

VALMIR FADEL

**ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CROTAMINA  
EXTRAÍDA DO VENENO DA CASCAVEL *Crotalus  
durissus terrificus* UTILIZANDO RESSONÂNCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR HOMONUCLEAR.**

ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO JR

Tese apresentada para obtenção de grau de doutor em  
Biofísica, área de concentração : Biofísica Molecular.  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” – UNESP.

São José do Rio Preto  
2003

Fadel, Valmir.

Estrutura tridimensional da crotamina extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* utilizando Ressonância Magnética Nuclear homonuclear / Valmir Fadel. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003  
105 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Walter Filgueira de Azevedo Júnior  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Proteínas - Estrutura. 3. Ressonância magnética nuclear. I. Azevedo Júnior, Walter Filgueira. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 57.088

# Índice

Índice de Figuras.....	2
Índice de Tabelas.....	3
Glossário de termos e abreviaturas .....	4
Agradecimentos .....	8
Objetivos e descrição do Projeto.....	10
Prefácio .....	12
1 - Introdução à Crotamina .....	13
2 - RMN aplicada à proteínas em solução. ....	17
Assinalamento de resíduos.....	18
Cálculo estrutural .....	23
Informações acessórias: .....	26
Acoplamento escalar.....	26
Troca química dos prótons amida.....	26
3 - Materiais e Métodos .....	27
Purificação da Crotamina.....	27
Preparação da amostra para RMN .....	28
Coleta dos Espectros de RMN .....	29
Coletas dos vínculos conformacionais e cálculo estrutural. ....	31
4 - Resultados e Discussão.....	33
Conclusões .....	51
APÊNDICE A – Princípios básicos da RMN .....	52
Pulso de Rádio Freqüência (RF).....	60
Relaxação e Equações de Bloch. ....	62
Relaxação Longitudinal .....	62
Relaxação Transversal .....	63
Equações de Bloch.....	64
Sistema de Múltiplos Spins.....	67
Deslocamento Químico ( <i>Chemical Shift</i> ).....	67
Acoplamento Escalar .....	70
Nuclear Overhauser Effect (NOE).....	73
Troca Química ( <i>Chemical Exchange</i> ).....	74
APÊNDICE B – formalismo Operador Produto .....	77
Precessão livre .....	82
Pulsos de RF .....	83
APÊNDICE C – Experimentos básicos em RMN .....	85
1D RMN.....	86
Pulso de 90° .....	86
Pulso 180° .....	87
2D RMN.....	88
COSY (COrelated SpectroscopY).....	90
NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) .....	93
APÊNDICE D - RMN - Introdução Histórica.....	94
Bibliografia .....	100

## Índice de Figuras

Figura 2.1	– Diagrama para resolução de estruturas por RMN	19
Figura 2.2	– Conectividades J e dipolar entre resíduos seqüenciais	21
Figura 2.3	– Padrões TOCSY para os resíduos de aminoácidos	22
Figura 3.1	– Espectro MALDI-MS da crotamina	28
Figura 3.2	– Espectrômetros de RMN	29
Figura 4.1	– Espectro 1D da crotamina	35
Figura 4.2	– Levantamento dos NOEs seqüências e de média distância	36
Figura 4.3	– Distribuição dos NOEs coletado	37
Figura 4.4	– Região HN–H $\alpha$ dos espectro COSY da crotamina	38
Figura 4.5	– Segmento de peptídeo Leu19-Pro20-Pro21	40
Figura 4.6	– Conectividades NOEs entre os resíduos Leu19-Pro20-Pro21	41
Figura 4.7	– Estruturas calculadas para diferentes padrões de pontes dissulfeto	43
Figura 4.8	– Representação <i>ribbon</i> da estrutura final da crotamina	45
Figura 4.9	– Cadeia principal e cadeias laterais da crotamina	46
Figura 4.10	– Superfícies equipotenciais da crotamina, DLP-2 e defensina $\beta$	47
Figura 4.11	– Superposição da crotamina e DPL-2	49
Figura 4.12	– Superposição das estruturas da crotamina	50
Figura A.1	– Spin no campo magnético	53
Figura A.2	– Níveis energéticos para spin	54
Figura A.3	– Sistema Girante	58
Figura A.4	– Pulso de 90° e 180	61
Figura A.5	– Relaxação Longitudinal	63
Figura A.6	– Relaxação Transversal	64
Figura A.7	– Pulso fora de Ressonância	66
Figura A.8	– Deslocamento químico de hidrogênios em proteínas	69
Figura A.9	– Efeito do acoplamento escalar	70
Figura A.10	– Variação do ângulo diédrico com a constante de acoplamento J	69
Figura A.11	– Diagrama de níveis energéticos para sistema de 2 spins	72
Figura C.1	– Esquema da obtenção de um espectro 2D	89
Figura C.2	– Representação esquemática de um espectro COSY	92
Figura C.3	– Esquema de experimentos de RMN-homonuclear básicos	94

## **Índice de Tabelas.**

Tabela 1.1 – Seqüência primária e resíduos da crotamina .....	13
Tabela 1.2 – Alinhamento das miotoxinas.....	14
Tabela 4.1 – Deslocamentos químicos dos hidrogênios da crotamina.....	34
Tabela 4.2 –Comparação entre os cálculos para diferentes pontes dissulfeto.....	44
Tabela 4.3 –Caracterização do conjunto de estruturas representativas da crotamina	46
Tabela A.2 – Propriedades Magnéticas dos isótopos mais comuns.....	55

## **Glossário de termos e abreviaturas**

**COSY** (*Correlated SpectroscopY*) : Experimento de  $^1\text{H}$  RMN homonuclear bidimensional que revela o acoplamento escalar (J) entre spins através de até 3 ligações químicas.

**CW-RMN** (*Continuous Wave NMR*) : Uma forma de espectroscopia em que a excitação é conseguida com a aplicação de uma onda magnética de amplitude constante.

**Deslocamento Químico** (*Chemical Shift*): Deslocamento na frequência de ressonância de um spin devido ao ambiente químico no qual se encontra o núcleo atômico.

**DSS** : 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato

**Razão giromagnética** ( $\gamma$ ) : Constante de proporcionalidade entre a frequência de ressonância de um núcleo e o campo magnético aplicado.

**FID** (*Free Induction Decay*) : Representação gráfica do sinal oriundo da magnetização transversal, que decai com o tempo.

**Frequência de Larmor** : A frequência de ressonância de um spin em um dado campo magnético.

**HSQC** (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) : Experimento de RMN heteronuclear bidimensional que detecta acoplamento escalar (J) entre spins através de até 3 ligações químicas.

**Magnetização longitudinal** : Componente Z do vetor magnetização (alinhado com o campo externo).

**Magnetização transversal** : Componente XY do vetor magnetização (transversal ao campo externo).

**NOE** (*Nuclear Overhauser Effect*) : Alteração da intensidade da magnetização longitudinal pelo acoplamento dipolar entre spins.

**NOESY** (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) : Experimento de RMN bidimensional que detecta acoplamento dipolar entre spins através do espaço.

**Relaxação spin-rede ou longitudinal** : O retorno da magnetização longitudinal ao seu valor de equilíbrio alinhada com o campo externo.

**Relaxação spin-spin ou transversal** : O retorno da magnetização transversal ao seu valor de equilíbrio (zero).

**RF** : Onda eletromagnética com frequência na faixa de rádio (30kHz~300MHz).

**RMN (NMR):** Ressonância Magnética Nuclear. Técnica espectroscópica utilizada para elucidar estrutura química, estrutura tridimensional e dinâmica molecular.

**RMSD (Root Mean Square Deviation):** A medida de quanto à posição de cada átomo em uma estrutura varia para um conjunto de confôrmeros. Para cada átomo o RMSD é a raiz quadrada da soma do quadrado das distâncias entre o referido átomo em cada confôrmero e sua posição média no conjunto de confôrmeros.

**Seqüência de Pulsos :** Uma série de pulsos de RF, intervalos de tempo e gradientes magnéticos aplicados a um sistema de spins com o objetivo de produzir um sinal cujo desenvolvimento fornece informações sobre propriedades do sistema de spins.

Sistema de Spins : Um conjunto de spins conectados por acoplamento J.

**Sistema de spins** – Conjunto de spins conectados por acoplamento escalar. Em proteínas, cada resíduo de aminoácido constitui um sistema de spins, exceto para a metionina e os resíduos de aminoácidos com anéis aromáticos, que são formados por dois sistemas de spins.

**Spin :** Uma propriedade quântica fundamental das partículas fundamentais da matéria (elétrons, prótons e nêutrons). O spin nuclear dá origem ao sinal detectado na técnica de RMN, enquanto que o spin eletrônico é detectado através da técnica de EPR.

**Spin diffusion .** Transferência de energia entre spins via relaxação longitudinal ( $T_1$ ), não específica para spins próximos.



**TF (FT)** : Transformada de Fourier. Um operador matemático usado para transformar um sinal no domínio do tempo, para um sinal do domínio das frequências, e vice-versa.

**TF-RMN (FT-NMR)** : Experimento de ressonância magnética nuclear com excitação por pulsos de RF onde os dados são coletados na dimensão temporal e o espectro de frequências é obtido por transformada de Fourier. Moderna espectroscopia por RMN, em contraponto com os experimentos primordiais de RMN, quando a excitação era feita variando-se continuamente a frequência de excitação ou o campo magnético estático CW-RMN.

**TOCSY (Total Correlated Spectroscopy)** : Experimento de RMN bidimensional que detecta o acoplamento escalar (J) entre spins. Evolução do experimento COSY, com o qual pode-se detectar conectividades entre núcleos pertencentes a um sistema de spins, mesmo que conectados por mais do que três ligações químicas.

**Troca Química (Chemical Exchange)** : A troca entre elementos equivalentes em uma molécula.

**Vetor Magnetização** : Um vetor que representa a soma das magnetizações individuais de um sistema de spins.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. Pela orientação dedicada na realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo na convivência diária e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Kurt Wüthrich pela orientação durante meu estágio em seus laboratórios e também pela recepção e atenção a mim dispensada, fazendo-me sentir desde os primeiros instantes como um membro pleno de seu grupo de pesquisa.

À Pascal Bettendorff, meu supervisor no grupo do Prof. Wüthrich, sempre solícito e disposto a orientar-me e a transmitir-me seus conhecimentos.

Ao Prof. Tetsuo Yamane, proponente deste trabalho e mediador dos contatos iniciais com o Prof. Wüthrich, pela oportunidade única conseguida por seu intermédio.

Ao Prof. Eduardo Brandt de Oliveira pelo fornecimento da proteína e pela solicitude em discutir e sugerir caminhos na seqüência deste trabalho.

Aos Profs. Dr. João Ruggiero Neto, José Roberto Ruggiero, Marcelo Andrés Fossey e Johnny Rizzieri Olivieri pelo incentivo e apoio na realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. João Ruggiero Neto e Dr. Gustavo O. Bonilla-Rodriguez pelas sugestões para complementação deste trabalho, durante o exame de qualificação

Aos todo o corpo docente do Departamento de Física, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade, companheirismo propiciando um ambiente de trabalho produtivo, harmonioso e acolhedor.

Aos colegas do Programa de pós-graduação: Carla, Denis, Fernanda, Flavio, Gláucia, Henrique, Janaína, João Carlos, Nelson, Osmar, Patrícia, Porpeta, Priscilla, Renatinho, Sabrina e demais, pela gostosa convivência durante todo o tempo.

Aos colegas do Grupo do Prof. Wüthrich: Isabelle Allen, Rudolf Baumann, Johanna Blatter, Sophie Bonjour, Fred Damberger, Lars Dreier, César Fernandez, Francesco Fiorito, Jocelyne Fiaux, Martha Geier, Alvar Grosset, Sebastian Hiller, Christian Hilty, Simone Hornerman, Reto Horst, Rochus Keller, Donghan Lee, Daniel Perez, Christian Schorn, Christine von Schoroettter, Gehard Wider pelos bons momentos de trabalho e confraternização.

Ao “Waidspital people” Marcos Gaspar, Fedor Kurdesau, Natasha, Nuria Sanchez, Rachel Trehin e Marta Tymcio, pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários Barbosa, Ilva e Paulo pela convivência e auxílio técnico prestado.

Aos meus pais José e Lourdes e meus irmãos Marli, Valdir, Valter e Valmor pelo apoio que sempre recebi, indispensável para vencer todas e mais esta etapa.

Aos meus amigos Alfredo, Batata, Bia, Carmen, Cristina, Dory (*in memorian*) Miro, Nelson, Sonia, Tereza e Zéca, pela amizade e apoio no cumprimento de mais esta etapa.

Ao meu filho Ian por ser quem é.

À FAPESP e CAPES (processo BEX1243/01-2) pelo suporte financeiro durante as viagens ao exterior.

## **Objetivos e Descrição do Projeto.**

O projeto do qual resultou esta tese possui três focos principais, ou seja: resolução estrutural, treinamento profissional e cooperação internacional.

A resolução da estrutura tridimensional da proteína crotamina, extraída do veneno da cascavel sul americana *Crotalus durissus terrificus* insere-se nos objetivos da colaboração entre o Instituto Butantan e o Laboratório de Sistemas Biomoleculares do Departamento de Física do IBILCE, integrantes do CAT-Centro de Toxinologia Aplicada do programa Cepid-Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão e SmolBNet, processo 01/07532-0, ambos programas da FAPESP. De interesse farmacológico, a busca pela estrutura da crotamina vem de longa data, sendo que tentativas de resolução por cristalografia/difração de raios X mostraram-se infrutíferas por dificuldades na cristalização da mesma. A técnica escolhida e então aplicada foi a Ressonância Magnética Nuclear Homonuclear em solução. Concomitante e de forma independente, a estrutura tridimensional da crotamina foi obtida pelo mesmo método também pelos pesquisadores Nicastro *et al* (2003).

O treinamento na técnica foi realizado por mim durante um estágio nos Laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear do Grupo do Prof. Kurt Wüthrich no Instituto de Biofísica e Biologia Molecular do Departamento de Biologia da ETHZ-Escola Técnica Federal Suíça de Zurique pelo período de um ano, com suporte financeiro do

programa PDEE-Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior da CAPES-Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, processo BEX1243/01-2.

A cooperação internacional entre nosso Departamento e o Grupo do Prof. Wüthrich tem como primeiros resultados o próprio treinamento realizado e a publicação da estrutura tridimensional da crotamina por nós obtida, em artigo que atualmente encontra-se em redação final. A importância da presente colaboração é inestimável, tanto pela inegável qualidade da instituição no exterior como pela excelência do Grupo do Prof. Wüthrich, principal desenvolvedor da técnica empregada e agraciado com o prêmio Nobel de Química de 2002.

## **Prefácio**

O presente volume, em seu capítulo primeiro descreve a proteína alvo deste estudo, a crotamina, apresentando as justificativas para este trabalho, mas dando especial ênfase nas informações relativas aos seus aspectos estruturais encontrados na literatura

Além de descrever o trabalho realizado, como primeira tese da área de RMN elaborada neste programa de pós-graduação, tem como objetivo fornecer um texto introdutório à técnica da RMN. Por este motivo, embora não seja muito aprofundada, a parte destinada à descrição dos aspectos teóricos da técnica é relativamente extensa. Com o objetivo de melhor equilibrar as partes desta tese, os conceitos mais básicos de RMN foram colocados nos Apêndices A, B e C deixando para o capítulo segundo a apresentação da RMN aplicada á solução de estruturas. Portanto, uma leitura mais básica deve incluir os Apêndices entre os capítulos 1 e 2.

O trabalho por mim realizado iniciou-se com a proteína já purificada no Instituto de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e no capítulo 3 temos um breve relato da purificação. A seguir, no mesmo capítulo relata-se os materiais e procedimentos empregados na aplicação do método, descrito no capítulo 2.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos, juntamente com a discussão que os mesmos suscitam.

No Apêndice D temos uma breve descrição do desenvolvimento histórico da RMN.

