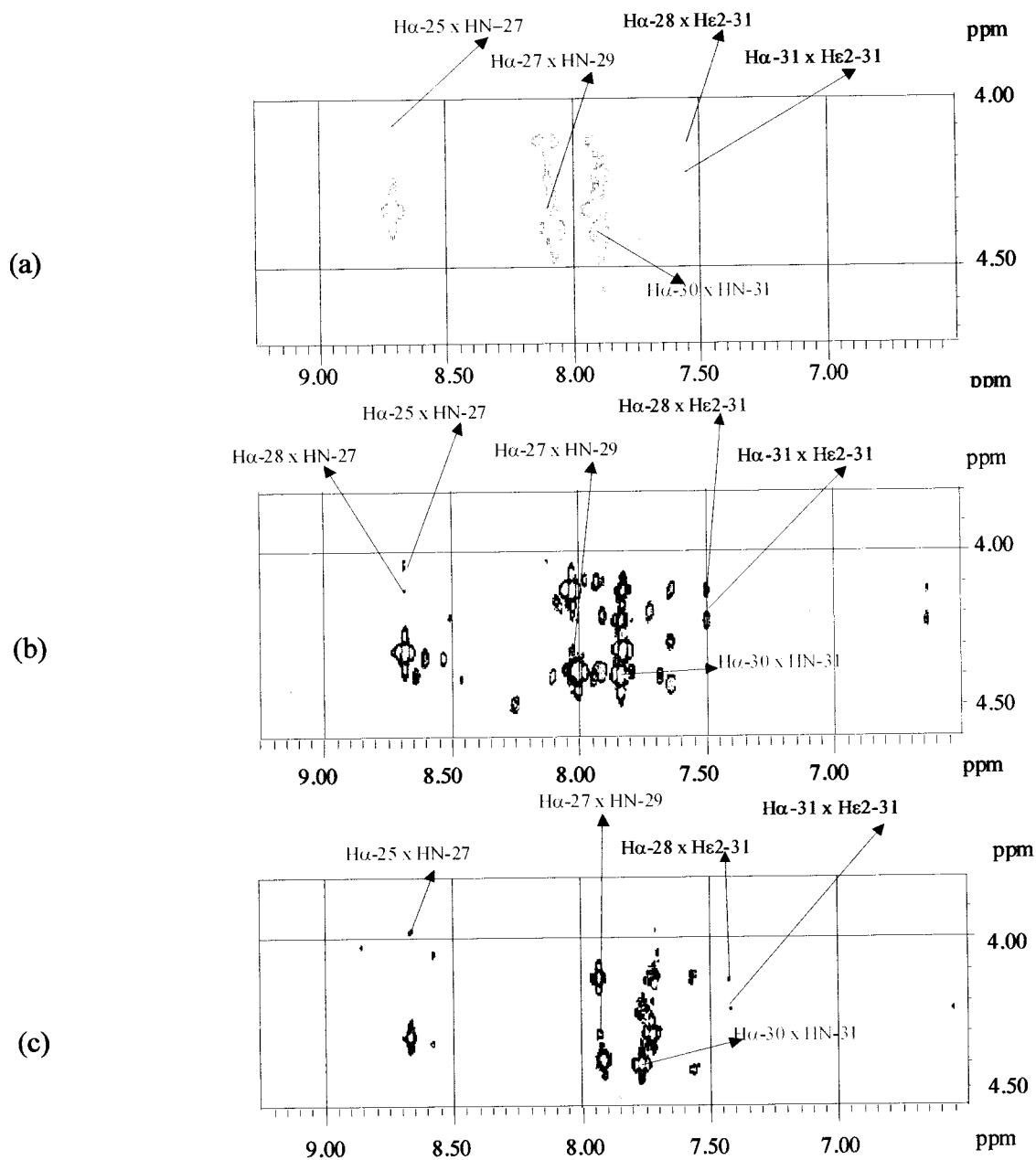


Figura 33: Espectro ROESY da região *fingerprint* do Pep5. As legendas em vermelho são restrições consistentes com a presença de voltas; em azul são as ambíguas. (a) 283 K – 600 MHz; (b) 293 K – 600 MHz; (c) 303 K – 600 MHz.

Na figura 33 pode ser observado um ROE ( $i, i+3$ ), ausente em todas as outras amostras:  $d_{\alpha\epsilon 2}(V_{28}, Q_{31})$ . O ROE aparece nas três temperaturas medidas.

Conforme indicado na tabela 8, dois conjuntos de ROEs são comuns às três temperaturas medidas:  $d_{\alpha N}(E_{27}, A_{29})$  com  $d_{NN}(V_{28}, A_{29})$ , e  $d_{\alpha N}(A_{29}, Q_{31})$  com  $d_{NN}(R_{30}, Q_{31})$ . O primeiro conjunto de ROEs permite supor a existência de uma volta envolvendo os resíduos  $L_{26}EVA_{29}$ . Já a

ambigüidade do segundo conjunto o ROE  $d_{\alpha N}(A_{29}, Q_{31})$ , sobreposto pelo intenso pico sequencial  $d_{\alpha N}(R_{30}, Q_{31})$ , dificulta a identificação da volta  $V_{28}ARQ_{31}$ . Nas baixas temperaturas (273 K e 283 K) existe a possibilidade de uma terceira volta,  $A_{25}LEV_{28}$ , em acordo com o conjunto de ROEs  $d_{\alpha N}(L_{26}, V_{28})$  com  $d_{NN}(E_{27}, V_{28})$ , a qual apresenta, novamente, dubiedade devido à sobreposição com o pico sequencial  $d_{\alpha N}(E_{27}, V_{28})$ . De uma forma geral, as restrições presentes na tabela sugerem sobreposições de voltas na seqüência peptídica.

Tabela 8: Restrições úteis para a verificação de voltas no Pep5.

restrição	283 K – 600 MHz	293 K – 600 MHz	303 K – 600 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$L_{26}^a V_{28}; E_{27}^a A_{29}; A_{29}^b Q_{31}$	$L_{26}^a V_{28}; E_{27}^a A_{29}; A_{29}^b Q_{31}$	$L_{26}^a V_{28}; E_{27}^a A_{29}; A_{29}^b Q_{31}$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$E_{27} V_{28}; V_{28} A_{29}; R_{30} Q_{31}$	$E_{27} V_{28}; V_{28} A_{29}; R_{30} Q_{31}$	$V_{28} A_{29}; R_{30} Q_{31}$

<sup>a</sup> Ambigüidade dos prótons  $H_{\alpha}$  dos resíduos  $Leu_{26}$  e  $Glu_{27}$ .

<sup>b</sup> Ambigüidade dos prótons  $H_{\alpha}$  dos resíduos  $Ala_{29}$  e  $Arg_{30}$ .

### 3.5.2. Degenerescência dos prótons e multiconformação dos resíduos

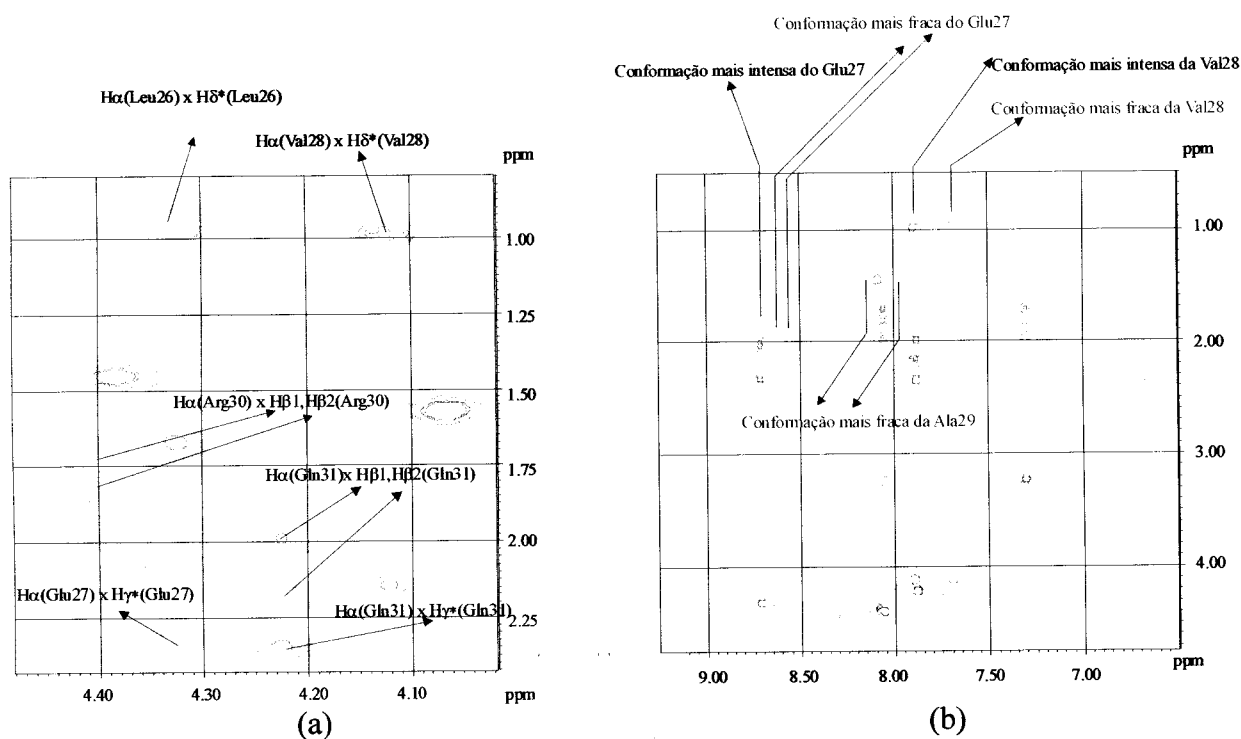


Figura 34. Espectro TOCSY do Pep5 em 283 K. Este padrão é semelhante nas três temperaturas medidas. (a) Região alifática; (b) região *fingerprint*, indicando, em azul, a conformação menos populada do peptídeo.

Nas regiões do espectro TOCSY mostradas na figura 34a e 34b podem ser observadas as degenerescências encontradas nos resíduos. Com exceção do próton H $\beta$  da valina<sub>28</sub> e H $\gamma$  da arginina<sub>30</sub>, que possuem um desvio químico maior que 0,2 ppm da região de conformação não estruturada, os prótons da cadeia lateral do peptídeo comportam-se como em uma conformação randômica, tanto com relação a seus deslocamentos químicos quanto pelas degenerescências encontradas. Na figura 34b podem, ainda, ser observadas multiconformações da molécula envolvendo os resíduos ácido glutâmico<sub>27</sub>, valina<sub>28</sub> e alanina<sub>29</sub>.

### 3.5.3. Experimentos 1-D e sua variação com a temperatura

A figura 35 mostra o comportamento do deslocamento químico com a temperatura para os prótons amino dos resíduos ácido glutâmico<sub>27</sub>, valina<sub>28</sub>, alanina<sub>29</sub>, arginina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub>.

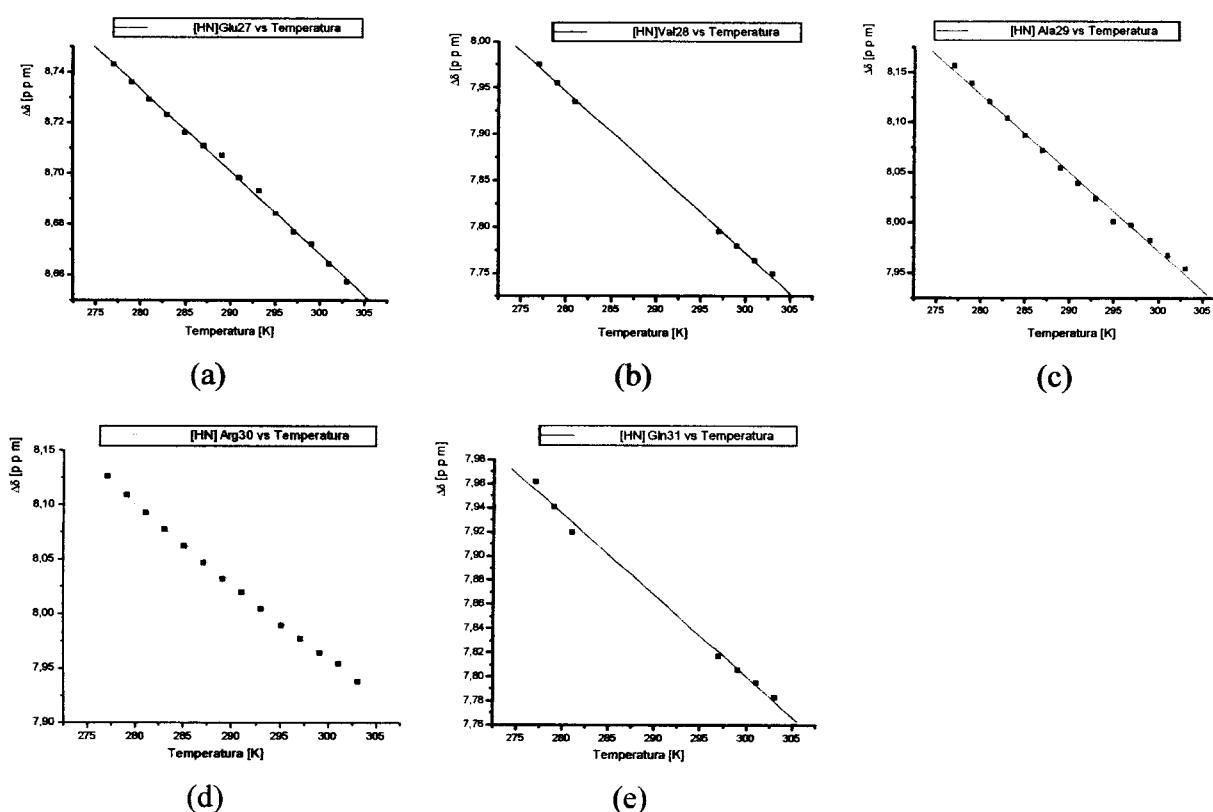


Figura 35: Variação do deslocamento químico pela temperatura no intervalo de 277 K até 303 K, para o Pep5: (a) próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub>; (b) próton amino da valina<sub>28</sub>; (c) próton amino da alanina<sub>29</sub>; (d) próton amino da arginina<sub>30</sub>; (e) próton amino da glutamina<sub>31</sub>.