# 1 - Introdução à Crotamina

A Crotamina é uma proteína extraída do veneno da serpente sul americana *Crotalus durissus terrificus*. A atividade biológica da crotamina e dos outros membros de sua subfamília dentro das miotoxinas é caracterizada pela sua ação sobre células musculares esqueléticas, causando danos ou a morte destas células. Esta ação se dá pela dilatação do retículo endoplasmático rugoso e sua conseqüente degeneração, conseqüência da alteração provocada pela proteína no transporte de íons de sódio através da membrana da célula muscular. O incremento da quantidade de Na<sup>+</sup> no interior da célula provoca o inchaço do retículo sarcoplasmático pela excessiva retenção de água. A inabilidade da célula em regular seu equilíbrio osmótico leva à sua degradação (Ownby, 1998).

Primeiramente isolado por Gonçalves e Vieira (Goncalves & Vieira, 1950), possui peso molecular de 4,88kDa, composta por 42 aminoácidos (Laure, 1975). Possuindo 9 lisinas e 2 argininas, é extremamente básica, com pI=10,3 (Gonçalves, 1956). A presença de 6 cisteínas interligadas por pontes dissulfeto confere à crotamina alta estabilidade conformacional (Hampe *et al.*, 1978). A lista completa dos aminoácidos e a seqüência primária da crotamina podem ser verificadas na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1. Seqüência primária da Crotamina e composição de aminoácidos.**

1	10	20	30	40
YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGS				
9 Lisinas	3 Serinas	2 Histidinas	1 Isoleucina	
6 Cisteínas	2 Argininas	2 Triptofanos	1 Leucina	
5 Glicinas	2 Aspartato	1 Glutamato	1 Metionina	
3 Prolinas	2 Fenilalaninas	1 Glutamina	1 Tirosina	

Como um polipeptídeo pequeno, básico, mionecrótico e sem atividade enzimática, a crotamina faz parte de uma das três subfamílias de peptídeos encontradas em venenos de serpentes, chamadas miotoxinas (Ownby, 1998). Estas proteínas apresentam uma alta homologia nas suas seqüências primárias, como visto na Tabela 1.2, que aliada à alta similaridade entre suas atividades biológicas, sugerem uma estrutura terciária comum a todas.

**Tabela 1.2. Alinhamento das seqüências primárias de 8 proteínas pertencentes à família das miotoxinas. Posições onde são verificadas diferenças estão em destaque.**

MYX1_CRODU	YKQCHKKGGH	CFPKEKICLP	PSSDFGKMD	RWRWKCCCKG	SG
MYX1_CROVV	YKQCHKKGGH	CFPKEKICLP	PSSDLGKMD	RWKWKCCCKG	SG
MYX_CROAD	YKRCHKKGGH	CFPKTVICLP	PSSDFGKMD	RWRWKCCCKG	SVNNA
MYX2_CROVV	YKRCHKKEGH	CFPKTVICLP	PSSDFGKMD	RWKWKCCCKG	SVNNA
MYXC_CROVH	YKRCHKKGGH	CFPKTVICLP	PSSDFGKMD	RWKWKCCCKG	SVN
MYX1_CROVC	YKRCHKKEGH	CFPKTVICLP	PSSDFGKMD	RWKWKCCCKG	SVN
MYX2_CROVC	YKRCHKKGGH	CFPKEKICTP	PSSDFGKMD	RWKWKCCCKG	SVN
MYXC_CRODU	YKQCHKKGGH	CFPKEKICLP	PSSDFGKMD	RWRWKCCCKG	SG

MYX1\_CRODU: Crotamina de *Crotalus durissus terrificus*; MYX1\_CROVV: Myotoxin a de *Crotalus veridis veridis*; MYX\_CROAD: CAM-toxin de *Crotalus adamanteus*; MYX2\_CROVV: Myotoxin II de *Crotalus veridis veridis*; MYXC\_CROVH: Toxic peptide C de *Crotalus veridis helleri*; MYX1\_CROVC: Myotoxin I de *Crotalus viridis concolor*; MYX2\_CROVC: myotoxin II de *Crotalus viridis concolor* (Ownby, 1998).

Ao longo dos anos, a crotamina e suas similares têm sido estudadas em seus aspectos estruturais, funcionais e biofísicoquímicos, com resultados revistos por Ownby (1998). O grande senão no entendimento destas proteínas estava no desconhecimento de sua estrutura tridimensional. Apesar das inúmeras tentativas, não se tem relato de sucesso na cristalização de nenhuma das proteínas desta família.

Algumas características da crotamina, como baixo peso molecular, solubilidade e estabilidade em solução, abundância na composição do veneno bruto e purificação factível, torna-na uma proteína suscetível de ter a solução de sua estrutura tridimensional estudada por RMN.



Estudos estruturais da crotamina incluem espectroscopia Raman (Kawano *et al.*, 1982), espalhamento de raios X a baixo ângulo-SAXS (Beltran *et al.*, 1985; Beltran *et al.*, 1990), ressonância magnética nuclear homonuclear- $^1\text{H}$ -RMN (Endo *et al.*, 1989; Nicastro *et al.*, 2003) e modelagem computacional (Siqueira *et al.*, 2002). Resultados obtidos no estudo da miotoxina *a* presente no veneno da cascavel *Crotalus viridis viridis*, o mais estudado membro da família, são geralmente estendidos à crotamina devido à alta homologia entre elas, como dito anteriormente. Dentre eles podemos citar  $^1\text{H}$ -RMN (Henderson *et al.*, 1987), estudos sobre isomerização (O'Keefe *et al.*, 1996; Nedelkov *et al.*, 1997).

Kawano *et al* (1982) sugerem ser a crotamina composta por segmentos de fita beta, hélice alfa, dobra beta e estruturas aleatórias (*random coil*). Sugere ainda que a Tyr1 e conseqüentemente, o terminal N está inserido no corpo da proteína, e que Trp32 e Trp34 estão expostos ao solvente. Beltran *et al* (1990), assumindo o padrão de pontes dissulfeto que conecta os resíduos 4-37, 11-36 e 18-30, modelam a crotamina como constituída por 2 lóbulos com diâmetros de 10Å e 22Å, conectados pela ponte dissulfeto entre os resíduos Cys18 e Cys30. Os estudos por RMN realizados por Endo *et al* (1989) limitam-se aos anéis aromáticos e concluem pela presença de duas isoformas da crotamina em solução, sugerindo diferentes razões para tal. Uma delas, a presença de isomerização *cis-trans* da Pro20 também é sugerida para a miotoxina *a* nos trabalhos de O'Keefe *et al.* (1996) e Neldekov *et al* (1997). Henderson *et al* (1987), analisando os deslocamentos químicos dos anéis aromáticos, sugerem a exposição ao solvente dos resíduos Tyr1, His5, His10, Trp32 e Trp34, além de propor uma estrutura em hélice alfa para o terminal N, colocando em proximidade os resíduos Tyr1, His5 e His10.

Mais recentemente, estruturas tridimensionais completas foram propostas para a crotamina. Usando modelagem computacional, Siqueira *et al* (2002) propõem uma estrutura estável composta por duas fitas beta e regiões aleatórias, em contradição com os resultados anteriores que sugeriam instabilidade conformacional.

Nicastro *et al* (2003) apresentam uma estrutura tridimensional resolvida por <sup>1</sup>H-NMR composta por três segmentos de fita beta e o terminal N estruturado como hélice alfa, interligados por estruturas aleatórias.

Outra contradição presente na literatura refere-se ao pareamento das cisteínas em pontes dissulfeto. Embora não haja dúvida quanto ao envolvimento das seis cisteínas presentes na formação destas pontes, dois padrões de ligação são propostos. O primeiro deles, conecta os resíduos 1-6, 2-5 e 3-4, pela ordem de aparecimento das cisteínas na seqüência primária (4-37, 11-36 e 18-30 na seqüência da crotamina) proposto por Laure (Laure, 1975), baseado em estudos bioquímicos da crotamina. O segundo, conecta os resíduos 1-5, 2-4, 3-6 pela ordem das cisteínas na seqüência primária (4-36, 11-30, 18-37 na seqüência da crotamina), proposto por (Fox *et al.*, 1979), baseado em estudos bioquímicos com a proteína miotoxina *a* e estendido à crotamina, por homologia.

## **2 - RMN aplicada às proteínas em solução.**

Uma grande quantidade de proteínas é naturalmente solúvel, ou podem se tornar solúveis em condições especiais. Seus componentes, os aminoácidos são ricos em hidrogênio, que possui spin  $\frac{1}{2}$ , o que torna estas moléculas bons alvos para estudos por RMN em solução. Diferentes aminoácidos possuem composições químicas e estruturais diferentes, mas guardando grande similaridade, de modo que as ressonâncias dos hidrogênios que os compõem aparecem agrupados por características químicas em regiões distintas num espectro de RMN (Figura A.8). Cada aminoácido constitui o que chamamos de sistema de spins. Um sistema de spins é um grupo de spins que estão conectados através de acoplamento escalar. Como, para propósitos práticos, o acoplamento escalar alcança átomos de hidrogênio separados por até 3 ligações químicas, cada aminoácido forma um único sistema de spins isolado, com exceção dos resíduos de aminoácidos aromáticos e da Metionina (Figura 2.3). Este isolamento deve-se à inexistência de hidrogênio ligado à carbonila da cadeia principal de cada resíduo de aminoácido, o que impõe uma distância mínima de quatro ligações químicas entre hidrogênios de resíduos de aminoácidos vizinhos (Figura 2.2). O agrupamento das ressonâncias em sistemas de spins é particularmente útil na identificação de ressonâncias oriundas de um mesmo resíduo de aminoácido, em um espectro de RMN.

Para uma proteína desnaturada, as ressonâncias de cada sistema de spins são equivalentes. Embora dependente da posição que estes resíduos ocupam na seqüência primária, nesta situação as ressonâncias presentes num espectro  $^1\text{H}$ -RMN

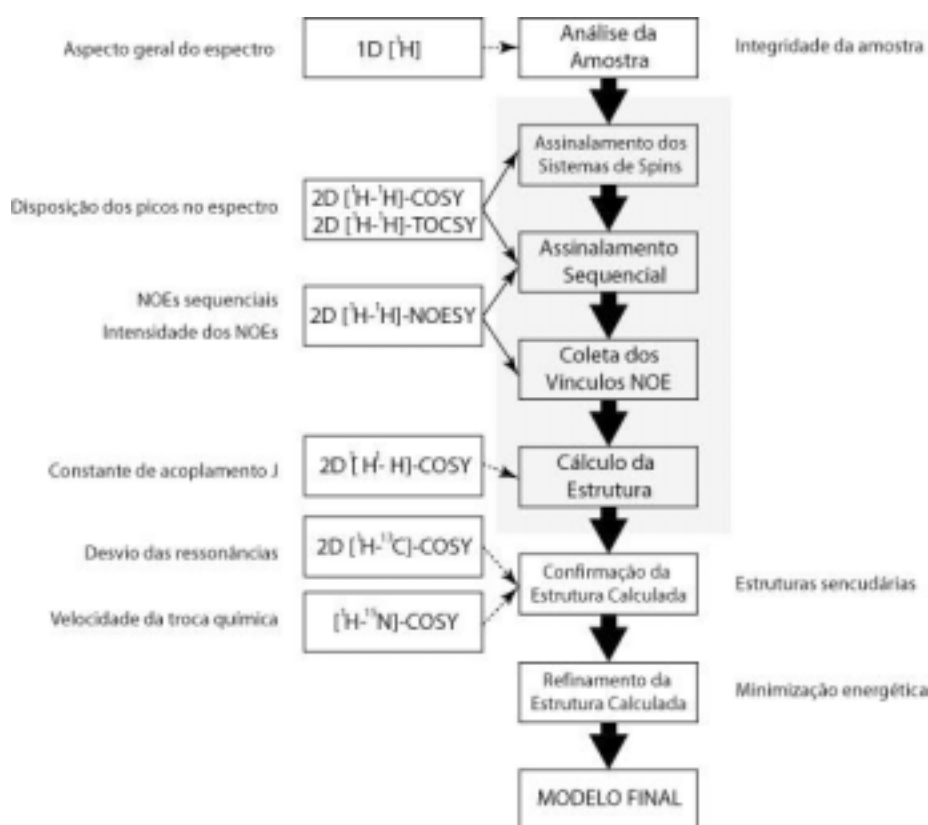
correspondem à soma dos aminoácidos constituintes da proteína. Para uma proteína estruturada isto não acontece. O ordenamento da estrutura coloca cada aminoácido em um ambiente químico-magnético distinto formado por seus vizinhos, resultando em diferentes deslocamentos químicos e uma conseqüente dispersão das ressonâncias, em relação os deslocamentos químicos quando da proteína desnaturada. Além disso, o ordenamento da estrutura coloca em proximidade espacial átomos de resíduos de aminoácidos distantes na seqüência primária, próximos o suficiente para apresentarem acoplamento dipolar (NOE), fornecendo portanto, informação estrutural.

### **Assinalamento de resíduos.**

Um dos problemas fundamentais e ponto de partida em RMN estrutural é a identificação das ressonâncias de um espectro, relacionando cada uma delas com os átomos e resíduos correspondentes, o que chamamos de assinalamento das ressonâncias. Posteriormente, conhecendo-se os deslocamentos químicos de cada átomo, as informações que conectam cada um deles, quimicamente ou espacialmente podem ser identificadas e a estrutura pode ser calculada, como mostrado no diagrama da Figura 2.1. O procedimento mais difundido para o assinalamento das ressonâncias foi desenvolvido por Wüthrich e associados (Wüthrich, 1986). Baseado nos dados fornecidos por 2 experimentos: 2D-COSY (ou seu similar 2D-TOCSY) e NOESY, e segue o seguinte roteiro:

**Assinalamento dos sistemas de spins:** Os sistemas de spins são identificados individualmente usando preferencialmente conexões via ligações químicas intra-resíduos (H-X-H e H-X-X-H) fornecidas pelos experimentos 2D-COSY ou 2D-TOCSY.

**Assinalamento dos NOEs:** Sistemas de spins de aminoácidos seqüencialmente vizinhos são identificados através da observação de conexões inter-resíduos através do espaço entre o próton ligado ao carbono alfa de um resíduo e o próton ligado ao nitrogênio do resíduo subsequente ( $d_{\alpha N}(i,i+1)$ ), o próton ligado ao nitrogênio de um resíduo e o próton ligado ao nitrogênio do resíduo anterior ( $d_{NN}(i,i-1)$ ) e do subsequente ( $d_{NN}(i,i+1)$ ), possivelmente um dos prótons ligado ao carbono beta de um resíduo e o próton ligado ao nitrogênio do resíduo subsequente ( $d_{\beta N}(i,i+1)$ ) (Figura 2.2).