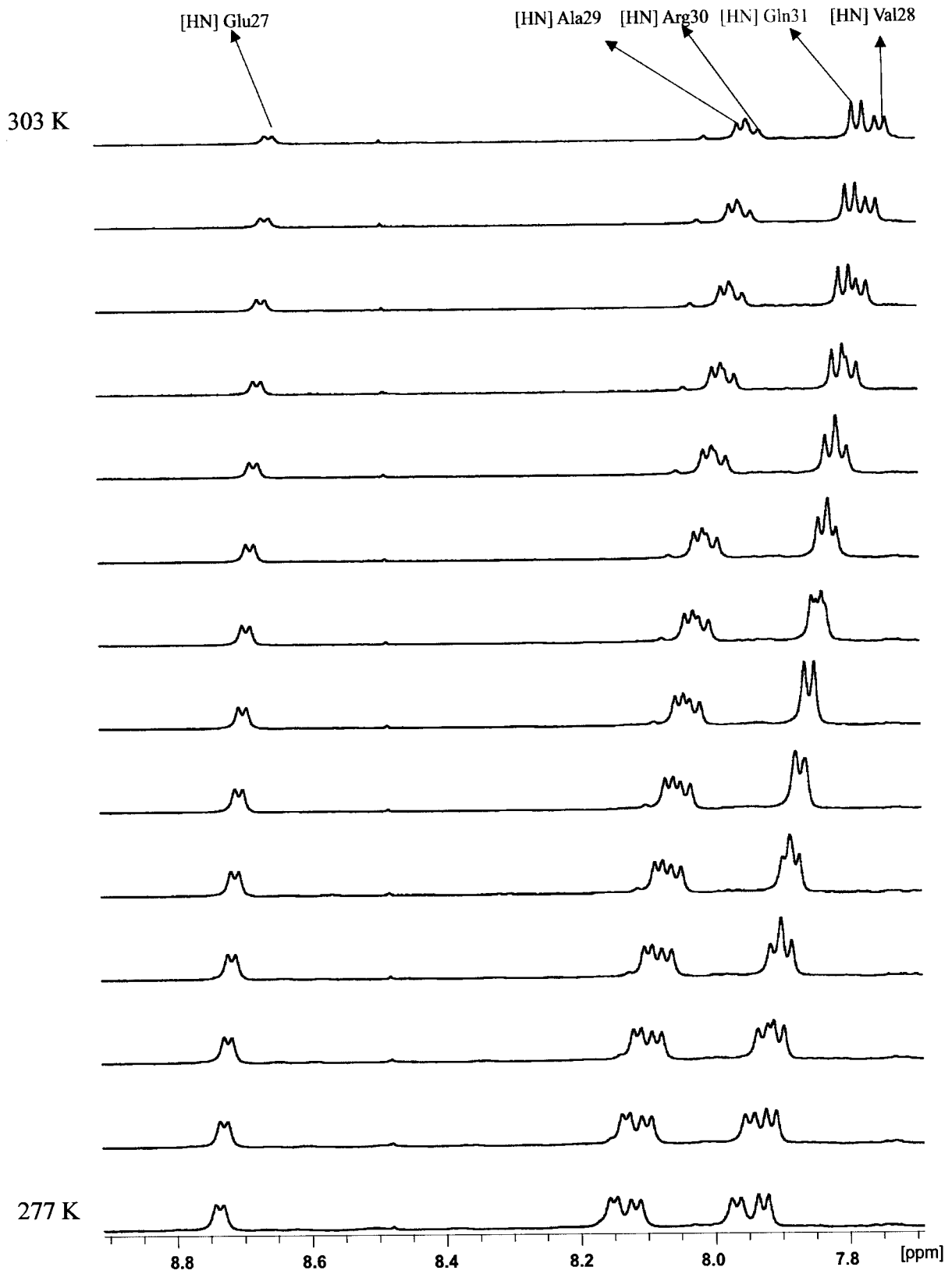


Figura 36: Gráfico da variação da intensidade do deslocamento químico para prótons amino pela temperatura para o Pep5. Destacado em vermelho o comportamento do sinal do próton amino da glutamina<sub>31</sub>.

As regressões lineares forneceram um coeficiente de correlação maior que 0.99. As taxas do deslocamento químico pela temperatura  $\Delta\delta/\Delta T$  foram de -3.3 ppb/K, -8.7 ppb/K, -7.8 ppb/k, -7.2 ppb/K, e -6.7 ppb/K, respectivamente, para os prótons HN do ácido glutâmico<sub>27</sub>, valina<sub>28</sub>, alanina<sub>29</sub>, arginina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub>.

#### 3.5.4. A intensidade dos prótons amino pela temperatura

A figura 36 mostra a variação dos espectros 1-D (região de prótons amino) com o incremento da temperatura. Pode-se observar que, exceto pela glutamina<sub>31</sub>, as linhas de ressonância para os prótons amino se tornam mais fracas e largas com o incremento da temperatura.

#### 3.5.5. Constantes de acoplamento $^3J_{\text{NH}\alpha}$

O valores encontrados para as constantes de acoplamento são característicos de estruturas desordenadas ( $6 < ^3J_{\text{NH}\alpha} < 8$  Hz).

#### 3.5.6. Discussão do Pep5

O Pep5 parece ser o mais estruturado entre os cinco peptídeos (Pep1 a Pep5), possuindo uma quantidade significativamente maior de ROEs inter-residuais no espectro ROESY, sendo também o único a apresentar um ROE entre prótons separados por mais de dois resíduos. O contato  $d_{\alpha\epsilon 2}(V_{28}, Q_{31})$  é não-ambíguo e está presente nas 3 temperaturas. As demais restrições observadas são, em grande parte, ambíguas, dificultando uma análise, como ocorre nas possíveis voltas envolvendo os resíduos  $A_{25}LEV_{28}$  (apenas em 283 K e 293 K) e  $V_{28}ARQ_{31}$ , ambas apresentando ambigüidade em seus ROEs característicos. Apenas um conjunto de ROEs sem ambigüidades foi observado nas três temperaturas, indicando a existência de uma volta envolvendo os resíduos  $L_{26}EGS_{29}$ . Somente o próton HN (cadeia principal) da glutamina<sub>31</sub> apresentou uma manutenção de

seu sinal HN da cadeia principal com a temperatura, indicando ser um doador em uma ponte de hidrogênio, de forma que apenas a volta V<sub>28</sub>ARQ<sub>31</sub> preenche os critérios para a existência de uma volta. Novamente, a baixa taxa  $\Delta\delta/\Delta T$  (-6.7 ppb/K) sugere a desestruturação do peptídeo com a temperatura.

O peptídeo apresentou um coeficiente de temperatura significativamente alto para o próton amino do ácido glutâmico<sub>27</sub> (-3.3 ppb/K), porém o fato da intensidade de seu sinal diminuir consideravelmente com o aumento da temperatura leva a crer que outros mecanismos estão contribuindo ao coeficiente de temperatura. Pelo tamanho do peptídeo o resíduo não poderia ser o quarto resíduo de uma volta- $\beta$ , portanto o alto valor encontrado é bastante curioso, e com certeza merece ser estudado posteriormente.

Com exceção da valina<sub>28</sub> (H $\beta$ ) e arginina<sub>30</sub>, (H $\gamma$ ) os valores dos deslocamentos químicos dos prótons das cadeias laterais dos resíduos são próximos aos tabelados [56].

### **3.6. Peptídeo-C humano: região C-terminal**

No estudo do peptídeo-C humano, realizado por Munte *et al* [35], foi verificada a existência de uma volta- $\beta$  tipo III' na temperatura de 283 K. Isso motivou-nos a verificar a estabilidade dessa volta com a temperatura. O assinalamento das linhas de ressonância <sup>1</sup>H para o peptídeo-C pode ser encontrado nos anexos VI e VII e VIII, respectivamente nas temperaturas de 283 K, 298 K e 303 K. O espectro da região C-terminal foi analisado de forma análoga às amostras Pep1, Pep2, Pep3, Pep4 e Pep5.

#### **3.6.1. Restrições experimentais de distância na identificação de evidência de voltas**

Na tabela 9 estão as restrições relevantes encontradas nos 7 resíduos C-terminais do peptídeo C humano.

Tabela 9: Restrições úteis para a verificação de voltas no pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano.

restrição	283 K – 600 MHz	298 K – 600 MHz	303 K – 500 MHz
$d_{\alpha N}(i+1, i+3)$	$E_{27}S_{29}; (G_{28}L_{30})^a$	$(E_{27}S_{29})^a; (G_{28}L_{30})^a$	$(E_{27}S_{29})^a; (G_{28}L_{30})^a$
$d_{NN}(i+2, i+3)$	$G_{28}S_{29}; S_{29}L_{30}; L_{30}Q_{31}$	$(G_{28}S_{29})^a; (S_{29}L_{30})^a; (L_{30}Q_{31})^a$	$(G_{28}S_{29})^a; L_{30}Q_{31}$
$d_{NN}(i+1, i+3)$	$(E_{27}S_{29})^a; G_{28}L_{30}; S_{29}Q_{31}$	$(G_{28}L_{30})^a$	$x^b$
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	$(L_{26}S_{29})^a; E_{27}L_{30}; (G_{28}Q_{31})^a$	$(L_{26}S_{29})^a; (E_{27}L_{30})^a$	$x^b$

<sup>a</sup> ambigüidade na restrição.

<sup>b</sup> x indica que não existem restrições.

Ao contrário do que ocorre nos peptídeos pequenos (Pep1 a Pep5), na região C-terminal do peptídeo-C são observadas restrições não-ambíguas do tipo  $d_{NN}(i+1, i+3)$  e  $d_{\alpha N}(i, i+3)$  a 283 K. Em 303 K tais restrições não estão presentes, e em 298 K a sobreposição de picos leva a uma ambigüidade de todos os ROEs relevantes. Visto ao grande número de ambigüidades, nenhuma volta pôde ser identificada em 298 K e 303 K.

### 3.6.2. Variação do deslocamento químico

A figura 37 mostra a diferença dos valores dos deslocamentos químicos  $H\alpha$  e HN com relação aos valores tabelados [56], nas três temperaturas. Pode-se observar que o padrão encontrado para os desvios é mantido. Os prótons amino apresentam um desvio sistemático para alto campo com relação aos valores tabelados [56], resultado da adição de TFE. Para a maioria dos resíduos o desvio aumenta significativamente com o incremento da temperatura, resultando em coeficientes de temperatura negativos e pequenos (*random*). Exceções são os resíduos leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub>. A leucina<sub>30</sub>, apesar de mostrar um desvio negativo, possui uma variação muito pequena e portanto um coeficiente de temperatura grande. Na glutamina<sub>31</sub> pode ser claramente observado um desvio positivo, novamente resultando em um coeficiente de temperatura grande. Tal fato pode estar associado com a presença de pontes de hidrogênio envolvendo os átomos.

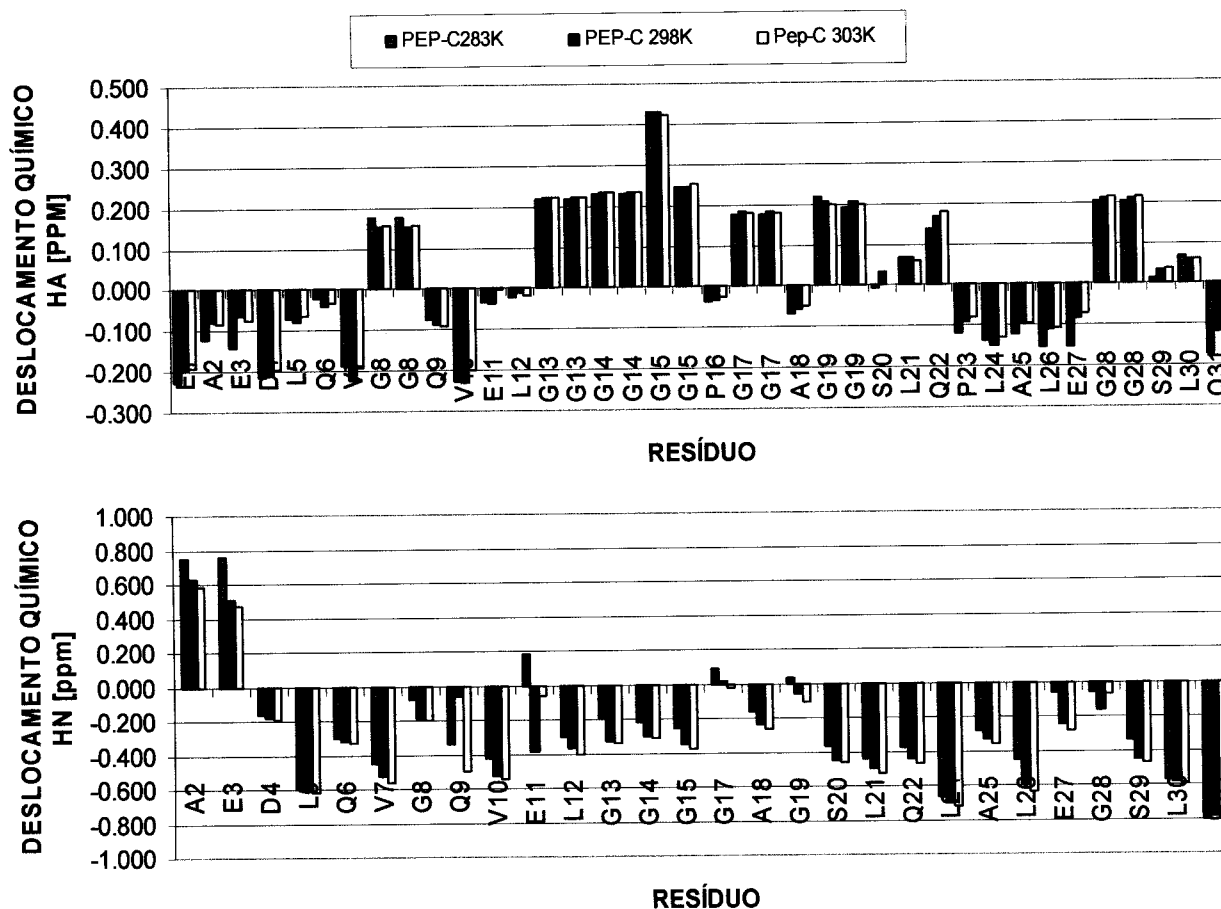


Figura 37: Diferença dos deslocamentos químicos com relação aos valores tabelados [56] para os prótons  $H\alpha$  e  $HN$  (cadeia principal) do peptídeo-C humano em 283 K (azul), 298 K (vinho) e 303 K (amarelo).

A grande sobreposição de picos inviabiliza os experimentos 1-D para verificação dos deslocamentos químicos com a temperatura, conforme realizado nos 5 peptídeos. Coeficientes de temperatura para os resíduos C-terminais foram, portando, estimados a partir dos espectros 2-D obtidos nas 3 temperaturas. Os valores obtidos para os prótons  $HN$  da cadeia principal dos resíduos ácido glutâmico<sub>27</sub>, glicina<sub>28</sub>, serina<sub>29</sub>, leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub> foram, respectivamente, -12.6 ppb/K, -7.9 ppb/K, -7.2 ppb/K, -1.3 ppb/K e 0.7 ppb/K. Os valores encontrados para os dois últimos resíduos sugerem que seus átomos  $HN$  sejam doadores em pontes de hidrogênio.

### 3.6.3. Discussão do peptídeo-C humano

O conjunto de ROEs observados em 283 K tem como consequência uma estrutura local bem definida para o pentapeptídeo C-terminal, conforme Munte *et al* [35]. Certamente esta estrutura não é significativamente populada em 303 K, uma vez que a maioria dos ROEs estão ausentes no espectro. O fato de haver um indício da presença de pontes de hidrogênio envolvendo os átomos HN (cadeia principal) dos dois últimos resíduos (leucina<sub>30</sub> e glutamina<sub>31</sub>) é coerente com a estrutura encontrada por Munte *et al*. [35], na qual esses prótons participam de uma ponte de hidrogênio bifurcada, e leva a crer que a estrutura encontrada ainda esteja presente, ainda que fracamente populada.

O valor extremamente negativo encontrado para o coeficiente de temperatura do ácido glutâmico<sub>27</sub> é bastante curioso, e novamente leva a crer na contribuição de outros mecanismos não conhecidos.

## 4. Discussão e conclusão

Em estudos recentes [33, 34] foi demonstrada a ligação específica em alvos celulares do pentapeptídeo E<sub>27</sub>GSLQ<sub>31</sub> C-terminal da proinsulina humana. Os estudos destacam a importância do Glu<sub>27</sub>, visto que com o tetrapeptídeo G<sub>27</sub>SLQ<sub>31</sub> não há sinal dessa ligação específica. Resultado similar foi encontrado para o pentapeptídeo E<sub>27</sub>VARQ<sub>31</sub> C-terminal do peptídeo-C do rato na atividade da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase; neste caso, porém, a importância de Glu<sub>27</sub> fica questionável, uma vez que a mesma atividade foi encontrada para o tetrapeptídeo V<sub>28</sub>ARQ<sub>31</sub>. Ficou demonstrada, também, a especificidade na interação, uma vez que as atividades biológicas tanto do peptídeo-C humano no rato quanto do peptídeo-C do rato no homem são bastante reduzidas.