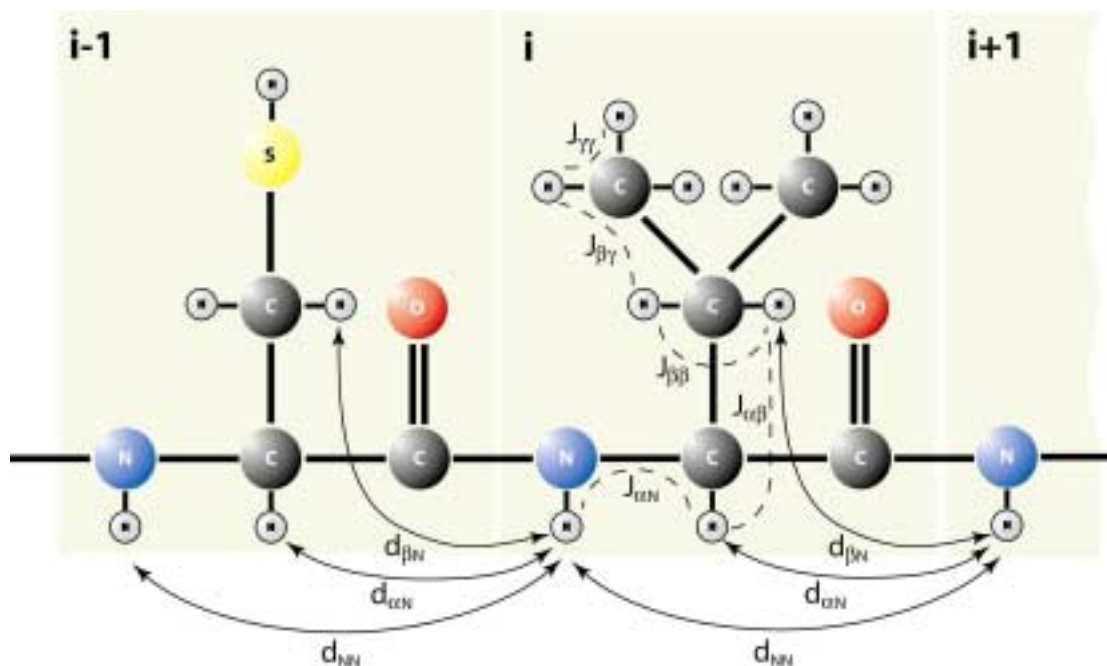
**Figura 2.1– Diagrama de Blocos do procedimento utilizado na resolução de estruturas de biomoléculas em solução por RMN homonuclear. No lado direito do diagrama estão indicados os dados experimentais extraídos dos espectros correspondentes. Sobre fundo cinza encontra-se o núcleo principal do procedimento. Setas tracejadas indicam o uso de dados complementares.**

**Assinalamento Seqüencial:** Combinando as informações obtidas anteriormente, reconhecer segmentos que são suficientemente longos para ser unicamente

identificados quando comparados com a seqüência primária da proteína, previamente estabelecida.

Através dos experimentos COSY e TOCSY ressonâncias oriundas de um mesmo sistema de spins são identificadas. Os 20 aminoácidos mais comuns produzem 10 padrões distintos em um espectro 2D-COSY para os prótons amídicos e alifáticos e 4 padrões distintos para os anéis aromáticos como pode ser visto na Figura 2.3. Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Thr e Pro são individualmente identificáveis. Lys, Arg e o grupo formado por Gln, Glu e Met podem ser também identificados individualmente, mas a alta incidência de picos na região de alto campo pode dificultar a distinção entre eles, de modo que numa classificação com menor resolução, estes cinco resíduos podem formar um só grupo. Os resíduos Ser, Cys, Asp, Asn, Phe, His, Trp e Tyr formam um grupo com padrões indistinguíveis entre si. Em adição aos padrões apresentados nos espectros 2D-COSY e 2D-TOCSY, resíduos podem ser distinguidos pela faixa de deslocamento químico que seus prótons apresentam.

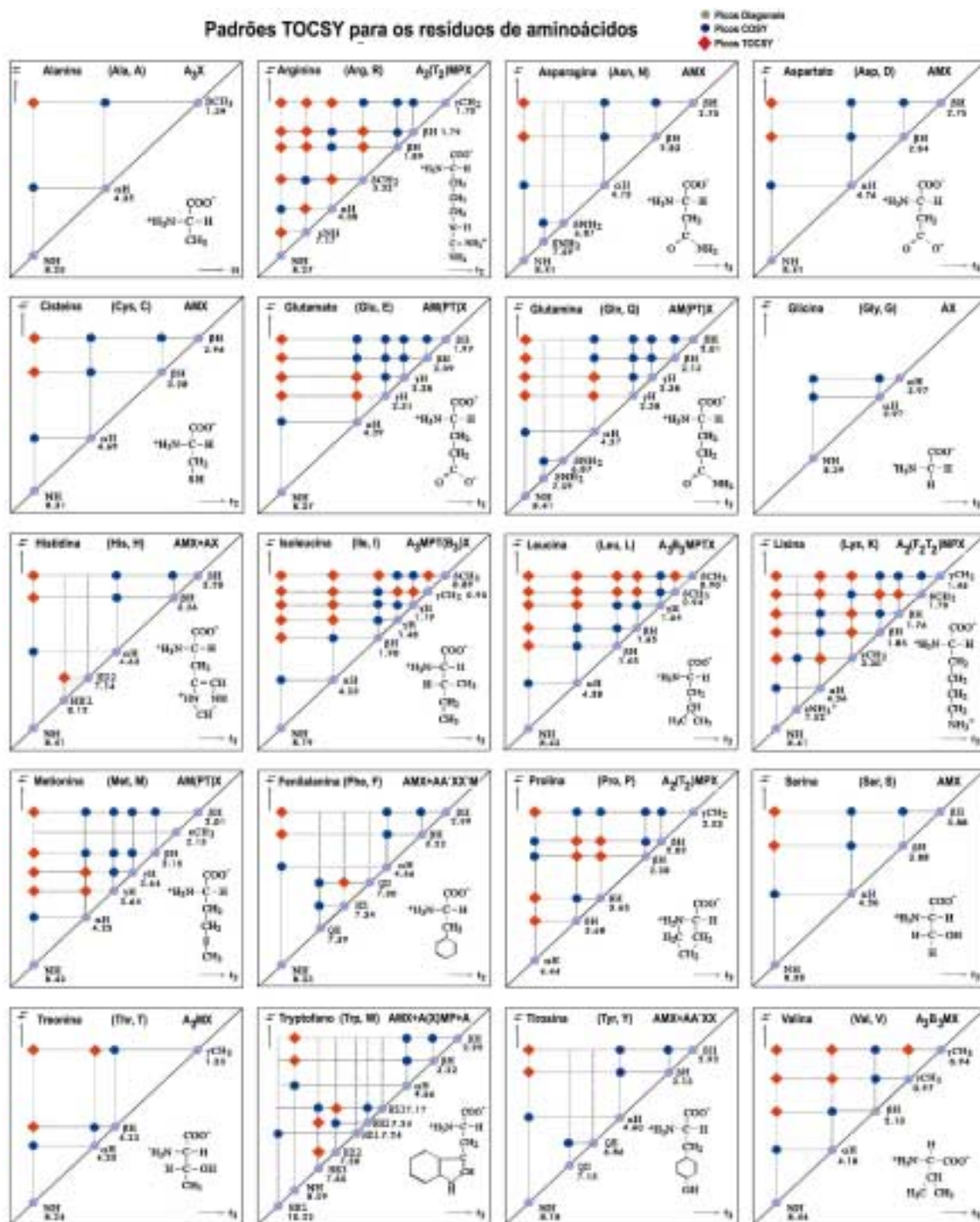
Enquanto que conexões através de ligações químicas usadas para identificar sistemas de spins não possuem ambigüidade, uma vez que o menor número de ligações entre prótons de diferentes resíduos é 4, fora do alcance do acoplamento escalar, conexões seqüenciais obtidas por NOE são, a priori ambíguas, uma vez que o enovelamento da proteína aproxima prótons não seqüenciais. Embora uma grande porcentagem das distâncias curtas observadas em um experimento NOESY que envolvam prótons



**Figura 2.2** - Segmento de um polipeptídeo com os sistemas de spins delimitados pelos fundos cinza. A linha tracejada indica as conexões intra-residuais por acoplamento J presente nos espectros COSY e as setas indicam as conexões inter-residuais presentes no espectro NOESY.

amídicos represente conectividades entre resíduos vizinhos (Billeter *et al.*, 1982), é necessária a análise destes dados conjuntamente com os dados obtidos dos experimentos COSY para evitar erros. Picos que conectam os prótons  $HN_i-H\alpha_i$  e  $HN_j-H\alpha_j$  estão presentes em ambos os espectros 2D-COSY e NOESY como pode ser identificado nos acoplamentos representados na Figura 2.2.

Comparando os picos comuns a ambos no espectro NOESY, podemos procurar pelo pico exclusivo em NOESY  $HN_{i+1}-H\alpha_i$ , e assim identificar as conexões seqüenciais. Estes sistemas de spins conectados seqüencialmente devem ser então confrontados com a seqüência primária. Um diagrama geral que contém o procedimento descrito pode ser verificado na Figura 2.1.



**Figura 2.3 – Padrões espectrais TOCSY para os 20 resíduos de aminoácidos mais comuns.** Na parte superior de cada caixa encontra-se indicado o nome do resíduo seguido dos respectivos códigos de três e de uma letra, e o sistema de spins\*. Os valores de deslocamento químico para cada próton em conformação aleatória são indicados. A nomenclatura segue o padrão IUPAC, exceto para os prótons de anéis aromáticos que seguem a nomenclatura usada pelos programas XEASY/XPLOR. No canto inferior direito é mostrada a estrutura do respectivo resíduo de aminoácido.

(Adaptada de <http://www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/people/damberge>).

\* O código mostrado utiliza letras maiúsculas representando o deslocamento químico de cada spin. As letras precedentes representam deslocamento químico em região de mais alto campo. Letras próximas indicam um acoplamento escalar forte, e letras afastadas acoplamento fraco.



## Cálculo estrutural

O assinalamento das ressonâncias, por si só não revela muito sobre a estrutura tridimensional de uma proteína. O assinalamento é um pré-requisito à coleta dos dados necessários. Taxas de troca química dos prótons amídicos, o deslocamento químico, o acoplamento escalar (J) e o acoplamento dipolar (NOE) são dependentes da conformação da proteína. O uso de informações obtidas do acoplamento escalar e da medida de taxas de troca com o solvente não são usadas diretamente no cálculo da estrutura tridimensional, mas são utilizadas de maneira acessória. A mais importante informação para o cálculo da estrutura tridimensional é o NOE. A constante de interação dipolar é proporcional ao inverso da sexta potência da distância internuclear. Numa primeira aproximação, esta constante é proporcional à intensidade dos picos de correlação num espectro NOESY. O conhecimento de algumas distâncias bem definidas na estrutura, como por exemplo prótons vicinais em anéis aromáticos ou geminais em grupos metileno, é utilizado para calibração do espectro e obtenção das distâncias internucleares do espectro NOESY, pois

$$r_i = r_{ref} \left( \frac{S_{ref}}{S_i} \right)^{1/6} \quad (1.1)$$

onde  $S_{ref}$  e  $S_i$  são as intensidades obtidas pela integração dos picos de correlação. Na prática, somente os picos de um espectro NOESY com reduzido tempo de mistura  $\tau_m$  respeitam esta proporcionalidade. Mas, como são de pequena intensidade e com relação sinal/ruído insatisfatória, adquire-se espectros utilizando um tempo de mistura maior. Nestas condições a magnetização é transferida indiretamente via *spin diffusion* e portanto, distâncias exatas entre os prótons não podem ser calculadas. As intensidades medidas são então utilizadas para a definição de distâncias limites

(basicamente, limites superiores, enquanto que os limites inferiores são fornecidos pela soma dos raios de van der Waals dos átomos envolvidos) que serão utilizadas no cálculo da estrutura.

O conjunto das distâncias interatômicas obtidas através das intensidades dos picos NOE, compõem uma matriz de distâncias, que é utilizada como parâmetro experimental no cálculo da estrutura. Os cálculos estruturais envolvem uma grande quantidade de vínculos e parâmetros, e necessitam de grande capacidade computacional. Diversos métodos podem ser implementados para a realização destes cálculos. Uma visão completa dos aspectos envolvidos no cálculo de estruturas de macromoléculas biológicas por RMN é encontrada em (Güntert, 1998). A mais recente e eficiente metodologia de cálculo e refinamento realiza dinâmica molecular por recozimento simulado (*simulated annealing*) no espaço dos ângulos de torção, como implementado no programa DYANA (*Dynamics Algorithm for Nmr Applications*) (Güntert *et al.*, 1997). Neste enfoque, a molécula é tratada como um conjunto de corpos rígidos conectados por ligações fixas, onde se permite exclusivamente o movimento rotacional nestas ligações, com funções das energias potencial e cinética propriamente definidas. Isto reduz sensivelmente o número de variáveis, em comparação com o espaço cartesiano. Particularmente, a energia potencial residual  $V$  é um parâmetro utilizado como critério de qualidade e aceitação das estruturas calculadas. DYANA utiliza como energia potencial a função definida como função alvo de minimização (*target function*) do programa DIANA (Güntert *et al.*, 1991), ou seja:

$$V = \sum_{c=u,l,v} w_c \sum_{(\alpha,\beta) \in I_c} f_c(d_{\alpha\beta}, b_{\alpha\beta}) + w_d \sum_{k \in I_d} \left( 1 - \frac{1}{2} \left( \frac{\Delta_k}{\Gamma_k} \right)^2 \right) \Delta_k^2 \quad (1.2)$$

onde os  $w_c$  e  $w_d$  são pesos para diferentes tipos de vínculos,  $f_c$  é uma função que fornece a contribuição das violações da distância  $d_{\alpha\beta}$  entre os átomos  $\alpha$  e  $\beta$  aos vínculos de distância máxima ( $u$ ), mínima ( $l$ ) ou de van der Waals ( $v$ )  $b_{\alpha\beta}$ . Pares de átomos que possuem estes vínculos pertencem ao conjunto  $I_c$ .  $\Gamma_k$  é a largura média do intervalo de ângulos de torção proibidos e  $\Delta_k$  é o tamanho da violação aos vínculos de ângulo de torção. Pares de átomos que possuem estes vínculos pertencem ao conjunto  $I_d$ . A função alvo  $V$ , com  $V \geq 0$ , é definida de modo que temos  $V=0$  somente se os vínculos experimentais e os vínculos para os ângulos de torção são preenchidos, sem superposição estérica de átomos.

Em RMN estrutural, diferentemente de estudos por difração de raios X, não se interpreta os dados experimentais com o objetivo de conseguir-se uma estrutura melhor e única, mas sim um conjunto de estruturas que satisfaçam os dados experimentais, dentro de um intervalo onde nenhuma das estruturas calculadas é melhor que outra *a priori*, representando um conjunto de configurações acessíveis à macromolécula em solução. Dentro desta visão, a qualidade do conjunto das estruturas obtidas é medida pela distribuição espacial (RMSD) dentro do conjunto das diferentes estruturas calculadas fornecendo-se os mesmos dados de entrada e com o mesmo protocolo.

## **Informações acessórias:**

### **Acoplamento escalar**

Como pode ser visto no Apêndice A, a constante de acoplamento  ${}^3J$  é proporcional aos ângulos diedros (Equação (A.23)). A análise dos valores para as constantes A, B e C de estruturas já calculadas fornecem curvas como as mostradas na Figura A.9, de onde podem ser extraídas faixas de valores possíveis para os ângulos diedros dependentes da constante de acoplamento escalar J. As medidas das constantes de acoplamento J podem ser extraídas de espectros 2D-COSY, mas são fortemente influenciadas por movimentos da proteína. Estas informações são então utilizadas de maneira conservativa, definindo regiões para possíveis ângulos diedros de maneira generosa.

### **Troca química dos prótons amídicos.**

A rapidez com que os prótons amídicos da proteína são trocados com o solvente é indicativa da blindagem destes prótons em relação ao solvente, pela conformação tridimensional da proteína ou pela presença de estruturas secundárias. As taxas de troca dos prótons amídicos podem ser medidas diluindo-se a proteína em D<sub>2</sub>O e adquirindo sucessivos espectros COSY ou NOESY de baixa resolução. Verificando-se o desaparecimento de picos pode-se classificar as taxas de troca de cada próton em rápida, média ou longa, de maneira subjetiva. Taxas de troca rápidas, por exemplo, indicam a exposição destes prótons ao solvente. Estes dados são úteis na confirmação da estrutura calculada.