Estudos estruturais recentemente realizados [35] no peptídeo-C humano mostraram a ausência de uma estrutura bem definida para o peptídeo. Foi detectada, porém, a presença de elementos estruturados, em especial na região C-terminal do peptídeo. Um elemento não-usual, consistindo de uma volta-β tipo III', foi encontrado para o pentapeptídeo C-terminal (E<sub>27</sub>GSLQ<sub>31</sub>).

As informações acima apresentadas nos levaram às seguintes indagações:

- A estrutura encontrada para o pentapeptídeo C-terminal possui dependência com o resto da molécula? Pequenos peptídeos C-terminais poderiam adotar a mesma estrutura?
- A mesma estrutura seria encontrada em um peptídeo C-terminal do peptídeo-C do rato?

Objetivando obter respostas a essas indagações foi realizado o trabalho apresentado nessa tese de mestrado, cujos resultados serão discutidos a seguir.

Os quatro peptídeos C-terminais do peptídeo-C humano, Pep1 (L<sub>24</sub>ALEGS<sub>31</sub>), Pep2 (A<sub>25</sub>LEGS<sub>31</sub>), Pep3 (L<sub>26</sub>EGS<sub>31</sub>) e Pep4 (E<sub>27</sub>GS<sub>31</sub>), todos contendo o pentapeptídeo C-terminal EGSLQ bioativo e diferindo entre si apenas em tamanho, apresentaram, ao contrário do esperado, algumas características claramente distintas.

O mais comprido dos quatro peptídeos, Pep1, parece apresentar ao menos três conformações em baixas temperaturas (283 K), com voltas- $\beta$  formadas pelos resíduos L<sub>24</sub>ALE<sub>27</sub>, L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub> e G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>. Com o aumento da temperatura a última conformação se torna dominante, desaparecendo os indícios das duas outras conformações. Essa conformação parece ser a mais populada, apresentando evidências de ser o próton amino (cadeia principal) da glutamina<sub>31</sub> um doador em uma ponte de hidrogênio. Tal hipótese é sustentada tanto pela manutenção da intensidade do sinal de RMN deste átomo com a temperatura quanto pelo alto coeficiente de temperatura encontrado.

Com a retirada da leucina<sub>24</sub>, portanto no Pep2, parece ocorrer uma desestruturação geral do peptídeo. A primeira conformação (volta- $\beta$  L<sub>24</sub>ALE<sub>27</sub>) naturalmente deixa de existir e a segunda conformação (volta- $\beta$  L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub>), caso exista (apresenta ambigüidades nas restrições), é apenas significativamente populada em baixas temperaturas (283 K). A última conformação (volta- $\beta$  G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>) persiste em 293 K, porém desaparece na alta temperatura (303 K). Essa conformação também parece ser fracamente populada, pois, ao contrário do Pep1, no Pep2 o próton amino (cadeia principal) da glutamina<sub>31</sub> não apresenta características de doador em uma ponte de hidrogênio (intensidade do sinal diminui com o aumento da temperatura). Apesar das diferenças significativas encontradas entre o Pep1 e o Pep2, uma interessante característica é comum: ambos apresentam um valor baixo para a constante de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  do ácido glutâmico<sub>27</sub>, indicando uma preferência conformacional para esse resíduo.



Retirando-se mais um resíduo teremos o Pep3, o qual curiosamente recupera a alta população para a terceira conformação (volta- $\beta$  G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>): o próton amino da glutamina novamente apresenta características de ser doador em ponte de hidrogênio (manutenção da intensidade do sinal com a temperatura). Os coeficientes de temperatura caem significativamente, porém a diferença relativa do coeficiente da glutamina<sub>31</sub> com relação aos demais é mantida. Da mesma forma que no Pep1, a segunda conformação (volta- $\beta$  L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub>) parece presente apenas em baixas temperaturas, sendo baixamente populada (ausência de uma ponte de hidrogênio). Nesse peptídeo ocorre, pela primeira vez, uma separação entre os picos HN da serina<sub>29</sub> e da leucina<sub>30</sub>, possibilitando o cálculo de seus coeficientes de temperatura. O alto valor encontrado para a serina<sub>29</sub> é conflitante com a perda da intensidade de seu sinal com a temperatura e talvez reflita o envolvimento desse próton em uma ponte de hidrogênio transiente, em acordo com a segunda conformação (volta- $\beta$  L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub>) encontrada. Com base nos valores dos deslocamentos químicos obtidos nas 3 temperaturas foi estimado um valor para o coeficiente de temperatura da serina<sub>29</sub> para os Pep1 e Pep2. Os valores são similares aos encontrados no Pep3, indicando um mesmo processo nos 3 peptídeos, quer seja a presença de uma ponte de hidrogênio transiente envolvendo a serina<sub>29</sub>, quer seja uma outra contribuição desconhecida.

O peptídeo alcança seu menor tamanho no Pep4, com a retirada da leucina<sub>26</sub>. A segunda conformação (volta- $\beta$  L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub>) deixa naturalmente de existir, restando apenas a terceira conformação, (volta- $\beta$  G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>), novamente sustentada pela presença de uma ponte de hidrogênio. O coeficiente de temperatura da serina<sub>29</sub> cai, tornando-se semelhante aos demais, o que corrobora com a hipótese de que o alto valor anteriormente encontrado se deva à presença de uma ponte de hidrogênio transiente estabilizando a volta- $\beta$  L<sub>26</sub>EGS<sub>29</sub>.

Nos quatro peptídeos pode ser observado, ainda, um comportamento interessante com relação aos resíduos glicina<sub>28</sub> e serina<sub>29</sub>. Os prótons H $\alpha$  da glicina<sub>28</sub> são degenerados no Pep1 e no Pep2, e não-degenerados no Pep3 e no Pep4. Já os prótons H $\beta$  da serina<sub>29</sub> são degenerados no Pep1, Pep3, Pep4 e em uma conformação mais fraca do Pep2; e não-degenerados no Pep2 e em uma conformação mais fraca do Pep1. Apesar do comportamento distinto, de uma forma geral fica clara a menor mobilidade ou da glicina<sub>28</sub> ou da serina<sub>29</sub> nos quatro peptídeos. Essa menor mobilidade é comum em resíduos centrais de uma volta devido à rigidez imposta pela ponte de hidrogênio entre os resíduos das extremidades. Essa não-degenerescência do deslocamento químico, para esses prótons, não é compatível com o esperado para estruturas randômicas, podendo ser indício de estruturação do peptídeo.

De uma forma geral os quatro peptídeos, Pep1 a Pep4, possuem em comum, em maior ou menor população, uma volta- $\beta$  G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub>. Uma hipótese que deve ser levada em consideração, mas que não pode ser demonstrada pelos dados aqui apresentados e em função da ausência de estudos na literatura, é a possibilidade de que a volta G<sub>28</sub>SLQ<sub>31</sub> inclua o ácido glutâmico<sub>27</sub>, formando assim uma volta- $\alpha$  E<sub>28</sub>GSLQ<sub>31</sub>. Os dados que contribuem a essa hipótese são a menor mobilidade da glicina<sub>28</sub> ou da serina<sub>29</sub> nos 4 peptídeos, característica tipicamente encontrada em resíduos situados no meio de voltas, e a preferência conformacional do ácido glutâmico<sub>27</sub> (constante de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  baixa). Os resultados encontrados nos ensaios de atividade biológica mostrando a importância do ácido glutâmico<sub>27</sub> [33], assim como a total conservação desse resíduo em peptídeos-C de várias espécies, fortalecem a hipótese. A volta- $\alpha$  também está presente no pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano [35]. Uma sugestão interessante para um trabalho futuro seria analisar as possíveis conexões ROEs a serem esperadas nos diferentes tipos de voltas- $\alpha$  em peptídeos.

O quinto peptídeo estudado, Pep5 (A<sub>25</sub>LEVARQ<sub>31</sub>), apresenta o mesmo número de resíduos que o Pep2, porém a seqüência da região C-terminal do peptídeo-C do rato. Em contraste ao Pep2, peptídeo que parece apresentar o mais baixo grau de estruturação dentre todos, o Pep5 parece possuir três conformações em 283 K e 293 K, com voltas- $\beta$  formadas pelos resíduos A<sub>25</sub>LEV<sub>28</sub>, L<sub>26</sub>EVA<sub>29</sub> e V<sub>28</sub>ARQ<sub>31</sub>. As voltas, porém, apresentam ambigüidades, e apenas a última é sustentada pela presença de uma ponte de hidrogênio tendo o próton HN (cadeia principal) da glutamina<sub>31</sub> como doador (mantém a intensidade do sinal com a temperatura). A 303 K, apenas a primeira conformação é perdida. Quatro peculiaridades diferenciam o Pep5 dos outros peptídeos estudados: (i) a presença de um grande número de restrições experimentais de distância no espectro ROESY; (ii) a presença de uma restrição (*i,i+3*); (iii) um alto valor para o coeficiente de temperatura do ácido glutâmico<sub>27</sub>, resíduo que, pela sua posição no peptídeo, não pode ser o doador em uma ponte de hidrogênio típica de voltas- $\beta$ ; e (iv) um valor “random” para o acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  do ácido glutâmico<sub>27</sub>, em oposição ao baixo valor encontrado nos Pep1 e Pep2. Pode-se supor, assim, que o Pep5 possua uma estrutura mais bem definida, conforme (i), e mais compacta, conforme (ii). As características (iii) e (iv) encontradas para o ácido glutâmico<sub>27</sub> provavelmente estão correlacionadas com os resultados de atividade biológica envolvendo esse resíduo, em especial no que concerne à especificidade entre as espécies (humana e rato), e não podem ser explicadas com os dados obtidos nesse trabalho, devendo permanecer como uma sugestão a trabalhos futuros.

Os cinco peptídeos, Pep1 a Pep5, possuem em comum a presença de “sombras” dos sistemas de spin nos espectros, evidências da existência de multiconformações. Os sinais são significativamente mais fracos que os principais, de forma que não é esperada a presença de quaisquer restrições experimentais envolvendo tais conformações.

Ao contrário dos cinco peptídeos estudados, a região C-terminal do peptídeo-C humano apresenta, a 283 K, uma estrutura bem definida, consequência da grande quantidade de restrições encontrada. Conjuntos de ROEs  $d_{NN}(i+1,i+3)$  e  $d_{\alpha N}(i,i+3)$ , completamente ausentes nos 5 peptídeos, aparecem em toda a região C-terminal na baixa temperatura. Com o aumento da temperatura também parece ocorrer uma perda estrutural. É interessante observar que a volta- $\beta$   $G_{28}SLQ_{31}$  não está presente em nenhuma das três temperaturas, em contraste à presença constante dessa volta nos pequenos peptídeos. O conjunto de ROEs encontrados no peptídeo-C a 283 K resultaram na volta- $\beta$  tipo III'  $E_{27}GSL_{30}$  encontrada, com a presença de uma ligação de hidrogênio bifurcada incluindo a glutamina<sub>31</sub> e garantindo a estruturação do pentapeptídeo C-terminal na forma de uma volta- $\alpha$  tipo I- $\alpha_{LS}$  [36].

Os resultados obtidos nesse trabalho forneceram, portanto, as respostas às nossas indagações iniciais:

- Os pequenos peptídeos C-terminais apresentam multiconformações, sendo que nenhuma delas pode ser considerada idêntica à encontrada no pentapeptídeo C-terminal do peptídeo-C humano. De alguma forma os outros resíduos ou outras regiões do peptídeo-C são responsáveis pela estrutura de seu pentapeptídeo final  $E_{27}GSLQ_{31}$ ;
- O peptídeo C-terminal do peptídeo-C do rato parece apresentar uma estrutura mais compacta, distinta da encontrada para os derivados humanos, o que possivelmente explique a alta especificidade na atividade biológica encontrada nas duas espécies.

## 5. Referências

- 1 - Perutz M. F. (1942), Crystal structure of oxyhaemoglobin. *Nature* **150**: 324-329.
- 2 - Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953), Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**: 737-738.
- 3 - Banting F. G. & Best C. H. (1922), The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* **7**:251-266.
- 4 - Sanger F. & Tuppy H. (1951), The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem. J.* **49**: 481-490.
- 5 - Sanger F. & Thompson E. O. P. (1953), The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem. J.* **53**: 366-374.
- 6 - Blundell T. L. *et al.* (1971), Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature* **231**: 506-511.
- 7 - Katsoyannis P. G., Tometsko A. & Fukuda K. (1963), Insulin peptides. IX. The synthesis of the A-chain of insulin and its combination with natural B-chain to generate insulin activity. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2863-28657.
- 8 - Katsoyannis P. G. *et al.* (1964), Insulin peptides. X. The synthesis of the B-chain of insulin and its combination with natural or synthetic A-chain to generate insulin activity. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 930-932.
- 9 - Steiner D. F. *et al.* (1967), Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* **157**: 697-700.
- 10 - Ullrich A. *et al.* (1977), Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**: 1313-1319.
- 11 - Goeddel D. V. *et al.* (1979), Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 106-110.
- 12 - Kitabchi A. E. (1977), Proinsulin and C-peptide: a review. *Metab. Clin. Exp.* **26**: 547-587.
- 13 - Johansson J. *et al.* (2002), Molecular effects of proinsulin C-peptide, *BBRC* **295**: 1035-1040.

- 14 - Smeekens S. P. *et al.* (1992), Prorinsulin processing by the subtilising-related proprotein convertases furin PC2 and PC3, SP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **15:** 89 (18): 8822–8826.
- 15 - Mackin R. B. (1998), Proinsulin: recent observations and controversies. *Cell Mol. Life Sci. Jul* 54(7): 696–702.
- 16 - Wahren J. *et al.* (2000), Role of C-peptide in human physiology, *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* **278:** E759-E768.
- 17 - Johansson B. L. *et al.* (2000), Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine.* **17:** 181-189.
- 18 - Johansson B. L., Linde B. & Wahren J. (1992), Effects of C-peptide on blood flow, capillarity diffusion capacity and glucose utilization in the exercising for arm of type1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* **35:** 1151-1158.
- 19 - Zierath J. R. *et al.* (1996), C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptors and tyrosine kinase activation. *Diabetologia.* **39:** 306-313.
- 20 - E Fernqvist-Forbes, Johansson B. L. & Eriksson M. J. (2001), Effects of C-peptide on forearm blood flow and brachial artery dilatation in patients with type 1 diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand.* **172:** 159-165.
- 21 - Delaney C., Shaw J. & Day T. (2004), Acute, local effects of iontophoresed insulin and C- peptide on cutaneous micro vascular function in type 1 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine.* **21:** 428-433
- 22 - Ohtomo Y. *et al.* (1996), C-peptide stimulates rat renal tubular Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y. *Diabetologia.* **39:** 199–205.
- 23 - Shafqat J. *et al.* (2002), Proinsulin C-Peptide and its analogues induce intracellular Ca<sup>2+</sup> increases in human renal tubular cells. *Cells. Mol. Life. Sci.* **59(7):**1185-9.
- 24 - Kitamura T. *et al.* (2001), Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein inases in Swiss3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem. J.* **355:** 123–129.
- 25 - Ohtomo Y. *et al.* ( 1998 ), Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-TPase sensitivity of renal tubule segments. *Diabetologia* **41:** 287-291.
- 26 - Chibalin A. *et al.* (2001), C-peptide stimulates Na,K-pump through MAP kinase dependent pathway in the human renal tubular cells. *Scandinavian Physiological Society meeting*, University of Aarhus.