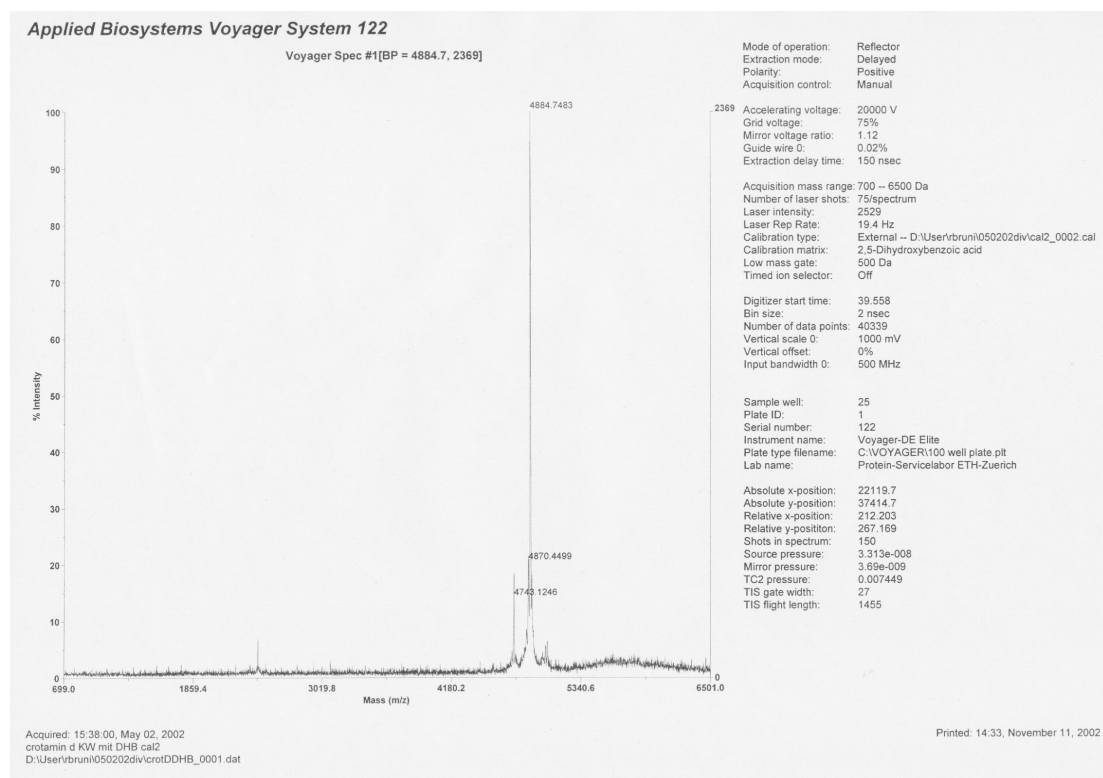
### 3 - Materiais e Métodos

#### Purificação da Crotamina

O veneno da *Crotalus durissus terrificus* foi extraído de serpentes mantidas no serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e dessecado sob vácuo. Extraíu-se 600mg de veneno bruto e dissolveu-se em 5ml de tampão formiato de amônia 0,25M. A crotoxina, principal componente do veneno, foi eliminada por centrifugação de baixa velocidade, na forma de precipitado pesado, que se forma pela adição de 20ml de água gelada à solução. O pH da solução foi levado a 8,8 pela adição de solução Tris-base, e a solução resultante foi passada por uma coluna de CM-Sepharose FF (1,5x4,5cm; Amersham-Pharmacia) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,04M, pH8,8, contendo NaCl a 0,064M. O material obtido foi dialisado em água usando-se membrana com corte de MW=3.000, sendo posteriormente liofilizada. Após hidrólise ácida (4N MeSO<sub>3</sub>H + triptamine 0,1%; 24h a 115°C) foi efetuada análise da composição de aminoácidos, indicando um resultado de 72mg (14,7μmol) de crotamina Laure, com traços de Thr, Ala e Val (pureza >98%).

A pureza da amostra foi também comprovada por análise de espectroscopia de massa realizada pelo Protein-Servicelabor ETH-Zürich do Departamento de Biologia da ETHZ, utilizando-se o espectrômetro Perseptive Biosystems Voyager Elite MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight Mass*

*Spectrometer*) no modo reflector e o resultado pode ser verificado através do espectro mostrado na Figura 3.1.



**Figura 3.1 – Espectro MALDI-MS da crotamina. O pico mais intenso (4884,743Da) confirma a massa teórica para a seqüência principal da crotamina Laure indicada na Tabela 1.1. Os dois picos de baixa intensidade (4870.4499Da 4743.1246Da) são relativos crotamina que não possui respectivamente o último e os dois últimos resíduos do terminal N.**

## Preparação da amostra para RMN

A primeira amostra foi preparada adicionando-se 570ml de água destilada e desionizada a 5,4mg de crotamina liofilizada. Após solubilização, a amostra foi transferida para um tubo de RMN.

Com a adição de 30ml de D<sub>2</sub>O, completou-se o volume de 600µl, resultando em uma concentração final de 1,8mM. Pequena quantidade de NaN<sub>3</sub> (1µl) foi adicionada para prevenir contaminação e alguns cristais de DSS foram adicionados para posterior calibração dos deslocamentos químicos.

O pH da solução final foi medido, e verificou-se o valor final de 5,8. Na preparação de amostras posteriores a crotamina liofilizada foi dissolvida em solução tampão fosfato 0,02M, pH5,8 em lugar de água.

## Coleta dos Espectros de RMN

Diversos espectros de RMN foram coletados utilizando os espectrômetros Bruker DRX500 com sonda criogênica, DRX600, DRX750 ou Avance-900 (Figura 3.2).

Espectros 1D-<sup>1</sup>H foram coletados para as diversas amostras preparadas, com o intento de confirmar-se a integridade das mesmas.



**Figura 3.2 –Fotos de três dos equipamentos utilizados para a coleta de dados de RMN. À esquerda, magneto supercondutor do espectrômetro DRX 750, no centro consoles e magneto do espectrômetro DRX-500 e à direita, magneto supercondutor do espectrômetro AVANCE-900.**

Para o assinalamento dos deslocamentos químicos da cadeia principal e das cadeias laterais, foram coletados espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY-DQF(Rance *et al.*, 1983), 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-TOCSY(Griesinger, 1996) e 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY(Wider, 1984).

Todos os espectros utilizados no assinalamento dos deslocamentos químicos foram coletados a 20°C. Espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-TOCSY e 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY adicionais foram coletados a 40°C com o intuito de distinguirem-se deslocamentos químicos ambíguos. Tipicamente, estes espectros foram coletados com janela espectral de 12kHz com 1024 incrementos em  $\tau_1$  de 2048 pontos complexos cada, usando o método States-TPPI (Marion *et al.*, 1989). Supressão de solvente foi realizada por pré-saturação e/ou WATERGATE 3-9-19 (Piotto *et al.*, 1992; Sklenár *et al.*, 1993). Não foram efetuadas medidas de curva de construção de picos NOE. Tanto para a coleta dos espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-TOCSY quanto para os espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY foram testados tempos de mistura  $\tau_m = 30\text{ms}$ ,  $60\text{ms}$  e  $100\text{ms}$ , para definir o melhor valor. O tempo de mistura  $\tau_m = 60\text{ms}$  foi escolhido e utilizado em todos os espectros coletados posteriormente.

Espectros adicionais 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY em 99,8% de  $\text{D}_2\text{O}$  foram coletados para assinalamento de deslocamentos químicos próximos à região de ressonância da água.

Para checagem dos assinalamentos, espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ]-COSY (HSQC) e 2D [ $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ]-COSY (HSQC), utilizando-se a abundância natural destes isótopos, foram coletados. As diferenças entre os deslocamentos químicos dos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  medidos e dos deslocamentos químicos para estruturas aleatórias foram calculados e utilizados para checagem dos elementos de estrutura secundária (Richarz & Wüthrich, 1978). Um espectro 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-E.COSY(Griesinger, 1987) foi coletado, e constantes



de acoplamento escalar J dele foram derivadas. Todos os dados coletados foram processados para a obtenção dos espectros 2D, utilizando-se o programa PROSA (Güntert *et al.*, 1992).

## **Coletas dos vínculos conformacionais e cálculo estrutural.**

A lista dos picos de correlação presentes nos espectros NOESY com seus correspondentes deslocamentos químicos e assinalamento foi coletada através de *pick peaking* manual e interativo, utilizando o programa XEASY (Bartels, 1995), seguindo o procedimento padrão para determinação de estrutura utilizando espectroscopia homonuclear. A integração dos picos NOE dos espectros em H<sub>2</sub>O e D<sub>2</sub>O foram realizados utilizando o módulo INTEGRATOR do programa CARA (Rochus Keller, não publicado). A lista com os valores de distâncias máximas entre os núcleos foi derivada das intensidades dos picos NOE, gerada utilizando-se o programa DYANA (Güntert *et al.*, 1997). O mesmo programa foi utilizado para realizar os cálculos estruturais. Os valores dos vínculos derivados do acoplamento escalar J utilizados no cálculo da estrutura tridimensional foram extraídos do espectro 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-E.COSY utilizando a ferramenta ECOSY do programa SPSCAN (Ralf Glaser, não publicado). Estes vínculos, juntamente com os vínculos de distâncias máximas derivadas dos valores NOE, foram convertidas em vínculos para os ângulos de torção pelo procedimento *grid search procedure* FOUND (Güntert, 1998) implementado no programa DYANA. Os vínculos para as pontes dissulfeto foram definidos após o cálculo da estrutura utilizando-se isoladamente os dois padrões propostos na literatura, em conjunto com os dados de RMN, e confrontando o resultado obtido com a estrutura calculada sem a definição das pontes dissulfeto.

Uma análise comparativa entre o conjunto de estruturas obtido dos cálculos efetuados utilizando-se os diferentes padrões para as pontes dissulfeto e o conjunto de estruturas calculadas sem a definição das mesmas permitiu a definição do padrão correto. Esta análise levou em consideração a concordância entre a estrutura calculada e os dados experimentais e o desvio rmsd do conjunto. O padrão escolhido foi utilizado no cálculo final. Os 20 melhores conformeros de um total de 100 calculados pelo programa DYANA tiveram sua energia minimizada utilizando-se o programa OPALp (Luginbühl *et al.*, 1996; Koradi, 2000) para a obtenção dos 20 conformeros definitivos para representar a estrutura calculada. O programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) foi utilizado para análise final do conjunto de modelos e para criação das figuras apresentadas neste trabalho.

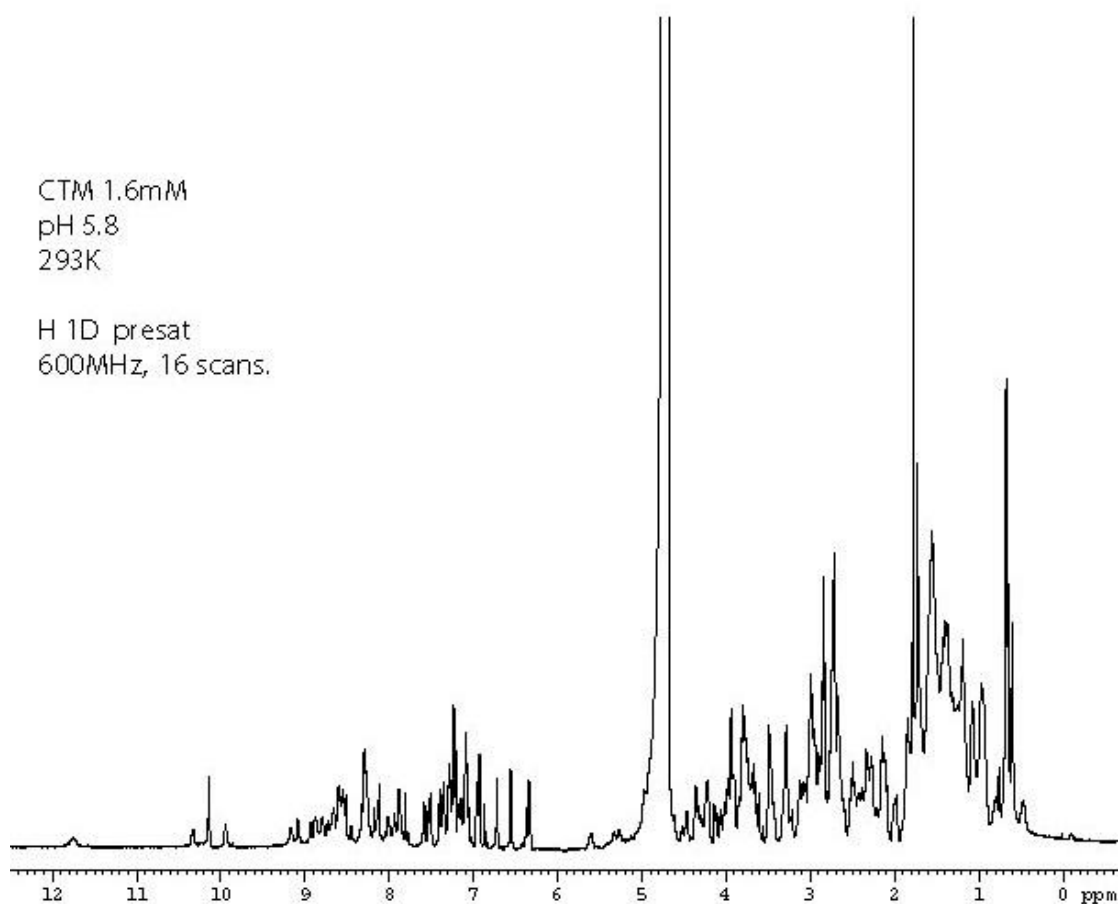
## 4 - Resultados e Discussão

Idênticos espectros 1D- $^1\text{H}$  foram coletados para as diferentes amostras preparadas oriundas de diferentes purificações, como o mostrado na Figura 4.1. O aspecto geral dos espectros 1D mostra o estado enovelado da proteína pela dispersão das ressonâncias no espectro. O mesmo resultado foi obtido quando espectros da mesma amostra, mantida em solução, foram coletados com intervalos superiores a 1 ano indicando a alta estabilidade da proteína em solução.