- 27 - Ido Y. *et al.* (1997), Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* **277**: 563–566.
- 28 - Sima A. *et al.* (2001), C-peptide prevents and improves chronic type 1 diabetic neuropathy in the BB/Wor-rat. *Diabetologia* **44**: 889–897.
- 29 - De La Tour D. *et al.* (1998), Erythrocyte Na/K ATPase activity and diabetes: relationship with C-peptide level. *Diabetologia* **41**: 1080–1084.
- 30 - Kunt T. *et al.* (1999), The effect of human proinsulin C-peptide on erythrocyte deformability in patients with type I *diabetes mellitus*. *Diabetologia* **42**: 465–471.
- 31 - Kunt T. *et al.* (1998), Human C-peptide increases calcium influx into endothelial cells. *Diabetes* **47**: A30.
- 32 - Wallerath T. *et al.* (2003), Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide. *Nitric Oxide*. **9**(2):95-102.
- 33 - Pramanik A. *et al.* (2001), C-peptide Binding to Human Cell Membranes: Importance of Glu27. *BBRC* **284**: 94-98
- 34 - Rigler R. *et al.* (1999), Specific Binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13318-13323.
- 35 - Munte, C. E. *et al.* (2005), Solution Structure of human proinsulin C-peptide. *The FEBS Journal* **272**: 4284-4293.
- 36 - Chou K-C (2000), Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins. *Analytical Biochemistry* **286**: 1-16.
- 37 - Venkatachalan C. M. (1968), Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* **6**: 1425-1436.
- 38 - Richardson J. S (1981), The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **34**: 167-339.
- 39 - Kabsh W. & Sander, C. (1983), Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**: 2577-2637.
- 40 - Lewis P. N., Momany F. A. & Scheraga H. A. (1973), Chain reversals in proteins. *Biochem Biophys. Act.* **303**: 211-229.
- 41 - Wilmot C. M. & Thornton J. M. (1990), Beta-turns and their distortions: a proposed new nomenclature. *Protein Engineering* **3**: 479-493.
- 42 - Kuntz I. D. (1972), Protein folding. *J. Am. Chem. Soc.* **94**: 4009-4012.
- 43 - Smith J.A. & Pease L.G., (1980), Reverse turns in peptides and proteins. *CRC Crit Rev Biochem.* **8**: 315-99.

- 44 - Rose G. D., Gierasch L. M. & Smith J. A. (1985), Turns in peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **37**:1-109.
- 45 - Reddy G. L. & Nagaraj R. (1987), Circular dichroism studies on synthetic peptides corresponding to the cleavage site region of precursor proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **29**:497-503.
- 46 - Brakch N. *et al.* (1993), Role of beta-turn in proteolytic processing of peptide hormone precursors at dibasic sites. *Biochemistry* **11**;32(18):4925-30.
- 47 - Chou P. Y. & Fasman G. D. (1977), Beta-turns in proteins, *J Mol Biol.* **115**(2):135-75.
- 48 - J.B. *et al.* (1990), A one-variable topographical descriptor for the beta-turns of peptides and proteins. *FEBS Letters* **273**(1-2):15-8.
- 49 - Bloch F. & Purcell E. (1952), Nobel Lectures, Physics 1942-1962. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- 50 - Ernst R. R. (1992), Nobel Lectures, Chemistry, 1991-1995. Editor Bo G. Malmström, World Scientific Publishing Co., Singapore, 1997
- 51 - Saunders M. & Wishnia A. (1958), Nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **70**:, 870-874.
- 52 - Jardetzky O. & Jardetzky C.D. (1958), Proton magnetic resonance spectra of amino acids. *J. Biol. Chem.* **233**, 383-387.
- 53 - Wuthrich K., Nobel Lecture, 08 de dezembro, 2002.
- 54 - Delaglio F. *et al.* (1995), NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR.* **6**: 277.
- 55 - Johnson B. A. & Blevins, R.A. (1994), NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR.* **4**:603-614.
- 56 - Wuthrich K. (1986), NMR of Proteins and Nucleic Acids., John Wiley & Sons, New York.
- 57 - Kalbitter H. R., Neidig K. P. & Hengstenberg W. (1991), Two-dimensional <sup>1</sup>H NMR studies on HPr protein from *Staphylococcus aureus*: complete sequential assignments and secondary structure. *Biochemistry* **30**:11186-11192.
- 58 - Karplus M. (1959). Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. chem. Phys.* **30**:11-15.
- 59 - Pardi A., Llinás M. & Wuthrich K. (1978). Calibration of the angular dependence of the amide proton-C $\alpha$  proton coupling constant, <sup>3</sup>J<sub>HN $\alpha$ , in a globular protein: use of <sup>3</sup>J<sub>HN $\alpha$  for identification of helical secondary structure. *J. Mol. Biol.* **180**: 741-751.</sub></sub>



- 60 - Brunger A.T. *et al.* (1998), Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst. D* **54**:905-921.
- 61 - Gil & Geraldes (1987), Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações.
- 62 - Baxter N. J. & Williamson M. P. (1997), Temperature dependence of  $^1\text{H}$  chemical shifts in proteins. *J. Biomol. NMR* **9**: 359-369.
- 63 - Williamson M. P., Hall M. J. & Handa B. K. (1986)  $^1\text{H}$ -NMR assignment and secondary structure of a herpes simplex virus glycoprotein D-1 antigenic domain. *Eur. J. Biochem.* **158**: 527-536.
- 64 - Gao F. *et al.* (2002),  $\beta$ -turn formation by a six –residue linear peptide in solution. *J. Peptide. Res.* **60**: , 75-80.
- 65 - Dyson H. J & Wright P. E. (1991), Defining solution conformations of small linear peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**:519-538.
- 66 - Dyson H. J. *et al.* (1988) Folding of Immunogenic Peptide Fragments in Water Solution: I. Sequence Requirements for the Formation of a Reverse Turn. *J. Mol. Biol.* **201**: 161-200.
- 67 - Rance M. *et al.* (1983), Improved spectral resolution in COSY NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**:, 479-485.
- 68 - Cohen-Tannoudji C., Diu B.& Laloe F. (1977), Quantum Mechanics. Hermann and John Wiley & Sons, Inc Publishers.
- 69 - John Cavanagh *et al.*, Protein NMR Spectroscopy: principles and practice, AP.
- 70 - Jaravine V. A., Alexandrescu A. T. & Grzesiek S. (2001) Observation of the closing of individual hydrogen bonds during TFE-induced helix formation in a peptide. *Protein Sci.* **10**:943-950.
- 71 - Kaplan J. & Fraenkel G. (1980), NMR of Chemical Exchange System.
- 72 - Sandstrom J. (1982), Dynamic NMR Spectroscopy.
- 73 - Jardetzky O. & Roberts G. C. K. (1981), NMR in Molecular Biology. Academic Press, New York, NY.
- 74 - Roberts G. C. K. (1993), NMR of Macromolecules: a Practical Approach. Oxford University Press, NY.
- 75 - Gil e Geraldes (1987), Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

- 76 - Timothy D.W Claridge, High -Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Pergamon, pg. 91.
- 77 - A. Kumar *et al.* (1981), Buildup rates of the nuclear Overhauser Effect measured by two-dimensional proton magnetic-resonance spectroscopy – implications for studies of protein conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 3654-3658.
- 78 - Hoult D. I. & Richards R. E., (1975) Critical factors in the design of sensitive high resolution nuclear magnetic resonance spectrometers, *Proc. Roy. Soc. Lond. A.* **344**: 311-340.

**Anexo I:** Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  para a amostra Pep1 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).

Temperatura (K)	Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)					$^3J_{\text{NH}\alpha}$ (Hz)
		NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	outros	
303	L		3.836	1.705	1.705	$\delta^*$ 0.989	
	A		4.464	1.456			
	L	7.938	4.355	1.660	1.660	$\delta_1$ 0.915 $\delta_2$ 0.961	6.7
	E	8.579	4.238	2.059 2.105	2.346		5.6
	G	8.243	4.013				
	S	7.991	4.547	3.952			7.3
	L	7.959	4.445	1.704	1.704	$\delta_1$ 0.912 $\delta_2$ 0.964	7.5
	Q	7.610	4.228	1.977 2.167	2.340	$\epsilon_{21}$ 6.565 $\epsilon_{22}$ 7.400	7.7
293	L		3.896	1.705 1.635	1.705	$\delta^*$ 0.989	
	A		4.466	1.458			
	L	8.007	4.343	1.649	1.649	$\delta_1$ 0.912 $\delta_2$ 0.970	6.1
	E	8.625	4.234	2.043 2.110	2.346		5.3
	G	8.307	4.009				
	S	8.039	4.542	3.945 4.007			6.7
	L	8.018	4.441	1.707	1.707	$\delta_1$ 0.912 $\delta_2$ 0.970	6.9
	Q	7.654	4.226	1.981 2.171	2.342 2.311	$\epsilon_{21}$ 6.675 $\epsilon_{22}$ 7.529	7.1
283	L		3.952	1.705	1.705	$\delta^*$ 0.989	
	A		4.461	1.467			
	L	8.077	4.220	1.662	1.662	$\delta_1$ 0.917 $\delta_2$ 0.975	6.5
	E	8.691	4.217	2.087	2.351		5.5
	G	8.367	4.004				
	S	8.078	4.538	3.953 4.007			7.2
	L	8.062	4.441	1.707	1.707	$\delta_1$ 0.914 $\delta_2$ 0.972	7.5
	Q	7.694	4.221	1.981 2.171	2.324	$\epsilon_{21}$ 6.675 $\epsilon_{22}$ 7.529	7.7

**Anexo II:** Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  para a amostra Pep2 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).

Temperatura (K)	Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)					$^3J_{\text{NH}\alpha}$ (Hz)
		NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	outros	
303	A		3.997	1.539			
	L		4.304	1.747	1.747	$\delta$ 1 0.926	
				1.673		$\delta$ 2 0.970	
	E	8.930	4.215	2.062	2.326 2.403		5.1
	G	8.290	4.004				
	S	8.036	4.495	3.988 3.929			7.1
	L	7.990	4.381	1.738 1.657	1.738	$\delta$ 1 0.911 $\delta$ 2 0.964	6.8
	Q	7.936	4.336	2.026 2.189	2.396	$\epsilon$ 21 6.598 $\epsilon$ 22 7.313	7.5
293	A		4.057	1.578			
	L		4.301	1.668	1.668	$\delta$ 1 0.932 $\delta$ 2 0.974	
	E	8.978	4.207	2.063	2.336 2.412		5.0
	G	8.377	4.042 3.983				
	S	8.085	4.497	3.933 3.996			6.9
	L	8.069	4.380	1.733 1.655	1.733	$\delta$ 1 0.917 $\delta$ 2 0.972	6.6
	Q	7.996	4.325	2.036 2.196	2.401	$\epsilon$ 21 6.950 $\epsilon$ 22 7.360	7.4
	283	A		4.093	1.594		
L			4.301	1.771 1.671	1.771	$\delta$ 1 0.932 $\delta$ 2 0.984	
E		9.034	4.199	2.059	2.346 2.420		4.9
G		8.441	4.021				
S		8.126	4.490	3.931			6.8
L		8.126	4.38	1.734 1.655	1.734	$\delta$ 1 0.912 $\delta$ 2 0.982	6.6
Q		8.039	4.316	2.196 2.200	2.405	$\epsilon$ 21 7.05 $\epsilon$ 22 7.400	7.4

**Anexo III:** Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  para a amostra Pep3 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).

Temperatura (K)	Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)					$^3J_{\text{NH}\alpha}$ (Hz)
		NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	outros	
303	L		3.920	1.720	1.720	$\delta^*$ 0.980	
	E		4.390	1.690 2.022 2.130	2.350		
	G	8.462	4.074 3.957				
	S	7.995	4.563	3.915			7.4
	L	8.116	4.430	1.690	1.690	$\delta_1$ 0.918 $\delta_2$ 0.970	7.4
	Q	7.658	4.225	1.960 2.130	2.315	$\epsilon_{21}$ 6.580 $\epsilon_{22}$ 7.400	7.7
	293	L		3.969	1.722	1.722	$\delta$ 0.990
E			4.392	2.038 2.129	2.359		
G	8.537	4.083 3.950					
S	8.031	4.571	3.921			7.4	
L	8.198	4.429	1.699	1.699	$\delta_1$ 0.921 $\delta_2$ 0.980	7.4	
Q	7.708	4.227	2.164 1.964	2.323	$\epsilon_{21}$ 6.633 $\epsilon_{22}$ 7.461	7.8	
283	L		4.006	1.788 1.710	1.710 1.788	$\delta^*$ 1.005	
	E		4.392	2.038 2.129	2.355		
	G	8.615	4.080 3.937				
	S	8.067	4.573	3.921			7.3
	L	8.281	4.432	1.699	1.699	$\delta_1$ 0.921 $\delta_2$ 0.980	7.3
	Q	7.763	4.227	2.152 1.976	2.314	$\epsilon_{21}$ 6.778 $\epsilon_{22}$ 7.525	7.7

**Anexo IV:** Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  para a amostra Pep4 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).

Temperatura (K)	Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)					$^3J_{\text{NH}\alpha}$ (Hz)
		NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	outros	
303	E		4.065	2.110 2.161	2.457		
	G		4.014 4.142				
	S	8.197	4.555	3.962 3.912			8.0
	L	8.151	4.425	1.686	1.686	$\delta 1$ 0.925 $\delta 2$ 0.976	7.3
	Q	7.676	4.234	1.967 2.157	2.321	$\epsilon 21$ 6.594 $\epsilon 22$ 7.418	7.6
293	E		4.084	2.157	2.448		
	G		4.015 4.138				
	S	8.269	4.558	3.932			7.3
	L	8.225	4.429	1.696	1.696	$\delta 1$ 0.928 $\delta 2$ 0.977	7.4
	Q	7.732	4.234	2.151 1.970	2.317	$\epsilon 21$ 6.654 $\epsilon 22$ 7.481	7.7
283	E		4.102	2.171	2.453		
	G		4.017 4.148				
	S	8.343	4.558	3.932			7.1
	L	8.307	4.436	1.702	1.702	$\delta 1$ 0.925 $\delta 2$ 0.990	7.3
	Q	7.787	4.229	2.161 1.978	2.324	$\epsilon 21$ 6.711 $\epsilon 22$ 7.553	7.7

**Anexo V:** Deslocamentos químicos relativos ao DSS e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{NH}\alpha}$  para a amostra Pep5 em 50% de água, 50% de TFE-d2 (pH=7,0).

Temperatura (K)	Resíduo	Deslocamentos químicos (ppm)					$^3J_{\text{NH}\alpha}$ (Hz)
		NH	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	outros	
303	A		3.977	1.528			
	L		4.321	1.675	1.675	$\delta_1$ 0.975 $\delta_2$ 0.926	
	E	8.671	4.309	2.056 2.002	2.328		6.1
	V	7.726	4.134	2.161	0.974		7.3
	A	7.934	4.389	1.442			6.3
	R	7.917	4.394	1.808 1.962	1.700	$\delta$ 3.237	7.3
	Q	7.769	4.231	1.990 2.174	2.342	$\epsilon_{21}$ 6.564 $\epsilon_{22}$ 7.430	7.6
	293	A		4.038	1.564		
L			4.328	1.694	1.694	$\delta_1$ 0.932 $\delta_2$ 0.974	
E		8.684	4.324	2.020 2.084	2.334		6.2
V		7.818	4.124	2.148	0.978		7.3
A		8.016	4.385	1.456			6.0
R		7.995	4.407	1.969 1.821	1.707	$\epsilon$ 7.272 $\delta$ 3.237	7.3
Q		7.830	4.227	2.184 1.996	2.349	$\epsilon_{21}$ 6.628 $\epsilon_{22}$ 7.491	7.6
283	A		4.074	1.579			
	L		4.332	1.683	1.683	$\delta_1$ 0.923 $\delta_2$ 0.983	
	E	8.721	4.328	2.060 1.984	2.341		6.2
	V	7.918	4.118	2.142	0.986		7.2
	A	8.099	4.385	1.451			6.0
	R	8.064	4.395	1.965 1.810	1.705	$\epsilon$ 7.307 $\delta$ 3.237	7.2
	Q	7.889	4.223	2.174 1.990	2.354	$\epsilon_{21}$ 6.685 $\epsilon_{22}$ 7.562	7.5

**Anexo VI:** Deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE-d2 (600 MHz, 283 K, pH=7,0), relativos ao DSS. Valores retirados da tese de doutorado de Claudia Munte (2001).

Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
Glu1		4.07	2.31	2.52		
			2.14	2.52		
Ala2	8.99	4.23	1.50			
Glu3	9.13	4.16	2.06	2.43		
			2.06	2.33		
Asp4	8.25	4.55	2.78			
			2.74			
Leu5	7.82	4.32	1.79	1.67	0.97	
			1.66		0.90	
Gln6	8.11	4.35	2.21	2.44		7.41
			2.11	2.40		6.71
Val7	7.99	3.99	2.15	1.05		
				1.00		
Gly8	8.31	3.97				
		3.97				
Gln9	8.07	4.29	2.15	2.42		7.43
			2.15	2.42		6.66
Val10	8.02	3.95	2.17	1.03		
				0.97		
Glu11	8.55	4.26	2.07	2.34		
			2.07	2.34		
Leu12	8.12	4.37	1.78	1.72	0.95	
			1.65		0.91	
Gly13	8.20	4.01				
		4.01				
Gly14	8.17	4.02				
		4.02				
Gly15	8.13	4.22				
		4.03				
Pro16		4.43	2.30	2.11	3.72	
			2.03	2.06	3.59	
Gly17	8.48	3.97				
		3.97				
Ala18	8.08	4.28	1.47			
Gly19	8.42	4.01				
		3.98				
Ser20	8.01	4.49	3.98			
			3.92			
Leu21	7.98	4.46	1.75	1.75	0.95	
			1.69		0.90	



Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
Gln22	8.03	4.50	2.17	2.43		7.35
			2.09	2.43		6.63
Pro23		4.35	2.36	2.13	3.76	
			1.93	2.01	3.70	
Leu24	7.76	4.25	1.81	1.70	0.98	
			1.63		0.92	
Ala25	7.97	4.23	1.48			
Leu26	7.97	4.24	1.76	1.70	0.94	
			1.70		0.92	
Glu27	8.31	4.14	2.14	2.36		
			2.14	2.36		
Gly28	8.33	3.99				
		3.99				
Ser29	8.04	4.51	4.03			
			3.99			
Leu30	7.85	4.46	1.77	1.77	0.95	
			1.67		0.90	
Gln31	7.61	4.20	2.21	2.40		7.52
			2.00	2.40		6.67

Anexo VII: Deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE- $d_2$  (600 MHz, 298 K, pH=7,0), relativos ao DSS.

Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
Glu1		4.106	2.298 2.170	2.544 2.544		
Ala2	8.882	4.272	1.500			
Glu3	8.875	4.235	2.080 2.080	2.475 2.410		
Asp4	8.225	4.560	2.802 2.752			
Leu5	7.810	4.311	1.791 1.672	1.668	0.911 0.960	
Gln6	8.091	4.329	2.218 2.140	2.450 2.398		n/d n/d
Val7	7.918	3.957	2.158	1.044 0.977		
Gly8	8.202	3.941 3.941				
Gln9	8.346	4.282	2.128 2.128	2.452 2.198		n/d n/d
Val10	7.914	3.951	2.197	1.043 0.963		
Glu11	7.984	4.261	2.186 2.146	2.505 2.404		
Leu12	8.049	4.378	1.657 1.782	n/d	0.924 0.924	
Gly13	8.056	4.010 4.010				
Gly14	8.091	4.025 4.025				
Gly15	8.044	4.219 4.035				
Pro16		4.438	2.293 2.018	2.109 2.055	3.729 3.603	
Gly17	8.400	3.974 3.974				
Ala18	8.016	4.295	1.466			
Gly19	8.330	3.996 3.996				
Ser20	7.926	4.532	3.984 3.984			
Leu21	7.922	4.459	1.694 1.694	n/d	0.967 0.905	
Gln22	7.972	4.536	2.172	2.425		n/d

Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
			2.089	2.425		n/d
Pro23		4.379	2.333	2.119	3.767	
			1.946	2.018	3.729	
Leu24	7.716	4.242	1.774	n/d	0.977	
			1.637		0.914	
Ala25	7.920	4.254	1.482			
Leu26	7.826	4.279	1.777	n/d	0.960	
			1.665		0.912	
Glu27	8.121	4.217	2.186	2.425		
			2.179	2.425		
Gly28	8.225	4.000				
		4.000				
Ser29	7.930	4.532	4.000			
			4.000			
Leu30	7.835	4.450	1.743	n/d	0.947	
			1.678		0.899	
Gln31	7.620	4.252	1.995	2.360		n/d
			1.995	2.202		n/d

n/d: ressonância não detectada.

**Anexo VIII:** Deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  no peptídeo-C da proinsulina humana em 50% de água, 50% de TFE-d<sub>2</sub> (500 MHz, 303 K, pH=7,0), relativos ao DSS.

Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
Glu1		4.107	2.180 2.293	2.545 2.545		
Ala2	8.834	4.266	1.497			
Glu3	8.837	4.224	2.080 2.080	2.410 2.474		
Asp4	8.220	4.573	2.737 2.806			
Leu5	7.798	4.324	1.678 1.771		0.904 0.972	
Gln6	8.076	4.335	2.132 2.220	2.414 2.414		n/d n/d
Val7	7.877	3.988	2.157	0.984 1.046		
Gly8	8.186	3.946 3.946				
Gln9	7.915	4.279	2.165 2.165	2.425 2.425		n/d n/d
Val10	7.893	3.980	2.207	0.970 1.040		
Glu11	8.308	4.296	2.114 2.114	2.442 2.442		
Leu12	8.016	4.372	1.653 1.777	0.904 0.941		
Gly13	8.050	4.010 4.010				
Gly14	8.075	4.025 4.025				
Gly15	8.012	4.043 4.214				
Pro16		4.443	2.096 2.282	2.025 2.025	3.603 3.725	
Gly17	8.364	3.968 3.968				
Ala18	7.986	4.300	1.463			
Gly19	8.286	3.988 3.988				
Ser20	7.921	4.503	3.921 3.973			
Leu21	7.893	4.451	1.696 1.696		0.904 0.957	
Gln22	7.941	4.550	2.077	2.425		n/d

Resíduo	$^1\text{H}_\text{N}$	$^1\text{H}_\alpha$	$^1\text{H}_\beta$	$^1\text{H}_\gamma$	$^1\text{H}_\delta$	$^1\text{H}_\epsilon$
			2.176	2.425		n/d
Pro23		4.390	2.020	2.025	3.718	
			2.273	2.025	3.775	
Leu24	7.703	4.260	1.651		0.910	
			1.767		0.972	
Ala25	7.894	4.254	1.477			
Leu26	7.787	4.285	1.697		0.910	
			1.771		0.947	
Glu27	8.090	4.223	2.151	2.480		
			2.151	2.480		
Gly28	8.190	4.005				
		4.005				
Ser29	7.911	4.537	3.973			
			3.973			
Leu30	7.825	4.450	1.720		0.904	
			1.720		0.953	
Gln31	7.620	4.256	2.000	2.354		n/d
			2.200	2.354		n/d

n/d: ressonância não detectada.

## Apêndice A: O fenômeno de ressonância magnética

A espectroscopia por RMN é o único método atual capaz de elucidar a estrutura de biomoléculas em solução. No caso, são os núcleos atômicos possuidores de spin  $I = \frac{1}{2}$ , portadores de momento magnético como o Hidrogênio, Fósforo, Carbono-13 e Nitrogênio-15 que são os detectores naturais capazes de fornecer um sinal eletromagnético cuja frequência depende da conformação e do ambiente químico dos núcleos da molécula em estudo. Estes sensores são extremamente localizados (poucos fentômetros de diâmetros), sendo capazes de reportar acontecimentos nas suas redondezas imediatas. Isso permite explorar a matéria em detalhes, e com alta sensibilidade. A energia de interação do sensor (os spins nucleares) com o ambiente é extremamente pequena, sendo de  $\sim 0.2\text{J/mol}$ , correspondendo a uma temperatura térmica de  $\sim 30\text{mK}$ . Com isso, as propriedades moleculares (conformação, dinâmica) podem ser estudadas sem comprometer o sistema em estudo. Essas informações podem ser obtidas com as interações dipolares fornecendo informação de distância, com o acoplamento- $J$  fornecendo os ângulos diedrais das ligações químicas, e com medidas de tempo da relaxação da magnetização fornecendo informação da dinâmica da molécula.

Como desvantagem que surge da fraca interação dos spins nucleares, uma grande quantidade de amostra e campos elevados faz-se necessário para discriminar o sinal do ruído, visando também, diminuir o tempo de uso do espectrômetro.

Nas próximas seções, será apresentado o modelo teórico de forma a garantir a mínima compreensão física do fenômeno do ponto de vista moderno e alguns aspectos da instrumentação atual. Aprofundamentos pertinentes podem ser feitos com as referências citadas no fim do capítulo.

## A.1. Espectroscopia por RMN

A técnica usada para a realização desse estudo é a espectroscopia por ressonância magnética. Como uma forma de espectroscopia, ela está fundamentada na diferença de energia entre os estados acessíveis do sistema físico em estudo, no caso, o spin do núcleo atômico. Estes estados são criados na presença de um campo magnético, pela interação do momento magnético associado ao spin do núcleo com o campo. A diferença de energia destes estados é proporcional ao campo magnético presente no sistema e ao momento magnético do sistema em estudo (A1).

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}. \quad (\text{A1})$$

O momento magnético  $\boldsymbol{\mu}$  está associado ao momento angular  $\mathbf{I}$  do spin da partícula. (A2). O raio giromagnético  $\gamma$  é  $g_n \beta_n$  para o núcleo.  $\beta_n$  é o magneton nuclear.  $g_n$  é um valor que depende da partícula em consideração. Pelas regras da mecânica quântica, apenas uma das 3 coordenadas espaciais do momento angular pode estar bem determinado simultaneamente com  $|\mathbf{I}|^2$  (A3), sendo o seu valor quantizado. Por convenção, a componente z é a paralela ao campo magnético gerado pelo magneto (A4,A5).

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I} \quad (\text{A2})$$

$$|\mathbf{I}|^2 = \mathbf{I} \cdot \mathbf{I} = \hbar^2 I(I+1) \quad (\text{A3})$$

$$I_z = \hbar m \quad (\text{A4})$$

$$\mu_z = \gamma I_z = \gamma \hbar m \quad (\text{A5})$$

onde  $m = (-I, -I+1, \dots, I-1, I)$  é o número quântico magnético e os estados acessíveis do momento angular da partícula,  $\hbar$  é a constante de Plank dividida por  $2\pi$ . A energia associada a esses estados é

$$E_m = -\gamma I_z B_0 = -m \hbar \gamma B_0 = -m \hbar \omega_0 \quad (\text{A6})$$

ou seja, na presença de um campo magnético estático existe  $2I+1$  níveis de energia igualmente espaçados entre si associados aos diferentes estados do momento angular magnético. Estes são os níveis de Zeeman. Eles são desigualmente populados no equilíbrio térmico, sendo a sua distribuição relativa

$$\begin{aligned} \frac{N_m}{N} &= \exp\left(\frac{-E_m}{k_B T}\right) / \sum_{m=-I}^I \exp\left(\frac{-E_m}{k_B T}\right) \\ &= \exp\left(\frac{m\hbar\gamma B_0}{k_B T}\right) / \sum_{m=-I}^I \exp\left(\frac{m\hbar\gamma B_0}{k_B T}\right) \end{aligned} \quad (A7)$$

Essa população desigual dos estados do momento magnético nuclear gera uma magnetização na amostra em estudo, sendo o *quantum* de energia da onda eletromagnética para levar o sistema (o spin da partícula) de um estado ao outro de  $10^{-6}$  -  $10^{-3}$  eV, estando na região de radio frequência ( MHz ) para os magnetos mais possantes de RMN. Quando esse *quantum* possui a frequência correspondente à diferença energética dos estados do sistema físico em estudo, o fenômeno de ressonância ocorre, e o sistema transaciona entre estes estados acessíveis.

## A.2. Saturação e relaxação da magnetização

O fenômeno de RMN teria pouca utilidade prática se o excesso de spin  $\eta\alpha - \eta\beta$  ficasse anulado. Quando isso acontece, diz-se que ocorreu *saturação* do estado de maior energia, devido à absorção de energia por núcleos de spin  $\alpha$  de menor energia, e o sistema não mais absorve a radiação incidente. Contudo, mecanismos de relaxação da magnetização fazem os núcleos do estado de spin de maior energia voltar ao estado de menor energia, recuperando a população de equilíbrio (A7). Durante esse processo, informações da amostra podem ser extraídas, permitindo o estudo da amostra por RMN. Um desses mecanismos de relaxação é o Efeito Overhauser Nuclear.



### A.3. Mecanismos de relaxação:

Quando um sistema é perturbado e retirado do seu estado de equilíbrio, o processo no qual o sistema busca o retorno ao equilíbrio chama-se relaxação. Em RMN tanto a emissão espontânea como a estimulada não são relevantes devido ao grande comprimento da onda eletromagnética, sendo estatisticamente desprezível o retorno ao equilíbrio por transições advindas por esse processo. De fato, a relaxação do spin nuclear é uma consequência do seu acoplamento com a vizinhança e da flutuação de campos locais promovido pela vizinhança. O movimento Browniano das moléculas em líquidos gera campos magnéticos dependentes do tempo. Estes campos magnéticos locais dependentes do tempo podem ser decompostos dentro de uma superposição de campos magnéticos variando harmonicamente em diferentes frequências, por análise de Fourier. Estes campos também podem ser decompostos dentro da componente longitudinal ao campo  $B_0$  e da transversal, ortogonal ao  $B_0$ . De fato, é a componente transversal que gera a magnetização medida.

Para núcleos de spin  $\frac{1}{2}$  em macromoléculas biológicas diamagnéticas os mecanismos de relaxação dominantes são a anisotropias do deslocamento químico e o acoplamento dipolar magnético (no range de até 5Å). Para núcleos com spin  $> \frac{1}{2}$ , como  $^{14}\text{N}$  e  $^2\text{H}$ , o mecanismo dominante é a interação quadrupolar magnética. Estas taxas de relaxação dependem de muitos fatores: tempo de correlação rotacional total da molécula, movimentos internos, arranjo geométrico do núcleo e a força relativa dos mecanismos de relaxação aplicáveis. Para prótons, a taxa de relaxação é dominada pela interação dipolar com outros prótons e pela interação com heteronúcleos mediados por uma ligação química direta. Em seguida temos a interação dipolar com  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  em biomoléculas marcadas ou do acoplamento escalar de segundo tipo entre o núcleo do  $^{14}\text{N}$  e os prótons amídicos.