O assinalamento seqüencial da crotamina foi baseado nos procedimentos padrão para RMN homonuclear, usando os espectros 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY-DQF, 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-TOCSY e 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY (Wüthrich, 1986). Um total de 38 ressonâncias relativo aos prótons amídicos é esperado e 36 destas ressonâncias foram identificadas e assinaladas. As ressonâncias que faltam referem-se aos resíduos Lys2 e Gln3. Dentre as 36 ressonâncias de prótons amídicos assinaladas, 30 foram confirmadas pela presença no espectro  $^{15}\text{N}$ -HSQC-abundância natural. Para os prótons ligados aos carbonos alfa, 46 ressonâncias foram assinaladas e 44 delas confirmadas pela presença no espectro  $^{13}\text{C}$ -HSQC-abundância natural. Com relação aos prótons das cadeias laterais, 90% das ressonâncias esperadas foram assinaladas, sendo 76% delas presentes nos espectros de abundância natural. Os resíduos com assinalamento incompleto são Lys2( $\text{H}_\delta$  e  $\text{H}_\epsilon$ ), His10 ( $\text{H}_\epsilon$ ), Lys14 ( $\text{H}_\delta$ ), Phe25 ( $\text{H}_\zeta$ ), Lys38 ( $\text{H}_\epsilon$ ) e Lys39 ( $\text{H}_\delta$  e  $\text{H}_\epsilon$ ). Uma lista completa dos prótons assinalados pode ser vista na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Lista dos deslocamentos químicos dos prótons assinalados para a crotamina. Sobre fundo cinza estão os deslocamentos químicos identificados nos espectros N<sup>15</sup> e C<sup>13</sup>-HSQC com abundância natural.**

	H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	outros
Tyr 1	-	3,38	2,70; 2,62	H <sup>δ</sup> 6,44; H <sup>ε</sup> 6,66;
Lys 2	-	3,59	1,60; -	H <sup>γ</sup> 1,08; -; H <sup>δ</sup> -; -; H <sup>ε</sup> -; -;
Gln 3	-	4,01	1,84	H <sup>γ</sup> 2,37; 2,25; H <sup>ε</sup> 7,44; 6,82
Cys 4	8,77	4,58	3,13; 3,07	
His 5	9,20	4,93	3,26; 3,24	H <sup>δ1</sup> -; H <sup>δ2</sup> 6,97; H <sup>ε1</sup> 7,59; H <sup>ε2</sup> -
Lys 6	8,36	4,09	1,96	H <sup>γ</sup> 1,58; 1,49; H <sup>δ</sup> 1,67; -; H <sup>ε</sup> 2,94; -;
Lys 7	7,40	4,17	1,71; 1,63	H <sup>γ</sup> 1,19; -; H <sup>δ</sup> 1,35; 1,13; H <sup>ε</sup> 2,38; 2,24;
Gly 8	8,04	4,34; 3,86		
Gly 9	8,24	3,57; 4,98		
His 10	8,72	4,64	2,77; 2,73	H <sup>δ1</sup> -; H <sup>δ2</sup> 6,47; H <sup>ε1</sup> -; H <sup>ε2</sup> -
Cys 11	8,65	5,71	3,14; 2,90	
Phe 12	10,44	4,95	2,95; 2,39	H <sup>δ</sup> -; 7,34; H <sup>ε</sup> -; 7,39; H <sup>ζ</sup> 7,29
Pro 13		3,13	1,72; 1,54	H <sup>γ</sup> 1,09; -; H <sup>δ</sup> 3,39; 3,18
Lys 14	7,99	3,59	1,67; 1,38	H <sup>γ</sup> 1,26; 1,08; H <sup>δ</sup> -; -; H <sup>ε</sup> 2,83; -;
Glu 15	8,66	3,90	1,91; 1,82	H <sup>γ</sup> 2,28; 2,11;
Lys 16	7,69	3,87	1,64; -	H <sup>γ</sup> 0,82; -; H <sup>δ</sup> 1,31; 1,04; H <sup>ε</sup> 2,43; 2,09;
Ile 17	8,38	3,91	1,69	H <sup>γ1</sup> 1,48; 1,09; H <sup>γ2</sup> 0,71; H <sup>δ</sup> 0,76
Cys 18	8,83	4,39	2,84; -	
Leu 19	8,11	4,34	1,47; 1,30	H <sup>γ</sup> 1,29; H <sup>δ</sup> 0,79; -
Pro 20		4,83	2,51; 2,32	H <sup>γ</sup> 1,92; 1,75; H <sup>δ</sup> 3,54; 3,39
Pro 21		4,43	2,49; 1,98	H <sup>γ</sup> 2,20; 2,01; H <sup>δ</sup> 3,86; 3,82
Ser 22	7,88	4,25	4,05; 3,91	
Ser 23	8,55	4,05	3,81; 3,77	
Asp 24	7,34	4,89	2,21; 3,24	
Phe 25	8,64	5,03	3,59; 2,63	H <sup>δ</sup> -; 7,07; H <sup>ε</sup> -; 7,20; H <sup>ζ</sup> -
Gly 26	8,76	4,33; 3,94		
Lys 27	8,61	3,96	1,91; 1,84	H <sup>γ</sup> 1,60; 1,38; H <sup>δ</sup> 1,79; 1,67; H <sup>ε</sup> 3,06; 2,99;
Met 28	8,70	3,92	2,24; 1,87	H <sup>γ</sup> 2,60; 2,44;
Asp 29	8,90	4,72	3,03; 2,43	
Cys 30	8,37	4,57	3,17; 3,08	
Arg 31	8,28	4,13	1,68; 1,49	H <sup>γ</sup> 1,37; 1,34; H <sup>δ</sup> 2,58; 2,54;
Trp 32	8,22	4,46	3,33; 3,20	H <sup>δ1</sup> 7,32; H <sup>ε1</sup> 10,24; H <sup>ε3</sup> 7,64; H <sup>ζ2</sup> 7,51; H <sup>ζ3</sup> 7,17; H <sup>η2</sup> 7,25
Arg 33	8,38	3,39	1,94; 1,84	H <sup>γ</sup> 0,91; 0,59; H <sup>δ</sup> 2,78; -;
Trp 34	8,98	5,08	3,41; 3,06	H <sup>δ1</sup> 7,34; H <sup>ε1</sup> 10,25; H <sup>ε3</sup> 7,03; H <sup>ζ2</sup> 7,48; H <sup>ζ3</sup> 7,19; H <sup>η2</sup> 7,19
Lys 35	10,05	4,19	1,59; 1,54	H <sup>γ</sup> 1,19; -; H <sup>δ</sup> 1,84; 1,42; H <sup>ε</sup> 2,95; 2,77;
Cys 36	9,04	5,38	3,41; 2,96	
Cys 37	9,27	5,43	3,11; 3,03	
Lys 38	8,42	4,01	1,64; -	H <sup>γ</sup> 1,54; -; H <sup>δ</sup> 3,11; -; H <sup>ε</sup> -; -;
Lys 39	8,68	4,22	1,69; 1,65	H <sup>γ</sup> 1,29; -; H <sup>δ</sup> -; -; H <sup>ε</sup> -; -;
Gly 40	8,79	4,05; -		
Ser 41	8,24	4,47	3,89; 3,78	
Gly 42	7,97	3,73; 3,59		



**Figura 4.1 – Espectro 1D-<sup>1</sup>H da crotamina mostrando o estado enovelado da proteína, pela dispersão das ressonâncias. As ressonâncias presentes á esquerda da linha de ressonância da água (5-6ppm) são indicativas da presença de hélice alfa na estrutura. O intenso pico em 1,7ppm é originário da metila do resíduo Met28.**

Pela sua composição de aminoácidos, espera-se encontrar 43 picos intra-residuais  $H_N-H_\alpha$  no espectro 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-COSY-DQF e 39 deles foram assinalados (Figura 4.4). As exceções foram os resíduos Lys2 e Gln3. O pico correspondente à Lys35 é invisível a 20°C, mas é perfeitamente identificável a 40°C. Uma pequena quantidade de picos não assinalados está presente no espectro COSY-DQF, devido possivelmente à presença de isoformas em pequena concentração na amostra (Toyama *et al.*, 2000).

A ausência de picos para os resíduos Lys2 e Gln3 faz parte do comportamento verificado para os resíduos que compõem o terminal N: As intensidades dos picos de

correlação para estes resíduos variam de forma crescente quando avançamos na seqüência primária.

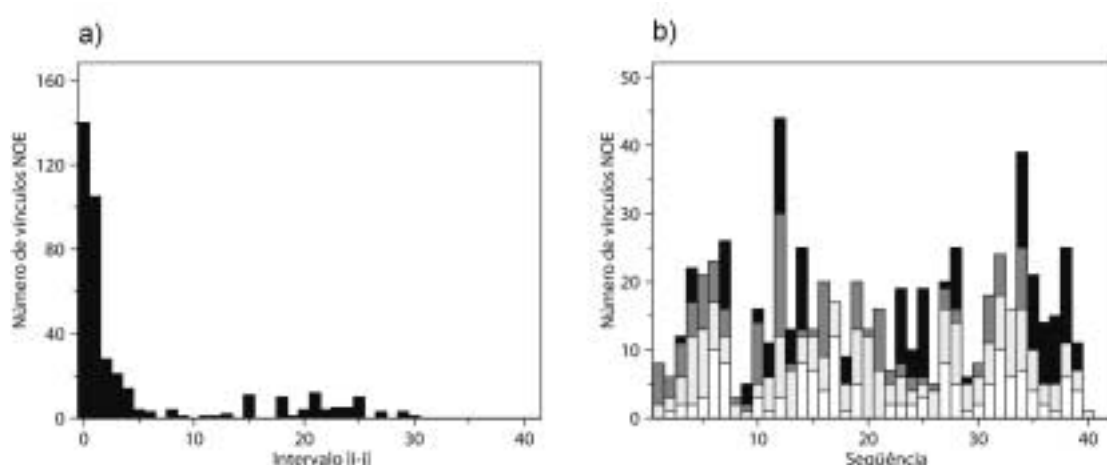
Para os resíduos Cys4 e His5, os picos apresentam intensidade reduzida, voltando a apresentar valores compatíveis a partir do resíduo Lys6. Este comportamento é indicativo da instabilidade de parte da hélice alfa que abrange os nove primeiros resíduos do terminal N.



Figura 4.2 –Na parte superior da figura temos a seqüência primária da crotamina com as pontes dissulfeto adotadas no cálculo final das estruturas, como determinadas pelo presente estudo por RMN. A seguir o levantamento dos NOEs seqüenciais e de média distância. Para as conectividades NOE, barras grossas e finas indicam intensidades fortes e fracas para os picos NOE. A linha  $d_{\alpha N}$  contém também os NOEs  $d_{\alpha\beta}$  para os segmentos Xxx-Pro. NOEs de média distância são indicados por linhas conectando os dois resíduos que são relacionados pelo NOE. Caixas retangulares indicam as estruturas secundárias presentes na estrutura calculada. Na parte inferior, gráfico de barras mostrando os desvios do deslocamento químico dos carbonos da cadeia principal em relação à estrutura aleatória. Desvios positivos são indicativos de estruturas em hélice alfa e desvios negativos são indicativos de estruturas em fita beta (Richarz & Wüthrich, 1978).

A presença do grupo NH<sub>2</sub> no terminal N, que realiza troca química rápida com o solvente, tem como consequência uma maior permeabilidade do solvente para o interior da hélice, alterando o conjunto de pontes de hidrogênio e desestabilizando-a parcialmente. Como o solvente tem o acesso dificultado na parte mais profunda da hélice, esta região permanece mais tempo estruturada, contribuindo com sinal de maior intensidade. A presença da ponte dissulfeto entre Cys4 e Cys36, também contribui para a estabilidade da parte mais profunda da hélice alfa em questão.

Um total de 1179 picos foi assinalado no espectro 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-NOESY e deles 345 vínculos de distância máxima (upl - *upper limit constraints*) foram extraídos. Do espectro 2D [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H]-NOESY em D<sub>2</sub>O, 48 novos e não ambíguos upl foram extraídos e adicionados à coleção de upls precedente. Um levantamento dos NOEs de curta e média distância é apresentado na Figura 4.2 enquanto que na Figura 4.3 vemos uma classificação dos vínculos NOE pelo seu alcance e como eles se distribuem sobre a seqüência primária.



**Figura 4.3 – Distribuição do conjunto de vínculos NOE. Em a) vemos o número de vínculos contra a distância entre os resíduos conectados, na seqüência. Em b) vemos o número de vínculos intra-residuais (branco), de curta distância (cinza claro), média distância (cinza escuro) e de longa distância (preto), para cada resíduo**

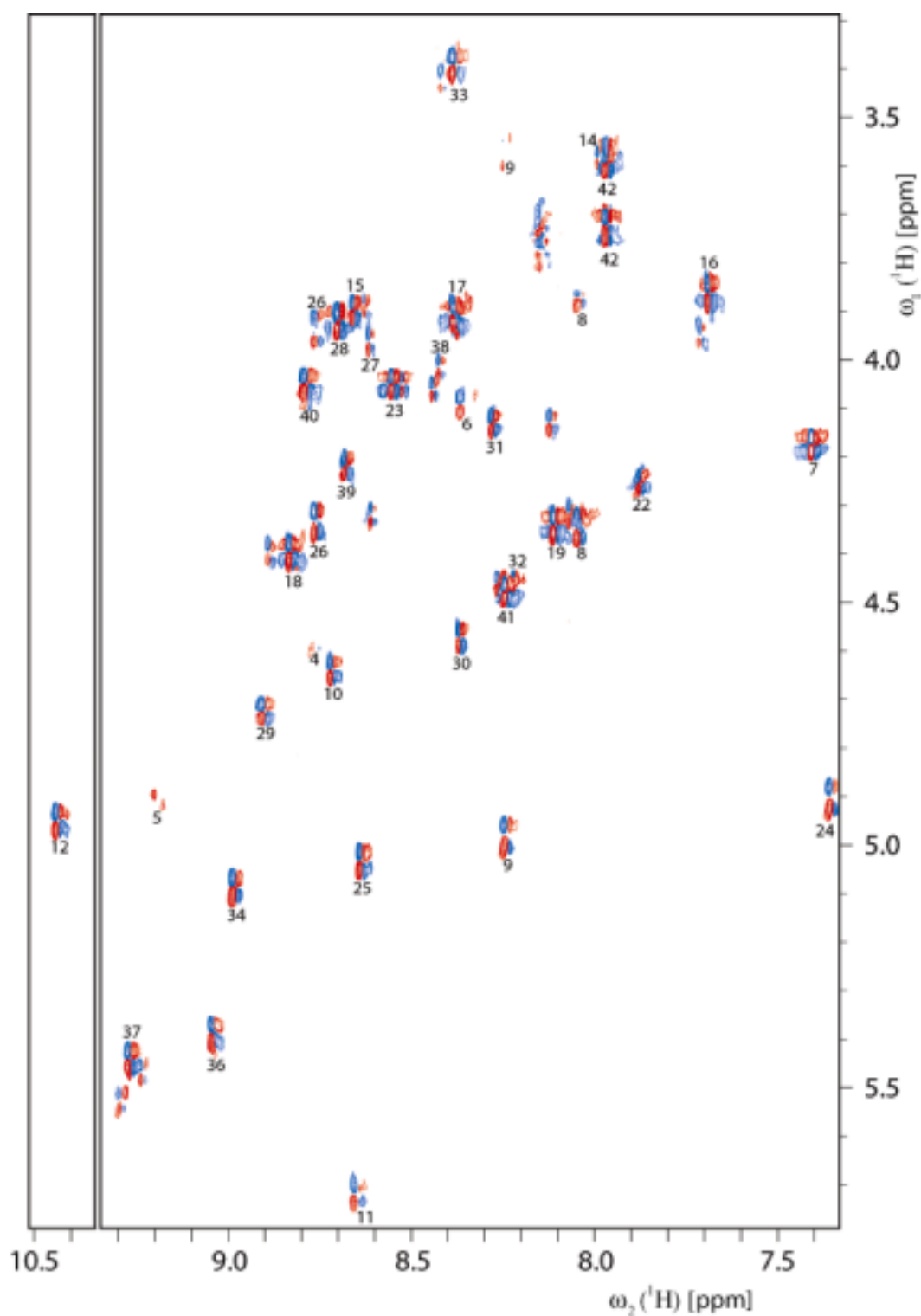


Figura 4.4 - Região de um espectro 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-COSY-DQF 750MHz da crotamina a 1,8mM, pH5,8 a 20°C, contendo picos  $^1\text{HN}$ - $^1\text{H}\alpha$ . Na estrutura fina dos picos componentes positivas são desenhadas em vermelho e componentes negativas em azul. O assinalamento das ressonâncias é dado pelo número de ordem na seqüência primária da crotamina. São esperados 43 picos considerando os 42 resíduos de aminoácidos, excluindo o N terminal e as 3 prolinas e contando dois picos para cada uma das 5 glicinas.



Do espectro 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-E.COSY, 22 vínculos de acoplamento escalar foram coletados, e em conjunção com os NOE upl, foram convertidos em 158 vínculos para ângulos diedros.

Dos espectros NOESY em  $\text{D}_2\text{O}$ , foi possível o assinalamento de picos que conectam os prótons  $\text{Leu19H}^\alpha$  e  $\text{Pro20H}^\alpha$ , indicando que o resíduo Pro20 encontra-se na configuração *cis* (Figura 4.5). A ausência de NOEs, mesmo que de baixa intensidade, conectando os prótons  $\text{Leu19H}^\alpha$  e  $\text{Pro20H}^\delta$  indicam a ausência de isomerização *cis-trans* para a crotamina, nas condições de nossa amostra (pH5.8), como proposta para a miotoxina *a* (O'Keefe *et al.*, 1996; Nedelkov *et al.*, 1997).

A variabilidade conformacional de 2 estados para a crotamina também foi proposta por Endo (Endo *et al.*, 1989), baseado na constatação do desdobramento em 2 picos da ressonância do próton  $\text{His10H}^{\delta 2}$  e para os prótons  $\text{Ile17H}^\delta$  e  $\text{Ile17H}^\epsilon$ . Estes autores citam como uma das possibilidades para esta variabilidade conformacional a mesma isomerização *cis-trans* da ligação peptídica Leu19–Pro20. Como a duplicidade de ressonância da His10 foi constatada somente para valores de pH inferiores ao da nossa amostra, estes dados não são conflitantes com os obtidos por nós. Quanto à duplicidade da ressonância dos grupos metila da Ile17, não foi verificado em nossos espectros.