#### A.4. Variação da magnetização: equações de Bloch

O modelo clássico de Bloch é muito limitado para a compreensão e implementação das medidas de RMN, principalmente no estudo estrutural de biomoléculas, com sistemas de spin acoplados e diferentes de 1/2. Para isso, faz-se necessário o uso de um modelo físico semi-clássico, ou seja, o sistema em estudo é tratado quanticamente, mas é acoplado a um reservatório térmico clássico. Somente assim é possível formular um sem número de experimentos capazes de extrair diversas informações do sistema em estudo e explicar o efeito NOE. Mesmo assim, o modelo clássico de Bloch serve para introduzir uma compreensão mínima do fenômeno de RMN e da instrumentação envolvida. Um estudo aprofundado da técnica de RMN ao estudo de biomoléculas necessita a compreensão da mecânica quântica, com o formalismo de operadores de spin. Para isso, livros escritos por *Cohen et al* e *Cavanagh et al* são referências para quem estiver interessado [68, 69].

A variação da magnetização quer em grandeza devido a transições de spin, quer em orientação devido à precessão em torno de  $\mathbf{B}_0$ , pode ser separada em duas naturezas: a externa e a interna. A externa decorre da presença de um campo  $\mathbf{B}_0$  e de um campo  $\mathbf{B}_1$  oscilante, e a interna decorre dos mecanismos de relaxação do sistema. Isso permite pelas regras do eletromagnetismo escrever

$$\left(\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt}\right)_{lab} = \mathbf{M}(t) \times \gamma\mathbf{B}(t) \quad (\text{A8})$$

sendo que no sistema de referência girante

$$\begin{aligned} \left(\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt}\right)_{rot} &= \left(\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt}\right)_{lab} + \mathbf{M}(t) \times \boldsymbol{\omega} \\ &= \mathbf{M}(t) \times (\gamma\mathbf{B}(t) + \boldsymbol{\omega}) \\ &= \mathbf{M}(t) \times \gamma\mathbf{B}_{eff}(t) \end{aligned} \quad (\text{A9})$$

Esta equação de movimento da magnetização é no sistema de referência girando com velocidade angular  $\omega$  em relação ao referencial de laboratório. Se o referencial girante tiver uma frequência  $\omega = -\gamma B(t)$  o campo efetivo anula-se. No referencial giratório a magnetização se torna independente do tempo; no referencial de laboratório  $M(t)$  precessiona em torno de  $B(t)$  com uma frequência  $\omega = -\gamma B$ .

Na presença de somente um campo estático  $B_0$ , a magnetização precessiona ao redor do eixo do campo estático com frequência angular de Larmor,

$$\omega_0 = -\gamma B_0 \quad (\text{A10})$$

sendo idêntica à frequência da radiação eletromagnética necessária para excitar transições entre os níveis Zeeman; essa identidade é uma das razões pela qual uma descrição clássica (limitada) da espectroscopia de RMN é válida para sistemas de spin isolados.

Esse campo magnético de excitação é linearmente polarizado ao longo da direção  $x$  do sistema de referência do laboratório, e pode ser descrito como uma superposição de duas componentes circularmente polarizadas,

$$\begin{aligned} \mathbf{B}_{rf}(t) = & B_1 [\cos(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{i} + \sin(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{j}] \\ & + B_1 [\cos(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{i} - \sin(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{j}] \end{aligned} \quad (\text{A11})$$

somente o termo ressonante, que gira no mesmo sentido do momento magnético, interage significativamente. Ignorando o termo não ressonante, o campo de r.f. pode ser descrito como

$$\mathbf{B}_{rf}(t) = B_1 [\cos(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{i} + \sin(\omega_{rf}t + \phi)\mathbf{j}] \quad (\text{A12})$$

A solução da equação (A9), em adição ao campo estático, precisa incorporar o campo de r.f. acima. Resolvendo em um sistema de referência girante (rotating frame) que faça o  $\mathbf{B}_{rf}$  anular-se, a equação de movimento da magnetização torna-se

$$\frac{d\mathbf{M}^r(t)}{dt} = \mathbf{M}^r(t) \times \gamma \mathbf{B}^r \quad (\text{A13})$$

onde  $\mathbf{B}^r$  é o campo efetivo no referencial giratório:

$$\begin{aligned}
\mathbf{B}' &= \mathbf{B}_1 + \mathbf{B}_0 + \frac{\boldsymbol{\omega}_f}{\gamma} \\
&= B_1 \cos \phi \mathbf{i}' + B_1 \sin \phi \mathbf{j}' + \left( B_0 + \frac{\omega_f}{\gamma} \right) \mathbf{k}' \\
&= B_1 \cos \phi \mathbf{i}' + B_1 \sin \phi \mathbf{j}' + \Delta B_0 \mathbf{k}' \\
&= B_1 \cos \phi \mathbf{i}' + B_1 \sin \phi \mathbf{j}' - \frac{\Omega}{\gamma} \mathbf{k}'
\end{aligned} \tag{A14}$$

A expressão  $\Delta B_0 = (\omega_0 - \omega_f)/\gamma$  é o campo estático reduzido, normalmente chamado de “off-set”  $\Omega = -\gamma \Delta B_0$ . A magnitude do campo efetivo é dada por

$$B' = \sqrt{(B_1)^2 + (\Delta B_0)^2} \tag{A15}$$

e sua direção é dada por  $\theta$  e  $\phi$ , sendo  $\theta$  o ângulo formado com o eixo z:

$$\tan \theta = \frac{B_1}{\Delta B_0} \tag{A16}$$

O campo  $\mathbf{B}_{r,f}(t)$  é simplesmente o campo  $\mathbf{B}_1$ . Com a aplicação deste campo, a magnetização  $\mathbf{M}'(t)$  precessa em torno do campo efetivo  $\mathbf{B}'$  com frequência angular

$$\omega' = -\gamma B' \tag{A17}$$

O tempo de pulso  $\tau_p$  e a potência do campo  $\mathbf{B}_1$  são ajustados de forma a obter-se a manipulação desejada da magnetização. O ângulo de rotação efetivo da magnetização  $\alpha$  (*flip angle*) é dado por

$$\alpha = \omega' \tau_p = -\gamma B' \tau_p \tag{A18}$$

Quando  $B_1 \gg \Delta B_0$ , que ocorre quando  $\omega_f \approx \omega_0$ , o campo  $\Delta B_0$  é anulado e o campo efetivo resume-se a

$$\mathbf{B}' = B_1 \cos \phi \mathbf{i}' + B_1 \sin \phi \mathbf{j}' \tag{A19}$$

dessa forma, o campo efetivo será colinear com  $\mathbf{B}_1$  no *rotating-frame*, com a magnetização precessionando ao redor de  $\mathbf{B}_1$  com frequência.

$$\omega' = -\gamma B' = -\gamma B^1 \equiv \omega_1 \quad (\text{A20})$$

Com o término do pulso de *r.f.*, a magnetização retorna a situação do estado de equilíbrio devido a existência de mecanismos de relaxação. Caso esses mecanismos não existissem, uma força eletromotriz seria detectável por tempo indefinido em uma bobina próxima da amostra em estudo, e muitos dos experimentos não poderiam ser realizados, como o que explora a relaxação dipolar cruzada para obtenção das distâncias dos núcleos magnéticos de  $^1\text{H}$  de uma molécula, por exemplo.

As *equações de Bloch* é um formalismo clássico e descreve fenomenologicamente a relaxação longitudinal e transversal da magnetização para sistemas de spin  $1/2$  não acoplados. A relaxação longitudinal, ou spin-rede, refere-se à restauração da componente  $M_z$  da magnetização, sendo descrita em primeira ordem por

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = R_1 [M_0 - M_z(t)] \quad (\text{A21})$$

sendo a constante  $R_1$  a taxa de relaxação spin-rede, em geral expressa na forma do tempo de relaxação spin-rede  $T_1 = 1/R_1$ . A relaxação transversal, ou spin-spin, é caracterizado em primeira ordem por

$$\begin{aligned} \frac{dM_x(t)}{dt} &= -R_2 M_x(t) \\ \frac{dM_y(t)}{dt} &= -R_2 M_y(t) \end{aligned} \quad (\text{A22})$$

e  $R_2$  sendo a taxa de relaxação spin-spin, definindo o tempo de relaxação spin-spin  $T_2 = 1/R_2$ . Para obtermos as equações de Bloch, deve ser adicionado na equação (A8, A9) os termos de relaxação, obtendo então,

$$\begin{aligned}
\frac{dM_x(t)}{dt} &= [\mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t)]_x - R_2 M_x(t) \\
\frac{dM_y(t)}{dt} &= [\mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t)]_y - R_2 M_y(t) \\
\frac{dM_z(t)}{dt} &= [\mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t)]_z - R_1 [M_z(t) - M_0]
\end{aligned} \tag{A23}$$

para o sistema de referência do laboratório e

$$\begin{aligned}
\frac{dM_x(t)}{dt} &= \gamma [M_y(t) \Delta B_0 - M_z(t) B_1 \sin \phi] - R_2 M_x(t) \\
\frac{dM_y(t)}{dt} &= \gamma [M_z(t) B_1 \cos \phi - M_x(t) \Delta B_0] - R_2 M_y(t) \\
\frac{dM_z(t)}{dt} &= \gamma [M_x(t) B_1 \sin \phi - M_y(t) B_1 \cos \phi] - R_1 [M_z(t) - M_0]
\end{aligned} \tag{A24}$$

no sistema de referência girante. Para um campo de *r.f.*  $\mathbf{B}_1 = 0$ , temos para as equações de Bloch

$$\begin{aligned}
\frac{dM_x(t)}{dt} &= -\Omega M_y(t) - R_2 M_x(t) \\
\frac{dM_y(t)}{dt} &= \Omega M_x(t) - R_2 M_y(t) \\
\frac{dM_z(t)}{dt} &= R_1 [M_0 - M_z(t)]
\end{aligned} \tag{A25}$$

sendo essa condição chamada de precessão livre da magnetização.

## A.5. Deslocamento químico

Em RMN, dependendo do ambiente químico no qual se encontra o núcleo atômico, isso faz com que os núcleos sintam diferentemente o campo  $\mathbf{B}_0$  e possuam energias levemente diferentes. As frequências associadas aos quantas de energia passam a ser levemente deslocadas e características de um núcleo em particular, podendo ser diferentes de alguns Hertz a até centenas de Kiloherz.

Da diferença do campo magnético devido ao ambiente ao redor dos núcleos de interesse, o campo sentido por esses núcleos será levemente deslocado,

$$B' = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{A26})$$

onde o  $\sigma$  é a constante de blindagem isotrópica média, sendo as frequências de ressonâncias dos núcleos discriminadas.

$$\omega = \gamma B_0(1 - \sigma) \quad (\text{A27})$$

Na prática, o deslocamento químico absoluto é difícil de ser medido, pois envolve uma medida acurada do  $B_0$ . Ele é medido em partes por milhão (ppm) em relação a uma referência padrão (ex. DSS).

$$\delta(\text{ppm}) = \frac{\omega_{rf} - \omega_{ref}}{\omega_0} 10^6 \quad (\text{A28})$$

## A.6. Espectroscopia por transformada de Fourier: O *FID*

Como colocado anteriormente, os núcleos magnéticos possuem uma largura espectral, ou seja, um intervalo de frequências de ressonância característico, sendo a localização da linha de ressonância dentro desse intervalo dependente do ambiente químico que o núcleo em estudo experimenta (A28). Uma forma rápida e simples de obter um espectro de RMN, numa amostra em um espectrômetro moderno, é a excitação em paralelo dos núcleos com um pulso não seletivo. Isso é possível com um pulso curto no domínio do tempo em relação às frequências de ressonância características do sistema em estudo. Este pulso no domínio das frequências será representado por uma superposição de ondas de diferentes frequências e amplitudes, podendo interagir ressonantemente com os spins nuclear em estudo. Uma vez os núcleos excitados e com a magnetização fora do equilíbrio pela absorção de energia do pulso de excitação, a magnetização relaxa buscando o equilíbrio. O sinal gerado na bobina de

detecção (lei de faraday) pela relaxação da magnetização é o *FID* (do inglês: *Free Induction Decay*). Este sinal é gerado pela magnetização transversal, a componente ortogonal ao campo magnético principal. Esta magnetização é resultante de uma superposição das várias frequências e intensidades associadas aos núcleos magnéticos em diferentes ambientes químicos. O *FID* é gravado no domínio do tempo, e isto permite integrar o sinal com a repetição (acumulações) do experimento, aumentando a razão sinal-ruído. Como o *FID* está no domínio do tempo, para obter o espectro de RMN, é necessário realizar uma transformação matemática no *FID* gravado. Essa transformação permite obter as frequências e suas respectivas amplitudes presentes no *FID*. Essa manipulação matemática dar-se o nome de transformada de Fourier.

#### A.6.1. Domínio da frequência e domínio do tempo: pulsos de *r.f*

Uma dada função sinal no domínio do tempo (*FID*) pode ser decomposta em uma superposição de senos e co-senos com diferentes frequências e amplitudes. Um método para determinar essas frequências e amplitudes é aplicar uma transformada de Fourier na função sinal no domínio do tempo, sendo as duas funções relacionadas. Isso pode ser representado simbolicamente por

$$\begin{aligned}
 F(\omega) &= \int_{-i} f(t) \exp(-i\omega t) dt \\
 f(t) &= \int_{-i} F(\omega) \exp(i\omega t) d\omega
 \end{aligned}
 \tag{A29}$$

Este mesmo princípio permite que um pulso curto de rádio frequência (10 us) represente uma irradiação da amostra no domínio das frequências em um range da ordem de 100KHz, permitindo a irradiação simultânea na condição de ressonância de todos os núcleos  $^1\text{H}$ , por exemplo.



## A.7. Forma da linha de ressonância

Toda informação acessível no experimento de RMN é extraído da posição e forma da linha de ressonância, com sua largura a meia altura e sua intensidade; e, distorções das linhas sendo úteis de guia para correção do shimming. Parâmetros do experimento, como, relaxação, tempo de aquisição, shimming, janelas de processamento e trocas químicas afetam as linhas de ressonância. Linhas não simétricas indicam desajustes grosseiros no shimming<sup>1</sup>; larguras de linha a meia altura devem ser analisadas cuidadosamente de acordo com a amostra e estudo específico<sup>2</sup>.

## A.8. Mecanismo de troca e escala de tempo

No contexto de RMN, troca química (ou *chemical exchange*) é todo processo no qual um núcleo troca entre dois ou mais ambientes químicos nos quais seus parâmetros de RMN diferem (ex: deslocamento químico, acoplamento escalar, relaxação). Estes processos de troca podem ser intermoleculares ou intramoleculares. Entre os processos intermoleculares podemos citar

- Ligação de pequenas moléculas com macromoléculas;
- Equilíbrio de grupos ionizados protonados/desprotonados;
- Processo de troca de átomos da macromolécula com o solvente;
- Reação catalisada por enzima.

Processos intramoleculares incluem:

- Movimento de cadeias laterais;
- Transição hélice-*coil* de ácidos nucléicos;
- Desenovelamento de proteínas;

---

<sup>1</sup> Timothy D.W Claridge, High –Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Pergamon, pag. 91

<sup>2</sup> Mais sobre esse tema pode ser encontrado na secção de trocas químicas e suas referências.

- Equilíbrio conformacional: multiconformação.