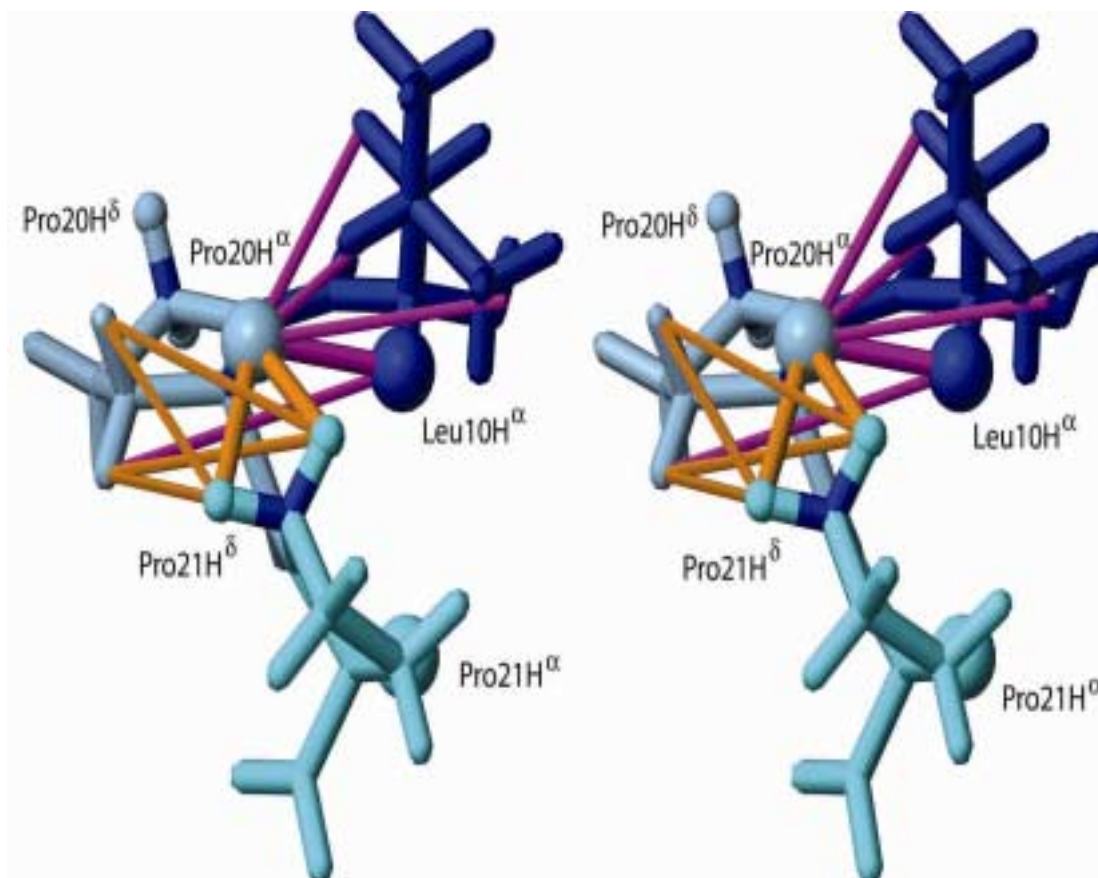


Figura 4.5 - Visão estéreo dos resíduos Leu19 (marinho), Pro20 e Pro21 (cian) mostrando a rede de vínculos extraída do espectro 2D [ $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ]-NOESY, entre os resíduos Leu19-Pro20 (margenta) e Pro20-Pro21 (laranja). Os vínculos mostrados em linhas grossas são indicadores da configuração da ligação peptídica entre estes resíduos. A presença do vínculo  $\text{Leu19H}^\alpha$ - $\text{Pro20H}^\alpha$  é indicador da conformação *cis* para o resíduo Pro20. A presença do vínculo  $\text{Pro20H}^\alpha$ - $\text{Pro21H}^\delta$  é indicador da conformação *trans* para o resíduo Pro21. Esferas grandes representam os prótons ligados ao carbono  $\alpha$  de cada resíduo, e esferas pequenas representam os prótons ligados aos carbonos  $\delta$ .

A ligação peptídica entre os resíduos Pro20 e Pro21 encontra-se na configuração *trans*, como pode ser verificado pela presença NOEs entre os prótons  $\text{Pro20H}^\alpha$  e  $\text{Pro21H}^\delta$ s (Figura 4.6). Da mesma forma, encontra-se também na configuração *trans* a ligação peptídica Phe12-Pro13, indicada pela presença dos NOEs entre os prótons  $\text{Phe12H}^\alpha$  e  $\text{Pro13H}^\delta$ s.

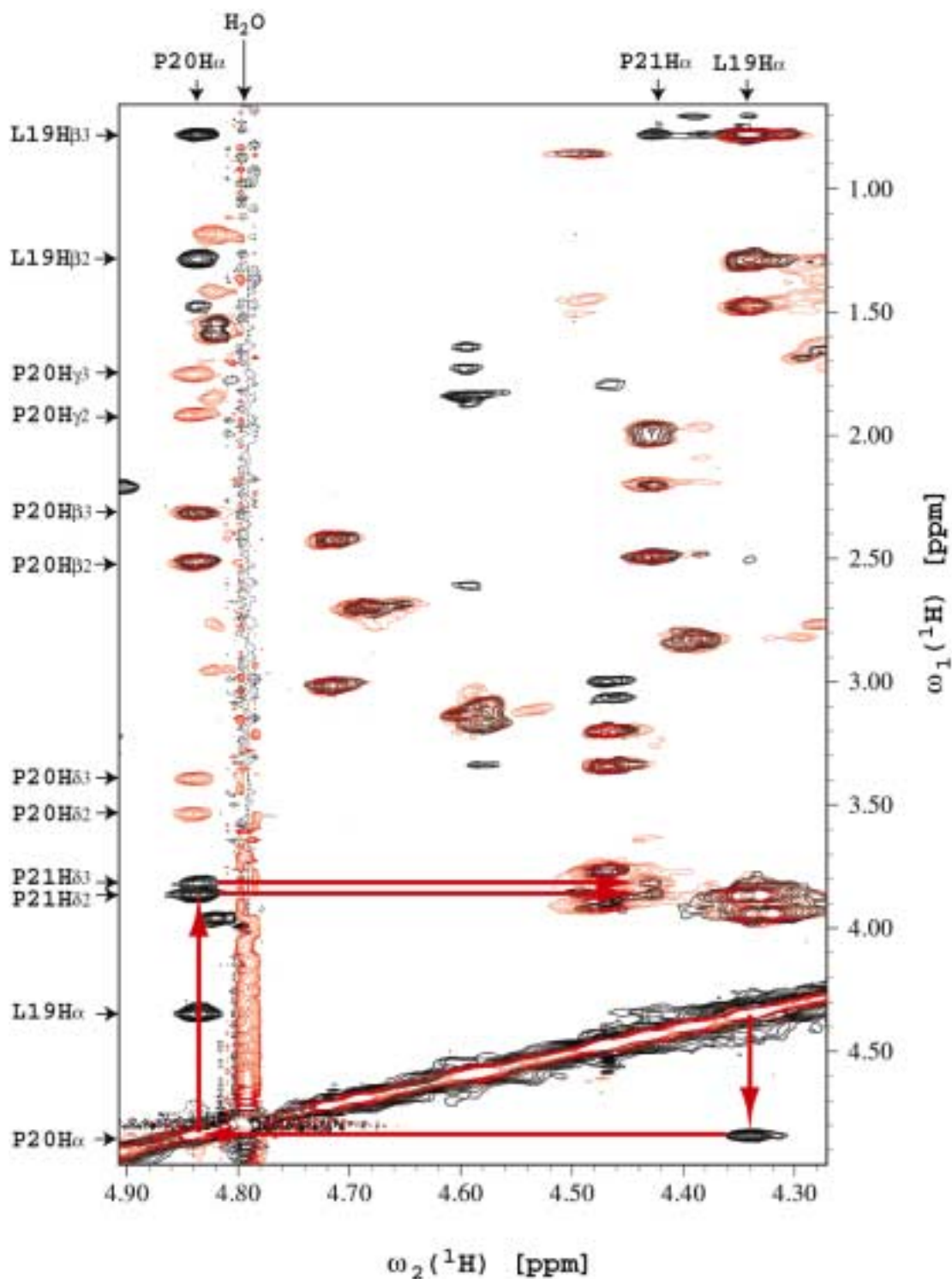


Figura 4.6 – Superposição dos gráficos de linhas de contorno dos espectros 2D  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY (em vermelho) e 2D  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY (em preto) da crotonamina em  $^2\text{H}_2\text{O}$ . A região apresentada mostra os picos relativos às ressonâncias  $\text{H}^\alpha$  dos resíduos Leu19, Pro20 e Pro21, com os átomos correspondentes indicados do lado esquerdo e na parte superior. Setas vermelhas mostram a presença dos NOEs seqüenciais  $\text{H}^\alpha$ - $\text{H}^\alpha$ -NOEs entre os resíduos Leu19 e Pro20, que é típico da configuração *cis* na Pro20, e NOEs seqüenciais  $\text{H}^\alpha$ - $\text{H}^\delta$  entre os resíduos Pro20 e Pro21, que são indicativos da configuração *trans* para o resíduo Pro21.

Para determinar o padrão correto para as pontes dissulfeto três diferentes cálculos preliminares de estrutura foram realizados e comparados. O procedimento utilizado nestes três cálculos, e também nos posteriores, fez uso do programa DYANA, sempre calculando 100 estruturas e utilizando as 20 melhores para formar um conjunto de confôrmeros representantes da estrutura calculada. Primeiramente, o cálculo foi efetuado sem a introdução dos vínculos relativos às pontes dissulfeto. A estrutura calculada desta forma usando unicamente vínculos oriundos dos experimentos de RMN, foi utilizada como referência para a comparação com as duas outras estruturas calculadas posteriormente, com a introdução dos vínculos relativos aos dois padrões indicados na literatura. Estes vínculos conectam as cisteínas, pela ordem 1-5, 2-4, 3-6, como proposto por Fox *et al* (Fox *et al.*, 1979) para a miotoxina e 1-6, 2-5, 3-4, como proposto por Laure (Laure, 1975), para a crotamina. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.2 e os confôrmeros mostrados na Figura 4.7. A inspeção destes dados, mostra uma alta similaridade entre a estrutura calculada utilizando-se o padrão proposto por 1-5, 2-4, 3-6 e a estrutura referência. A única diferença significativa verificada entre estes dois conjuntos de confôrmeros é o movimento do cotovelo que contém o resíduo Cys30, em direção ao resíduo Cys11. Baseado nestes resultados, assumiu-se como correto este padrão para o cálculo final da estrutura.

A superposição do conjunto dos 20 melhores modelos calculados, após serem energeticamente minimizados apresenta, para a cadeia principal dos resíduos 1-39, um RMSD de  $0,55 \pm 0,14 \text{ \AA}$ . A Tabela 4.3 apresenta uma visão geral da qualidade dos valores obtidos para a estrutura final da crotamina.

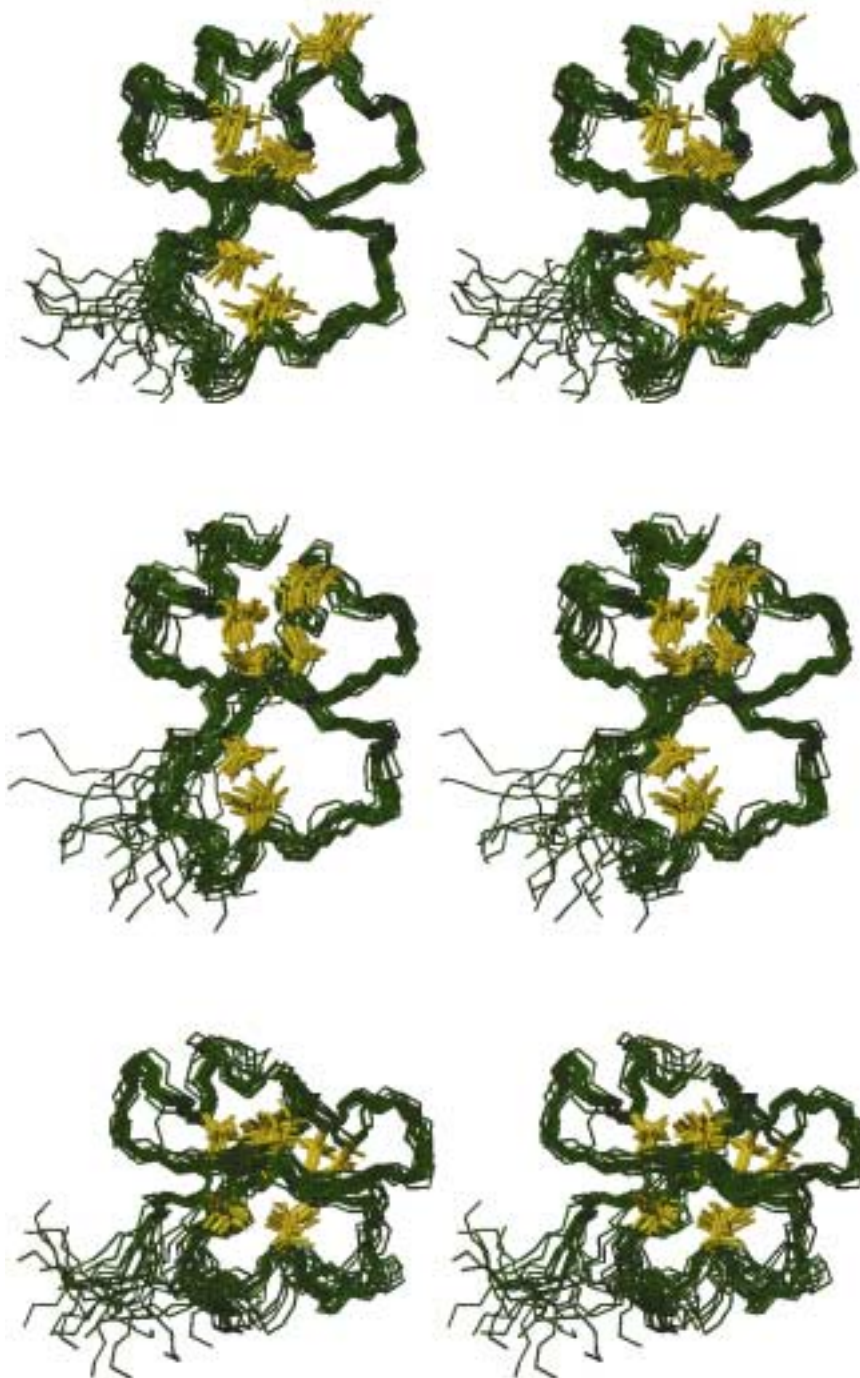


Figura 4.7 - Visão estéreo do conjunto de 20 confôrmeros calculados pelo programa DYANA, representativos da estrutura da crotamina, superpostos para uma melhor coincidência dos átomos N, C<sup>α</sup> e C' da cadeia principal para os resíduos 1-39. A cadeia principal está colorida em verde e as cadeias laterais das seis cisteínas presentes estão coloridas em amarelo. Em (a) não foram usados vínculos relativos às pontes dissulfeto, em (b) foram utilizados vínculos para as pontes dissulfeto de acordo com o padrão “1-5,2-4,3-6”, em (c) foram utilizados vínculos para as pontes dissulfeto de acordo com o padrão “1-6,2-5,3-4”. Estes cálculos preliminares indicam que o padrão “1-5,2-4,3-6” é compatível com os vínculos NOE. A Tabela 4.2 mostra dados adicionais relativos aos cálculos estruturais realizados.

**Tabela 4.2 - Valores característicos representativos dos cálculos estruturais efetuados para checagem do padrão de pontes dissulfeto para a crotamina**

Padrão de pontes dissulfeto (PD)	<i>Residual target function</i> $V^{**}$ (Å <sup>2</sup> )	Numero de violações**	RMSD (1-39) -cadeia principal- (Å)	RMSD (1-39) -átomos pesados- (Å)	RMSD (1-39) Para a cadeia principal e a estrutura calculada sem PD (Å)
Sem vínculos para as PD	3,92 ± 0,30	18	0,85 ± 0,15	1,36 ± 0,19	-
Padrão “4-36 11-30 18-37”	5,64 ± 0,33	25	0,65 ± 0,23	1,17 ± 0,26	0,97 ± 0,34
Padrão “4-37 11-36 18-30”	26,84 ± 0,83	70	1,28 ± 0,28	1,74 ± 0,31	1,68 ± 0,90

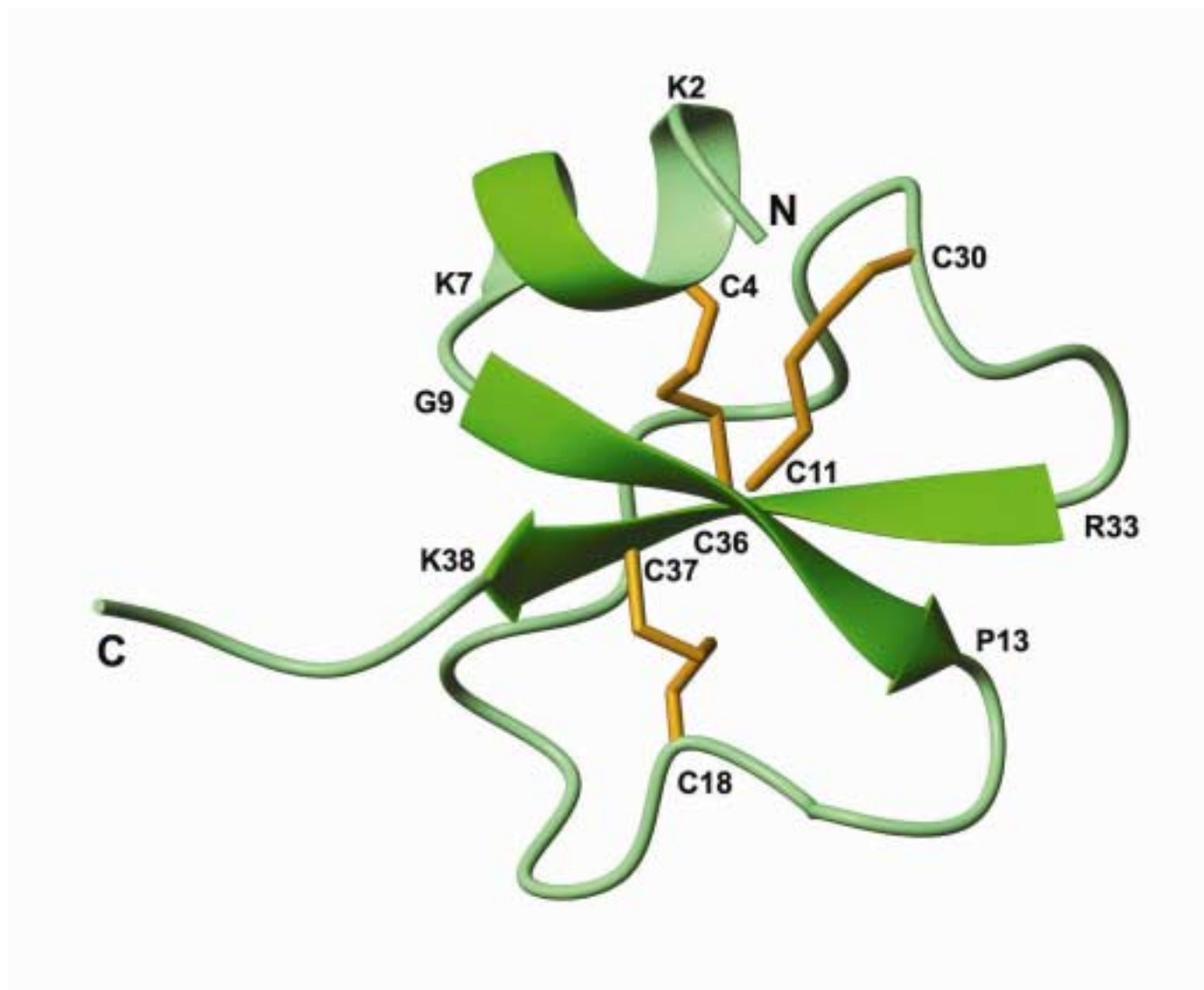
\*Equação (1.2)

\*\*Número de pares de núcleos na estrutura calculada, com distância internuclear 0,1Å ou mais, acima do limite máximo extraído dos NOEs.

Os resíduos do terminal N, como dito anteriormente, estão arrançados em uma hélice alfa, do resíduo Lys2 até o resíduo Lys7. Esta hélice alfa e o subsequente cotovelo colocam em proximidade os resíduos Tyr1, His5 e His10, como verificado por Endo *et al* (1989) e mostrado na Figura 4.8, embora não participem de uma longa e única hélice alfa como proposto por Henderson *et al* (1987). O modelo para a estrutura da crotamina apresentado por Siqueira *et al* (2002), calculado por MD, não apresenta o terminal N estruturado como uma hélice alfa. Esta é a mais evidente diferença entre a estrutura por nós calculada e o modelo citado, mas provavelmente pode ser atribuído à *bias* do modelo utilizado, a estrutura da defensina  $\beta$ , que não possui o terminal N assim estruturado.

O núcleo da proteína é formado por uma folha beta antiparalela, constituída pelos resíduos Gly9-Pro13 e Arg33-Lys38. Um longo *loop* conecta estes dois segmentos da folha beta. A estrutura é estabilizada por pontes dissulfeto que conectam uma fita beta e a hélice alfa (1-5) e a folha beta ao *loop* (2-4 e 3-6) como mostrado na Figura 4.8.

Todas as nove lisinas, assim como as duas argininas, com exceção da Lys35, tem suas cadeias laterais direcionadas para o solvente (Figura 4.9), conferindo à crotamina uma extensa superfície molecular com potencial positivo (Figura 4.10).



**Figura 4.8 - Desenho *ribbon*, na cor verde, de um confôrmero representante do conjunto de 20 estruturas calculadas da crotamina, com indicação dos resíduos que delimitam as estruturas secundárias hélice alfa (Lys2-Lys7) e segmentos de fita beta (Gly9-Pro13 e Arg33-Lys38). Em laranja estão indicadas as pontes dissulfeto, conforme determinado pelos dados de RMN, seguindo o padrão 1-5, 2-4, 3-6, conectando os resíduos Cys4-Cys36, Cys11-Cys30 e Cys18-Cys37.**



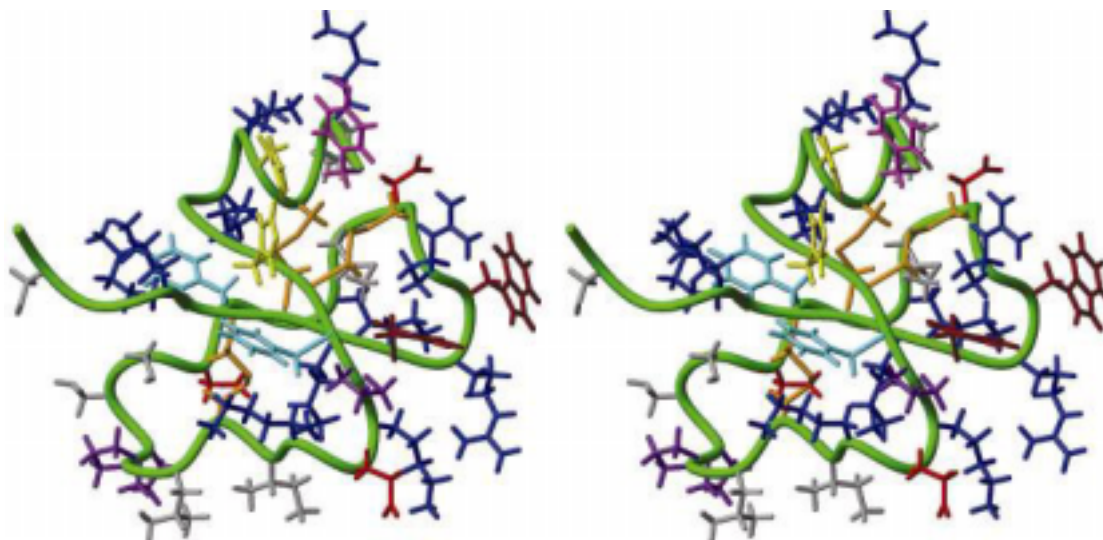


Figura 4.9 – Visão estéreo da estrutura da crotamina. Em verde, temos a cadeia principal. As cadeias laterais dos resíduos básicos Lys e Arg estão em azul, dos resíduos ácidos Asp e Glu, em vermelho, das cisteínas em laranja, dos triptofanos em marrom, das fenilalaninas em cian, das histidinas em amarelo, da tirosina em violeta, das prolínas em roxo e os demais em cinza.

Tabela 4.3 – Caracterização do conjunto das 20 estruturas calculadas pelo programa DYANA e minimizadas com o programa OPALP.

Quantidades*	
Picos NOE / Vínculos NOE (Distâncias limite máximo)	1179 / 393
Cts de acoplamento escalar J / Vínculos para ângulos diedros	22 / 158
Residual target function ( $\text{\AA}^2$ )	$0,94 \pm 0,39$
Violações dos vínculos NOE	
Número > 0,1 $\text{\AA}$	$5 \pm 2$
Valor máximo ( $\text{\AA}$ ).	$0,16 \pm 0,17$
Violações dos vínculos diedros	
Número > 2,5°	$2 \pm 1$
Valor máximo (°)	$3,57 \pm 0,83$
Energias AMBER (kcal/mol)	
Total	-539,62
Van de Waals	- 76,92
Eletrostática	-906,76
Rmsd para a estrutura média, $\text{\AA}$	
Cadeia principal (todos)	$1,20 \pm 0,28$
Átomos pesados (todos)	$1,41 \pm 0,16$
Cadeia principal (1-39)	$0,55 \pm 0,14$
Átomos pesados (1-39).	$1,08 \pm 0,1$

\* Exceto para as duas primeiras linhas, os dados caracterizam o grupo de 20 conformeros que é usado para representar a estrutura calculada por RMN; os valores médios e o desvio padrão são dados.



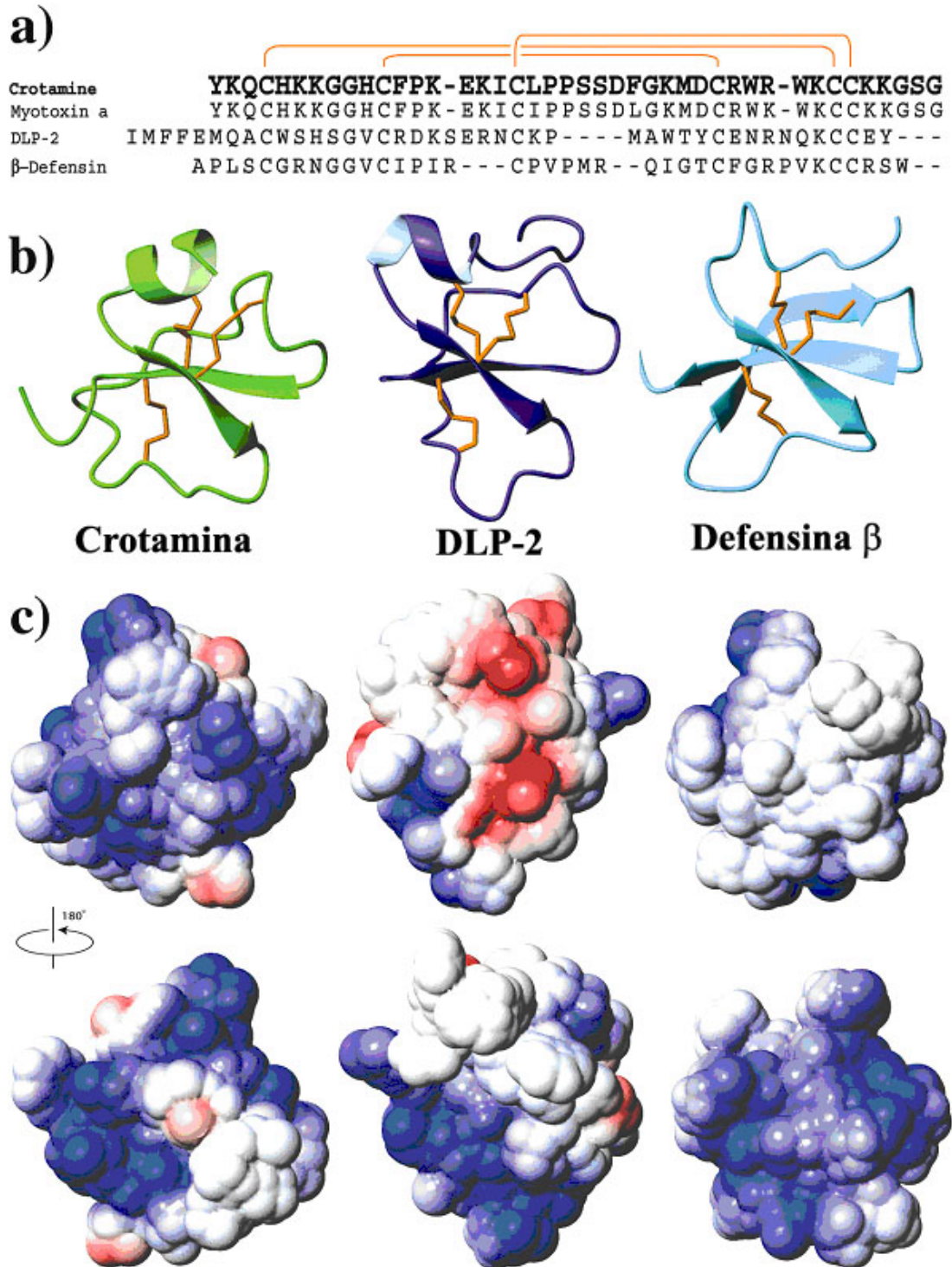


Figura 4.10 - (a) Alinhamento da seqüência primária usando CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) para crotamina, miotoxina  $\alpha$ , DLP-2 e defensina  $\beta$ . As pontes dissulfeto (na crotamina 4–36, 11–30, 18–37) são desenhadas acima das seqüências, em laranja (b) Representação *ribbon* da cadeia principal com as pontes dissulfeto em laranja. As estruturas foram superimpostas com a melhor coincidência dos átomos pesados das cisteínas. (c) Superfícies acessíveis ao solvente coloridas de acordo com seu potencial eletrostático calculado com MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996), com a mesma orientação em (b) e abaixo, rodadas em 180° no eixo vertical. Vermelho representa potencial negativo, azul potencial positivo e branco potencial nulo.

Pesquisa por similaridade estrutural realizada pelo programa DALI (Holm & Sander, 1993) mostrou que a configuração geral da crotamina é a mesma apresentada pelas proteínas que compõem a família das defensinas  $\beta$ , como já identificado por Siqueira *et al.* (2002) para o modelo obtido por dinâmica molecular, apesar da baixa similaridade bio-funcional e seqüencial entre a crotamina e os outros membros desta família (Figura 4.10). Esta similaridade estrutural é particularmente evidente quando comparamos a estrutura da crotamina com a do peptídeo DLP-2 extraído do veneno do ornitorrinco (Torres *et al.*, 2000), código pdb 1D6B. Suas configurações são altamente similares, apesar da identidade seqüencial de apenas 25%. A mais significativa diferença pode ser vista nas regiões dos terminais N e C. O terminal N da crotamina é 3 resíduos mais curto e o terminal C três resíduos mais longo, do que os da DLP-2 (Figura 4.11).