Em todos esses casos, o efeito do processo de troca no espectro de RMN depende da sua taxa com relação à escala temporal do parâmetro de RMN. As relações entre os parâmetros de RMN e a estrutura molecular são bem definidas para cada conformação instantânea molecular. Porém, os parâmetros experimentais de RMN são médias no tempo, tomadas num grande número de moléculas que sofrem interconversões entre todas as conformações povoadas. A escala temporal de RMN é definida pelo valor (ou diferença de valores) do parâmetro de RMN considerado. Com isso, a existência de outras conformações pode ser visualizada, com o uso dos parâmetros de RMN, desde que existam em um intervalo de tempo maior que a escala temporal da técnica de RMN. Em geral, as velocidades associadas a essa escala temporal dos parâmetros de RMN ( $10^{-10}$ - $10^4$  s<sup>-1</sup>) são lentas em relação à escala temporal de muitos processos moleculares de baixa energia de ativação, como rotações ao redor de ligações simples ( $10^{10}$ - $10^{13}$  s<sup>-1</sup>), por exemplo. Essas trocas, grosso modo, podem ser consideradas rápidas, intermediárias e lentas. Cada uma destas regiões de troca gera efeitos característicos no espectro de RMN. Na figura A1 são mostrados as mudanças ocorridas em um espectro 1-D conforme a variação da taxa de troca dos prótons pela temperatura. Em temperaturas mais baixas (regime lento) a molécula está congelada, na escala temporal de RMN; temperaturas mais altas (regime rápido) ocasionam promediação conformacional. No regime rápido, a linha de ressonância é mediada pelos dois sinais e uma única linha de ressonância é observada. No regime intermediário, os dois sinais alargam-se e geram um único sinal com largura de linha grande. No regime lento, os dois sinais são bem resolvidos.

Uma das grandes aplicações da RMN é prover informação a respeito da dinâmica do sistema, como o valor das constantes de uma reação no equilíbrio e suas mudanças conformacionais sofridas. Todos esses mecanismos dependem da temperatura, concentração, pH, do solvente e da molécula em estudo [70-74].

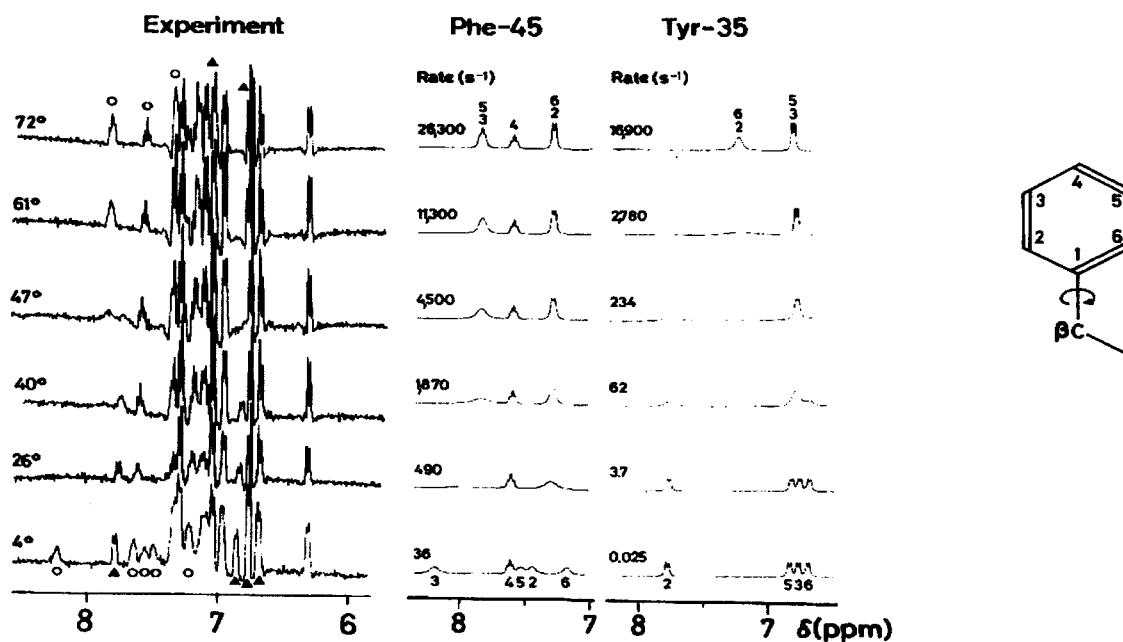


Figura A1: À esquerda temos o espectro  $^1\text{H}$  RMN a várias temperaturas da BPTI em  $\text{D}_2\text{O}$  (0.01 M, pH7.8; 360MHz). À direita temos a simulação desse espectro. A região de 6.0 até 8.5 ppm é mostrada. Nesta figura pode-se ver o efeito da taxa de troca no espectro. A troca ocorre com o giro do anel aromático; os números correspondem aos prótons do anel. Extraído da referência [56].

### A.9. “Medida” das distâncias nucleares com RMN: O NOE

A estimativa das distâncias espaciais dos núcleos atômicos é possível devido ao efeito Overhouser nuclear – NOE. Este importante mecanismo de relaxação surge da interação dipolar entre os núcleos atômicos, sendo portanto, inversamente proporcional à sexta ordem da distância dos núcleos e dependente da orientação deles. Em soluções isotrópicas, porém, o rápido movimento molecular pró-media a interação dipolar sobre todas as possíveis orientações da molécula, resultando em uma contribuição nula. Essa rápida reorientação aleatória das interações dipolares resulta em uma fonte de campos flutuantes capazes de estimular relaxações longitudinais. Somente quando essas flutuações gerarem um campo magnético na frequência de ressonância de um spin nuclear, a relaxação pode ocorrer. Na

verdade, este campo é modulado pela taxa de agito molecular, sendo caracterizado pelo tempo de correlação  $\tau_c$ , o tempo médio para a molécula girar de um radiano. A distribuição de freqüências do campo magnético flutuante associado a esse “pulso” dar-se o nome de densidade espectral  $J(\omega)$ , sendo proporcional a probabilidade de achar uma componente do movimento da molécula a uma dada freqüência, tendo a forma geral,

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (\text{A30})$$

com a representação esquemática mostrada na figura A2.

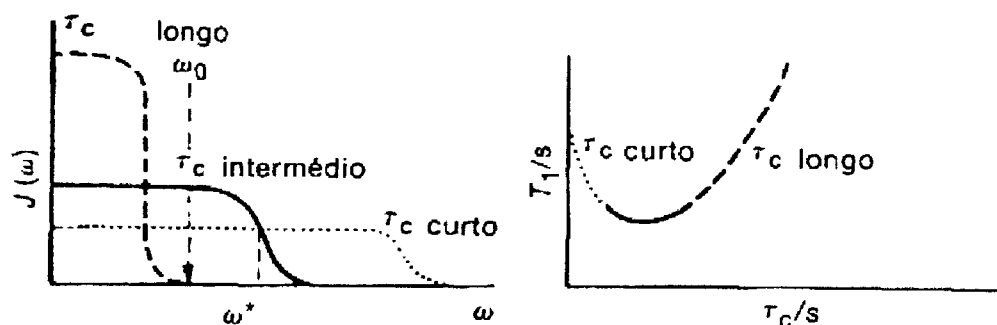


Figura A2: A esquerda temos o gráfico da variação da função densida espectral, em função de  $\omega$ , para vários valores do tempo de correlação  $\tau_c$ . A direita temos a variação de  $T_1$  com  $\tau_c$ . Notar a correspondência de linhas nos dois diagramas. Extraído da referência [75].

é a forma da densidade espectral que dita a força avaliável dentro do sistema molecular para induzir as transições dos spins nucleares. Este curva diz como a taxa de relaxação e o processo pela qual ocorre varia com o tempo de correlação.

Para um sistema homonuclear de spin- $1/2$ , acoplados dipolarmente, composto de  $2N$  spin I e  $2N$  spin S, as energias e os números quânticos magnéticos totais dos 4 estados possíveis serão,

$$\begin{aligned}
 E_{\alpha\alpha} &= -\frac{1}{2}\hbar\omega_I - \frac{1}{2}\hbar\omega_S & m_{\alpha\alpha} &= +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = +1 \\
 E_{\alpha\beta} &= -\frac{1}{2}\hbar\omega_I + \frac{1}{2}\hbar\omega_S & m_{\alpha\beta} &= +\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0 \\
 E_{\beta\alpha} &= +\frac{1}{2}\hbar\omega_I - \frac{1}{2}\hbar\omega_S & m_{\beta\alpha} &= -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 0 \\
 E_{\beta\beta} &= +\frac{1}{2}\hbar\omega_I + \frac{1}{2}\hbar\omega_S & m_{\beta\beta} &= -\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = -1
 \end{aligned}
 \tag{A31}$$

e para esse sistema, existem quatro processos pelos quais ocorrem as transições, sendo dois deles proibidos pelas regras de seleção. Pela figura A3, podemos visualizar os caminhos de relaxação cruzada  $W_0$  (zero-quanta) e  $W_2$  (duplo-quanta), proibidos pelas regras de seleção, e os permitidos  $W_I^I$  (único-quanta) e  $W_I^S$  (único-quanta).

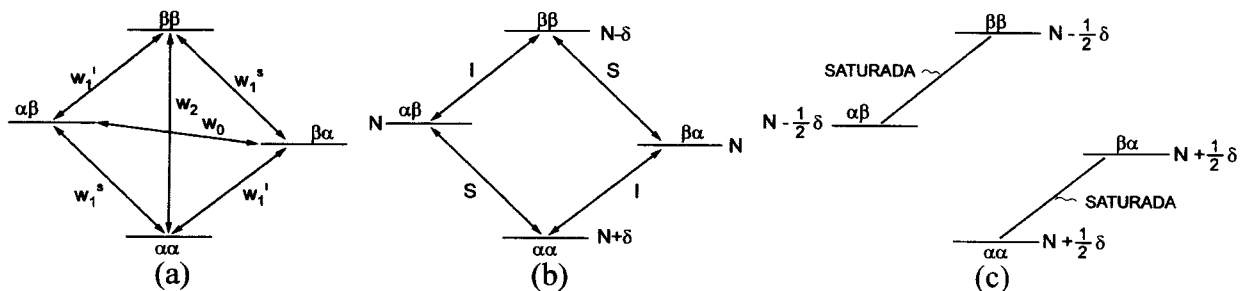


Figura A3: Relaxação em um sistema de spin- $1/2$  homonucleares, composto de  $2N$  spins  $I$  e  $2N$  spins  $S$ , não acoplados escalarmente. (a) caminhos para a relaxação após perturbação do sistema; (b) população dos níveis de energia no equilíbrio; (c) população dos níveis de energia após saturação das transições  $S$ .

Quanto mais  $1/\tau_c$  aproxima-se da frequência de transição, mais rápida a relaxação ocorre. Isto faz com que  $T_1$  seja dependente da taxa de movimento molecular (figura A2), sendo um mínimo quando a taxa de relaxação é máxima. Com essas afirmações, é possível prever qual o processo de relaxação dominante. O processo  $W_0$  possui uma diferença energética muito pequena, proporcional ao deslocamento químico dos núcleos  $I$  e  $S$ , que é da ordem de Hz a KHz. Esta transição será favorecida por moléculas que tombam vagarosamente na solução, fornecendo um NOE negativo. Já o processo  $W_2$  possui uma diferença energética que é proporcional à soma das frequências de ressonância destes núcleos, que varia muito

com a intensidade do campo do espectrômetro. Para espectrômetros de 500MHz (referente a frequência do próton), esse processo será favorecido por tombamentos moleculares que ocorrem a uma taxa de 1GHz, ou seja, um  $\tau_c$  de 1ns, ocasionando NOE positivos. Quando  $1/\tau_c$  aproxima-se da frequência do espectrômetro, o processo  $W_1$  é favorecido. O NOE teórico máximo como função do  $\tau_c$  pode ser visualizado na figura A4.

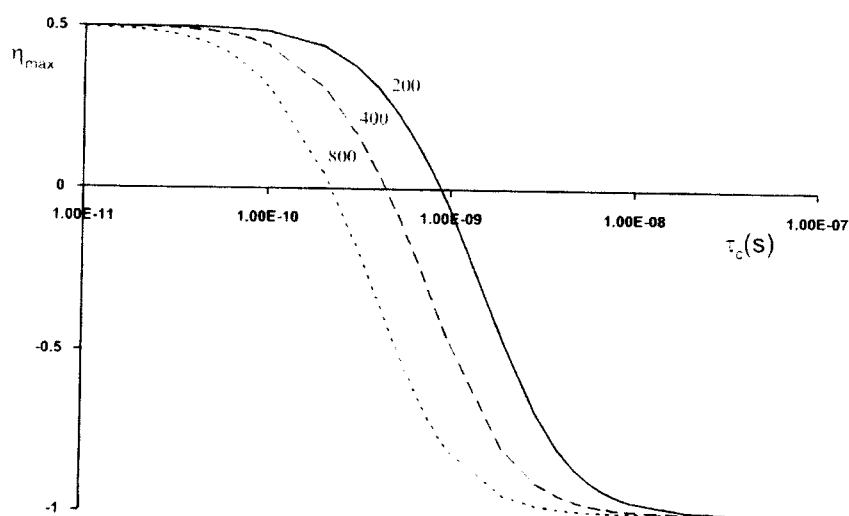


Figura A4: Intensidade do NOE homonuclear do próton para diversos campos V.S. tempo de correlação da amostra. Extraído da referência [76].

Como pode ser visto pela figura, há uma região para a qual esse NOE é nulo. Isso depende do  $\tau_c$  e da frequência do espectrômetro. Quando não é possível variar a frequência do espectrômetro, ou o tempo de correlação  $\tau_c$  da molécula no solvente, faz-se necessário realizar o experimento no sistema de referência da magnetização (rotating frame). Neste sistema de coordenadas, qualquer reorientação das moléculas da solução ocorre rapidamente, de forma que  $\omega\tau_c \ll 1$  sendo as relaxações cruzadas chamadas de ROE. O ROE teórico máximo pode ser visualizado na figura A5:

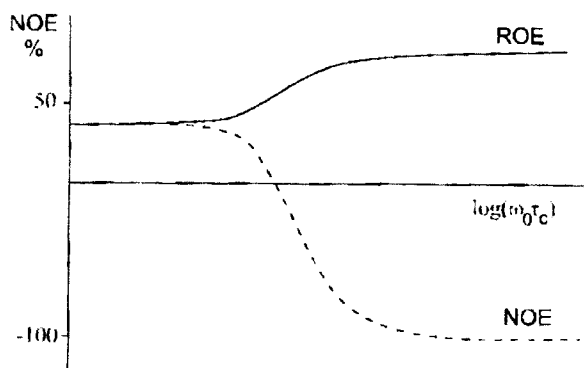


Figura A5: Ilustração esquemática da dependência do ROE e NOE para um sistema homonuclear de dois spin isolados como função da taxa de agitação molecular. Extraído da referência [75].

Outro parâmetro que influencia a intensidade do sinal de NOE/ROE é o tempo de mistura  $\tau_m$ . Ele precisa estar no regime linear da taxa de transferência da magnetização com o incremento do tempo de mistura [77] para fazer a calibração de distância do espectro. Para peptídeos lineares em solução, valores de até 400ms para o tempo de mistura são aceitáveis; para proteínas globulares esses valores costumam ser menores que 150ms. Com a informação do volume dos NOE/ROE que pode ser obtido com o uso de softwares como o NMRView, Aurélia, Auremol, etc, pode-se usar um grupo de prótons metileno como referência ( distância de prótons  $\sim 1.8\text{\AA}$  ) para estimar as distâncias dos outros NOE no espectro. Ou, na ausência dessa referência<sup>2</sup>, colocar em  $5\text{\AA}$  os NOE mais fracos, e com eles, calibrar os outros NOE do espectro. Tanto num caso como outro, calibra-se o espectro com a seguinte fórmula:

$$\text{Volume do NOE} \approx \frac{\text{const}}{r^6} \quad (\text{A32})$$

O sinal de aproximação significa que isso é validado apenas para um sistema de dois-spin isolado, e com a mesma função densidade espectral; isso justifica o uso de intervalos de erro razoáveis no volume do NOE, podendo ser de até 10 vezes o volume. Quando transformados

<sup>2</sup> Proteínas restringidas exclusivamente com todas as distâncias limitadas superiormente a 5 ângstroms para o NOE de intervalo longo é comum ser encontrado no Protein Data Bank - PDB. Ver [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)

em distância, esses erros representam em torno de 20% a 60% do valor médio da distância medido com o NOE.

### A.10. Acoplamento escalar ou spin-spin

Espectros de ressonância magnética de alta resolução em líquidos revelam estrutura fina devido às interações entre os núcleos. Porém, a separação das linhas de ressonância em multipletos não ocorre por interação dipolar direta entre os momentos de dipolo magnéticos dos núcleos. Como dito anteriormente, essa quantidade é mediada a zero em primeira ordem em líquidos isotrópicos. Esta interação dos núcleos é mediada pelos elétrons da ligação química entre os átomos, e a força dessa interação é medida pela constante de acoplamento  ${}^nJ_{ab}$ , no qual  $n$  refere-se ao número de ligações químicas covalentes que separam os dois núcleos  $a$  e  $b$ . A magnitude de  $J$  é expressa em Hz, e este acoplamento tem como característica modificar os níveis de energia do sistema. No caso de dois homo núcleos de spin-  $\frac{1}{2}$ , designados por  $I$  e  $S$ , as frequências de ressonância são  $\omega_I$  e  $\omega_S$  respectivamente. O sistema de spin possui então quatro níveis de energia (figura A6) correspondendo aos quatro estados disponíveis para sistemas de dois spin- $\frac{1}{2}$ . Isto corresponde a todas as combinações de  $m_I$  e  $m_S$ .

$$\begin{aligned}
 E_{\alpha\alpha} &= -\frac{1}{2}\hbar\omega_I - \frac{1}{2}\hbar\omega_S + \frac{1}{2}\hbar\pi J_{IS} & m_{\alpha\alpha} &= +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = +1 \\
 E_{\alpha\beta} &= -\frac{1}{2}\hbar\omega_I + \frac{1}{2}\hbar\omega_S - \frac{1}{2}\hbar\pi J_{IS} & m_{\alpha\beta} &= +\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0 \\
 E_{\beta\alpha} &= +\frac{1}{2}\hbar\omega_I - \frac{1}{2}\hbar\omega_S - \frac{1}{2}\hbar\pi J_{IS} & m_{\beta\alpha} &= -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 0 \\
 E_{\beta\beta} &= +\frac{1}{2}\hbar\omega_I + \frac{1}{2}\hbar\omega_S + \frac{1}{2}\hbar\pi J_{IS} & m_{\beta\beta} &= -\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = -1
 \end{aligned}
 \tag{A33}$$

$$\begin{aligned}
 \omega_{\alpha\alpha-\alpha\beta} &= \omega_S - \pi J_{IS} \\
 \omega_{\beta\alpha-\beta\beta} &= \omega_S + \pi J_{IS} \\
 \omega_{\alpha\alpha-\beta\alpha} &= \omega_I - \pi J_{IS} \\
 \omega_{\alpha\beta-\beta\beta} &= \omega_I + \pi J_{IS}
 \end{aligned}
 \tag{A34}$$



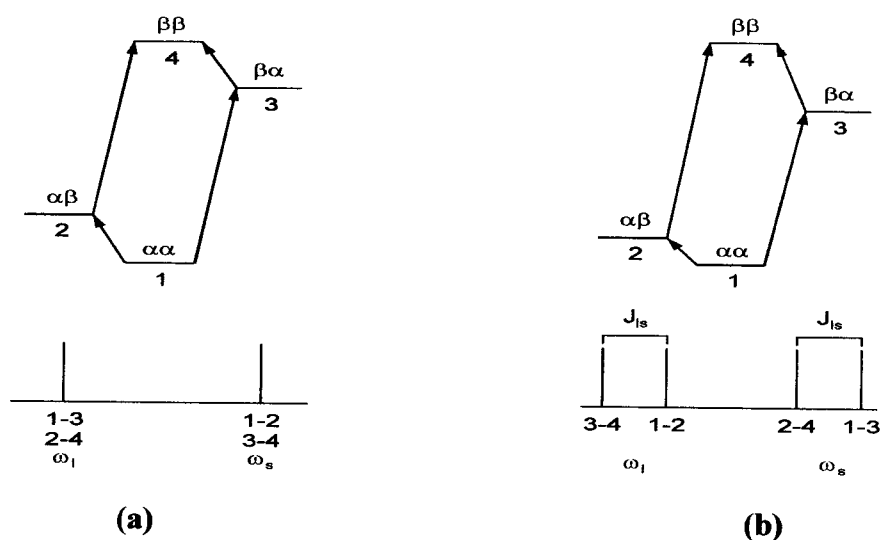


Figura A6. Níveis de energia e espectros de NMR esperados para um sistema de spin AX, na ausência (a) e na presença (b) de interação de acoplamento escalar entre os spins. As transições permitidas estão indicadas.

#### A.10.1. Tipos de acoplamento em alguns sistemas de spin

Existem diversos sistemas de spin, os mais comuns, de acordo com o número e o acoplamento deles, são classificados em: AX, A3X, A3MX, A3B3MX, A3B3MPTX, A3MPT(B3)X, AM(PT)X, A2T2(MP)X, A2(F2T2)MPX. Cada sistema desses gera um espectro de acoplamento  $J$  característico, podendo ser visto no experimento COSY. Como cada resíduo possui associado um sistema de spin, é possível separar os diversos resíduos da cadeia polipeptídica.

## Apêndice B: Instrumentação de RMN:

Um espectrômetro de ressonância magnética nuclear usual, de forma geral, precisa ter:

1. Magneto supercondutor
2. Probe
3. Programa de pulsos e um transmissor de rádiofrequência (rf)
4. Receptor
5. Computador para aquisição de dados e processamento

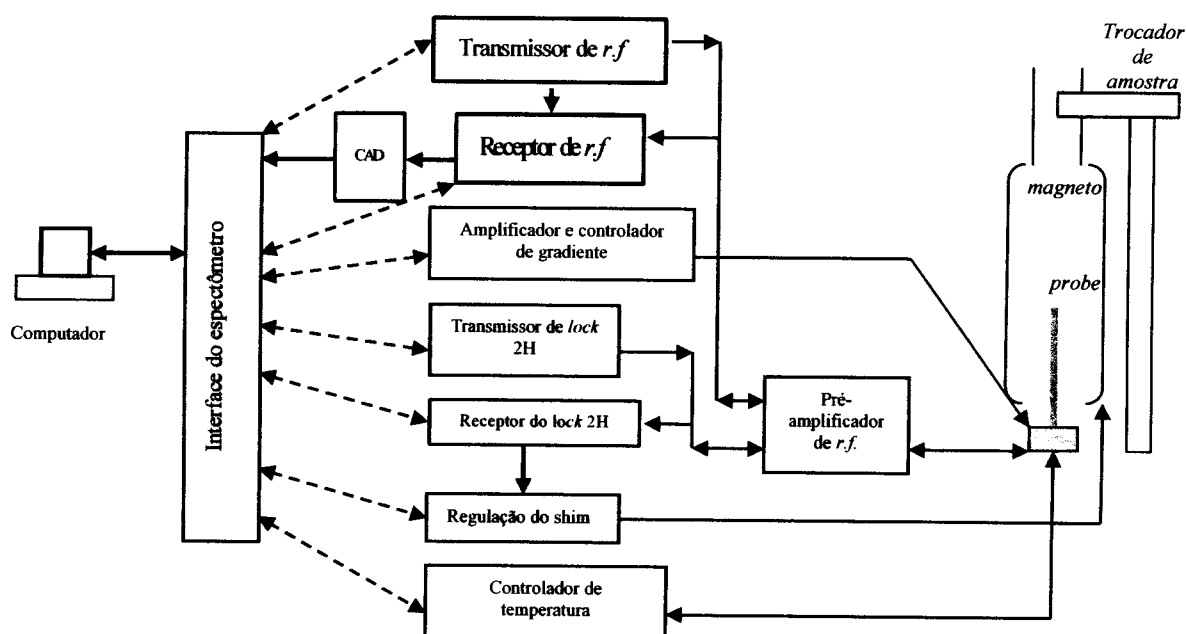


Figura B1. Esquema experimental de um espectrômetro.

O magneto consiste de um solenóide supercondutor e bobinas criogênicas resfriadas em Hélio líquido. Isso se faz necessário para a manutenção do estado supercondutor do solenóide. Uma parte do isolamento faz-se com Nitrogênio líquido, que de tempos em tempos precisa ser repostado.

Para espectroscopia de RMN a alta resolução, a estabilidade temporal e espacial da homogeneidade do campo magnético na amostra são críticas. Esta estabilidade é mantida com um sistema de LOCK. É outro espectrômetro sintonizado na frequência de ressonância de outro núcleo na solução, como o D<sub>2</sub>O (deutério). Se ocorrer um desvio, então a corrente elétrica nas bobinas é ajustada para o núcleo voltar para a sua frequência nominal.

A homogeneidade do campo magnético é melhorada com um conjunto de magnetos usualmente chamados de shims. Essa etapa da preparação da medida é crucial para a qualidade dos espectros. Quanto mais homogêneo o campo magnético, melhor a relação sinal ruído e mais próximo das condições idealizadas estará o experimento. O sistema de shim permite uma homogeneidade macroscópica da ordem de uma parte em 10<sup>9</sup>, e num espectrômetro com um campo de 17.5 T, o próton ressoa na frequência de Larmor de 750MHz.

O *Probe* é, de longe, o componente mais importante do espectrômetro. É com ele que acessamos as sondas nucleares (os spins nucleares) obtendo a informação do ambiente molecular que se encontram. Essa informação é mediada pela interação eletromagnética. Dependendo do *probe*, o circuito de *r.f* pode ser sintonizado em uma única frequência (um espécime nuclear), em duas frequências (duas espécimes nucleares) ou mesmo três frequências (três espécimes nucleares - *probe* de tripla ressonância). Ele consiste de basicamente uma bobina que emite um sinal eletromagnético de radiofrequência excitando e manipulando os spins nucleares, e recebendo o sinal da evolução da magnetização, transformando-o em uma força eletromotriz mensurável (lei de Faraday). Um controlador de temperatura acoplado ao *probe* também pode alterar e verificar a temperatura da amostra. O programador de pulsos implementa a seqüência de pulsos necessária para o experimento de RMN controlando o tempo, duração, amplitude e fase dos pulsos de *r.f*.

O receptor inclui o pré-amplificador, o detector sensível a fase, e um conversor analógico digital (*CAD*). O pré-amplificador é crítico na determinação da relação sinal/ruído,

pois a detecção e amplificação posteriores inevitavelmente amplificam o ruído do pré-amplificador. O detector sensível a fase inclui áudios-filtro que restringe a banda de frequência do espectrômetro. Inevitavelmente ele atenuará a intensidade do sinal próximo da frequência de corte do filtro. As constantes de tempo dos áudios-filtro são fontes significativas de erros de fase em espectroscopia por RMN. O CAD converte o sinal analógico amplificado para um meio digital, permitindo processamento digital posterior. O computador de aquisição de dados deve permitir a programação de pulsos, e o processamento computacional deve manipular o sinal gravado no domínio do tempo para produzir o espectro no domínio das frequências (RMN por transformada de Fourier).

A detecção do *FID* é realizada no plano a qual o campo  $B_0$  é ortogonal, ou seja, é a magnetização transversal  $M_{xy}$  que gera um campo magnético nuclear  $B_n$ , mensurável por uma bobina pela lei da indução de Faraday. Ou seja, é a variação temporal do fluxo magnético  $\Phi$  de  $B_n$  através da bobina receptora que induz nesta um potencial elétrico alternado  $V_r$ . Este sinal de RMN,  $s(t)$ , é coletado em intervalos igualmente espaçados de tempo e é representado como  $s(k \cdot \Delta t)$  para  $k = 0, 1, 2, \dots$ , no qual o intervalo de amostragem é  $\Delta t$ . A frequência de Nyquist  $f_n$  será então, o sinal senoidal de mais alta frequência amostrado pelo menos duas vezes por período, se a taxa de amostragem é  $\Delta t^{-1}$ . Isso implica um intervalo de amostragem  $\Delta t \leq 1/(2f_c)$ , onde  $f_c$  é o sinal a ser medido. Frequências  $\nu_0 > f_n$  aparecerão no espectro como uma frequência  $\nu_a$ , dado por

$$\nu_0 = 2mf_n + \nu_a \quad (\text{B1})$$

no qual o índice  $m$  é um inteiro.

As frequências dos sinais de ressonância magnética são medidas em relação a uma frequência de referência. Essas frequências podem ser positivas (frequência de ressonância maior que a referência) ou negativas (frequência de ressonância menor que a referência). A caracterização de um sinal senoidal em relação à referência requer que ambos o sinal e a

magnitude sejam determinados. Em sistemas de detecção simples (um único detector), o sinal da frequência fica indeterminado desta sequência de dados. Isto pode ser evitado gravando ambos os componentes seno e co-seno do sinal harmônico. Este tipo de detecção onde ambos os componentes são gravados é conhecido como *detecção em quadratura* [78]. As vantagens da detecção em quadratura são: (1) a referência pode ser colocada no meio do espectro, o range de frequências é reduzido pela metade, o qual reduz a potência do transmissor de *r.f.*, (2) diminuição do ruído e (3) a taxa de amostragem requerida pode ser dividida em duas partes iguais, simplificando o hardware de aquisição de dados. Um esquema pode ser visto na figura B2.

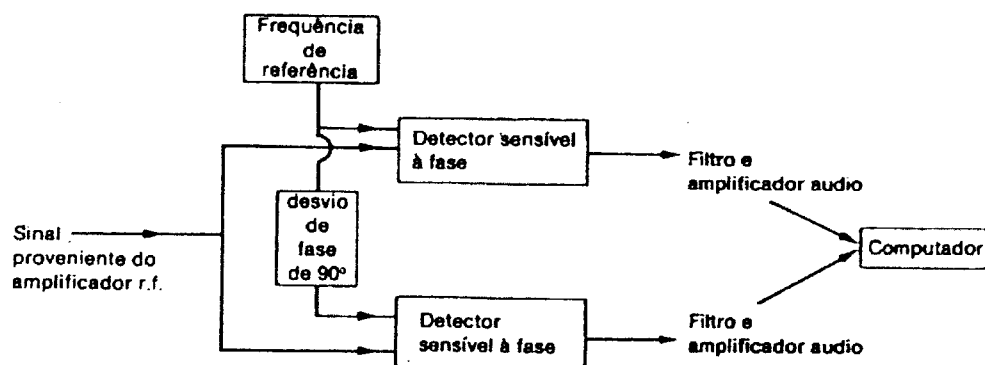


Figura B2. Esquema experimental para detecção em quadratura. O sinal recebido pelo probe e pré-amplificado é separado em dois canais paralelos. O sinal em cada canal é misturado com um sinal de referência, filtrado com um áudio-filtro passa-baixa, e digitalizado. A componente real (coseno-modulado) e a imaginária (seno-modulado) são obtidas por deslocamento da fase relativa ao sinal de referência por  $90^\circ$ . Extraído da referência [75].

Diferentemente de um experimento de difração da radiação, a propriedade geométrica e dinâmica do sistema molecular em estudo ocorre por método espectroscópico. O Efeito Overhauser Nuclear (interação de dipolo) permite a obtenção de parâmetros de distância dos núcleos magnéticos da ordem de ângstrom, mesmo usando um comprimento de onda eletromagnético da ordem de centímetros.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)