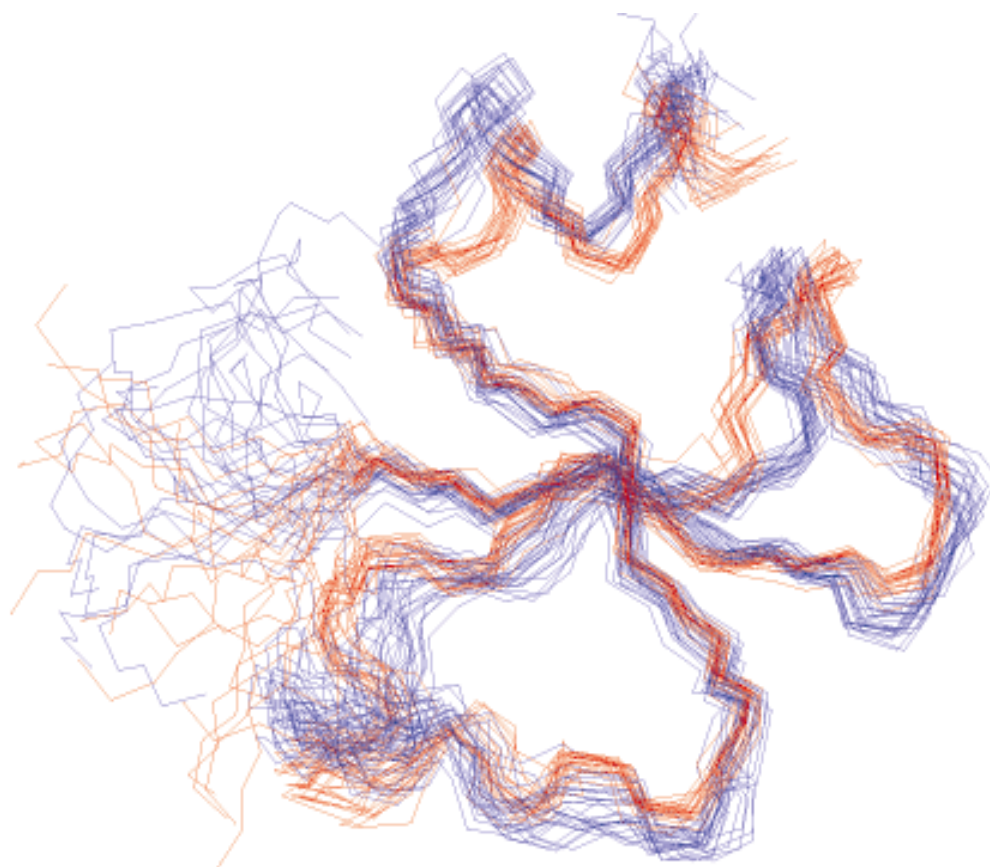
Apesar destas diferenças, o corpo das duas proteínas permanece altamente similar. A atividade biológica do peptídeo DLP-2 não é bem definida ainda, mas sabe-se que o mesmo não apresenta atividade miotóxica. Este fato possivelmente indica uma possível importante contribuição dos terminais destas proteínas para suas distintas funções biológicas.

Comparando a estrutura por nós calculada com a recentemente publicada por Nicastro *et al.* (2003) e depositada no PDB (código 1H5O) verificamos que as estruturas obtidas são coincidentes, como pode ser verificado pela superposição destas estruturas



**Figura 4.11 - Superposição dos desenhos *ribbon* de 2 estruturas representativas das estruturas das proteínas Crotamina (verde com pontes dissulfeto laranja) e DLP-2 (azul com pontes dissulfeto margenta). Percebe-se a grande similaridade ente as estruturas destas duas proteínas, principalmente pela disposição das estruturas secundárias e das pontes dissulfeto.**

mostrada na Figura 4.12, embora as condições da amostra sejam diferentes. Nossa estrutura foi calculada para a crotamina dissolvida em água, a pH5,8, enquanto que para a calculada por Nicastro *et al*, a crotamina estava diluída em solução tampão/TFE (trifluoretanol) (70:30, pH4). Assim, a argumentação apresentada por Nicastro *et al* (2003) baseada em seus dados de dicroísmo circular de que a crotamina,



**Figura 4.12 – Superposição do conjunto de 20 conformeros representativos da estrutura da crotamina calculadas (em vermelho) e dos 26 conformeros publicado por Nicastro *et al.*(2003) (em azul). Foram superpostos os resíduos 1-39 da cadeia principal.**

nas condições de sua amostra tem sua estrutura praticamente inalterada, quando comparada com a solução sem TFE confirma-se. Um senão pode ser levantado quando comparamos as duas estruturas obtidas, com relação às estruturas secundárias identificadas. Na estrutura publicada por Nicastro, foi identificada a conformação de fita beta para o segmento de peptídeo Asp24-Phe25, configurando uma topologia  $\alpha\beta_1\beta_2\beta_3$  para a crotamina. Esta estrutura secundária não está claramente identificada na estrutura por nós calculada, configurando uma topologia  $\alpha\beta_1\beta_2$ . Neste caso, a presença de TFE pode estar agindo como estabilizadora desta estrutura secundária.

## Conclusões

Pela aplicação das técnicas de ressonância magnética nuclear homonuclear foi resolvida a estrutura tridimensional da crotamina. A estrutura por nós calculada concorda com a encontrada por MD por Siqueira *et al* (2002) e a recentemente publicada por Nicastro *et al* (2003), reforçando estes resultados.

Através dos dados de RMN foi possível a identificação experimental do padrão de pontes dissulfeto para a crotamina, que conecta os resíduos Cys4-Cys36, Cys11-Cys30 e Cys18-Cys37, seguindo o mesmo padrão que a miotoxina *a*.

Nos espectros coletados há indicação da presença de isoformas na amostra, como verificado em estudos anteriores. Nossos espectros porém, não mostram a presença de isomerização *cis-trans* para a Pro20, como sugerido na literatura para justificar este comportamento.

Pelo enovelamento apresentado, a crotamina pertence à família estrutural das defensinas  $\beta$ , sem possuírem entretanto, similaridade seqüencial e funcional. Particular similaridade estrutural foi encontrada com a proteína DLP-2, extraída do veneno do ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*).

# APÊNDICE A

## Princípios Básicos da Ressonância Magnética Nuclear –

**RMN.** (Wüthrich, 1986; Ven, 1995; Cavanagh, 1996).

A RMN como uma técnica de espectroscopia, por definição diz respeito à interação de radiação eletromagnética com a matéria. Na maneira tradicional de descrevermos esta interação, átomos e moléculas transicionam entre níveis energéticos emitindo ou absorvendo radiação correspondente à diferença entre as energias que possuem nestes níveis. A relação entre esta diferença de energia  $\Delta E$  e a frequência  $\nu$  da radiação emitida ou absorvida é dada pela expressão  $\Delta E = h\nu$ , onde  $h$  é a constante de Planck.

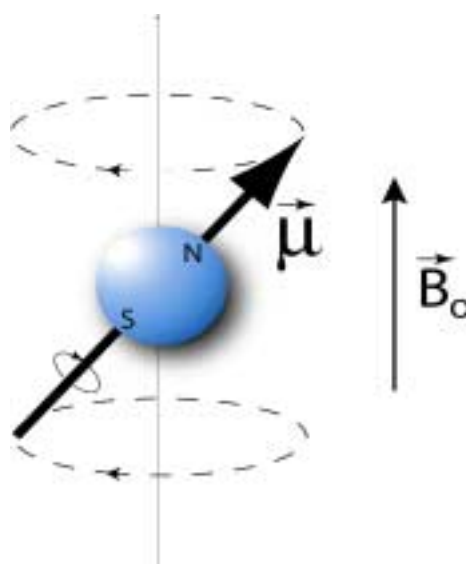
Diferentes técnicas espectroscópicas são classificadas pelo tipo de transição que ocorre envolvendo radiação em diferentes regiões do espectro eletromagnético, como infravermelho ou UV. Uma frequência típica de RMN é 100MHz, na região de rádio frequência.

A RMN difere de outras espectroscopias óticas de diversas maneiras, marcadamente por ser a diferença de energia entre os níveis transicionados não natural, precisando ser induzida pela imersão dos núcleos em um campo magnético. Também,

diferentemente das transições eletrônicas, a interação é mais magnética do que elétrica.

Um experimento de RMN é possível devido ao fato de alguns núcleos, dependendo do arranjo de seus constituintes – prótons e nêutrons, possuírem intrinsecamente momento angular  $I$ , ou spin. De todas as espécies atômicas, hidrogênio, nitrogênio e carbono, são as mais importantes do ponto de vista biofísicoquímico, pela sua constante presença como constituintes das moléculas biológicas. A Tabela A.1 relaciona os núcleos de maior interesse em RMN de biomoléculas. De particular interesse são os núcleos possuidores de spin nuclear  $I=1/2$ . Pertencendo a esta classe de núcleos, o hidrogênio, por suas propriedades, é o mais importante átomo quando falamos de RMN. No transcorrer deste texto, ao falarmos de núcleos atômicos sem especificar seu spin nuclear, estaremos nos referindo a estes núcleos.

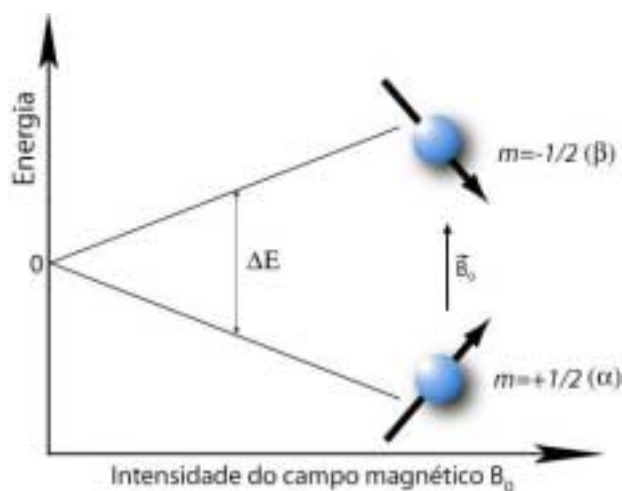
Spin é uma grandeza quântica, sem paralelo no mundo clássico, mas o fenômeno da RMN pode em parte ser entendido através de uma analogia clássica. Esta possibilidade facilita grandemente o entendimento do fenômeno, embora não seja abrangente o suficiente para ser utilizada exclusivamente. Nesta analogia, os



**Figura A.1 - Representação esquemática de um núcleo no campo magnético.**



núcleos possuidores de spin, assim como os elétrons que também possuem spin, quando colocados na presença de um campo magnético, comportam-se como pequenas barras magnéticas (Figura A.1). Quando imersas em um campo magnético externo, estes pequenos magnetos possuem energia dependente de sua orientação (Figura A.2). As orientações possíveis são quantizadas de acordo com os números quânticos magnéticos  $m_I = (-I, -I+1, \dots, I-1, I)$ . Existem diversas maneiras de representar graficamente o fenômeno da RMN, mas seguindo este raciocínio, os espectroscopistas de RMN preferem descrever o fenômeno através do movimento de vetores representando magnetização, ao invés de utilizar transições entre níveis energéticos. Sempre que possível, utilizaremos esta descrição semiclássica durante o transcorrer deste texto.



**Figura A.2 – Diagrama de níveis energéticos para núcleos de spins  $I=1/2$ . O nível mais energético corresponde ao spin alinhado antiparalelo ao campo externo, e o nível menos energético, alinhado paralelo.**

Desta forma, podemos entender o núcleo como uma partícula carregada rodando ao redor de

algum eixo, produzindo desta forma uma corrente elétrica e por isso comportando-se como um pequeno eletromagneto, possuidor de momento de dipolo magnético  $\mu$  dado por:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L}, \quad (\text{A.1})$$

onde  $\gamma$  é o chamado razão giromagnética, e é característico de cada núcleo atômico, podendo ser positivo ou negativo.



**Tabela A.1 - Propriedades magnéticas dos isótopos de maior interesse para RMN de biomoléculas.**

Núcleo	I	Razão giromagnética ( $10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Abundância Natural (%)	Frequência de RMN (MHz) ( $B_0=2,3488 \text{ T}$ )	Sensibilidade relativa*
$^1\text{H}$	1/2	26,7520	99,985	100,0	1
$^2\text{H}$	1	4,1066	0,015	15,351	$1,45 \cdot 10^{-6}$
$^3\text{H}$	1/2	28,5350	-	106,663	1.21
$^{12}\text{C}$	0	-	98,9	-	-
$^{13}\text{C}$	1/2	6,7283	1,108	25,144	$1,76 \cdot 10^{-4}$
$^{14}\text{N}$	1	1,9338	99,63	7,224	$1,0 \cdot 10^{-3}$
$^{15}\text{N}$	1/2	-2,712	0,37	10,133	$3,85 \cdot 10^{-6}$
$^{17}\text{O}$	5/2	-3,6279	0,037	13,561	$1,08 \cdot 10^{-5}$
$^{19}\text{F}$	1/2	25,181	100	94,077	0,834
$^{23}\text{Na}$	3/2	7,08013	100	26,466	$9,26 \cdot 10^{-2}$
$^{31}\text{P}$	1/2	10,841	100	40,481	$6,65 \cdot 10^{-2}$

\* Sensibilidade é a medida de quão fácil é adquirir um sinal de RMN para um específico núcleo Y, comparado com outro, X. Para um mesmo campo e igual número de núcleos a sensibilidade relativa  $R^X$  é o produto da abundância natural (%) pela sensibilidade absoluta à RMN [ $|\gamma|^3 I(I+1)$ ] onde  $\gamma$  é o razão giromagnética e I é o número de spin.

Devido ao seu momento angular, quando colocado na presença de um campo magnético, o momento de dipolo do núcleo não se alinha com o campo, como seria de se esperar se lembrarmos do comportamento de uma agulha de bússola. O núcleo comporta-se então como um peão no campo gravitacional terrestre, precessionando ao redor da direção do campo (Figura A.1), com esta precessão regida pela equação.

$$\frac{d}{dt} \vec{\mu} = -\gamma \vec{B} \otimes \vec{\mu} \quad (\text{A.2})$$

onde  $B$  é a indução magnética\*. A frequência de rotação é chamada frequência de Larmor, dada por

$$\nu_o = \frac{\omega_o}{2\pi} = \frac{\gamma \cdot B_o}{2\pi} \quad (\text{A.3})$$

\* Convém aqui distinguir o Campo Magnético  $H$  gerado por um solenóide por exemplo, da indução magnética  $B$ . No vácuo,  $H$  e  $B_o=B_{\text{vácuo}}$  são paralelos e proporcionais, sendo  $B_o=\mu_o \cdot H$ , com  $\mu_o=4\pi \cdot 10^{-7} \text{Vs/Am}$  chamada permeabilidade magnética do vácuo. A unidade da Indução Magnética (frequentemente chamada de campo magnético, inclusive neste texto) é o Tesla,  $[B] = T = \text{Vs/m}^2$ , enquanto que  $[H] = \text{A/m}$ . Para comparação, a indução magnética da terra (“campo magnético”) é de  $60\mu\text{T}$  nos pólos e  $30\mu\text{T}$  no equador. Magnetos permanentes podem alcançar 2T, magnetos supercondutores acima de 20T e magnetos especiais de alto campo (magnetos Bitter) 50T. Em literatura antiga também utilizava-se a unidade Gauss com  $1\text{G}=100\mu\text{T}$ . Em RMN é comum o uso de unidade Hz para indicar campo magnético. O valor em Hz de um campo magnético refere-se ao valor da frequência de Larmor do isótopo  $^1\text{H}$  no referido campo.

Este é o comportamento do momento de dipolo de cada núcleo individualmente, que quando somados dão origem ao vetor magnetização  $M$ , que também precessiona ao redor do campo regido pela mesma equação

$$\frac{d}{dt}\vec{M} = -\gamma \cdot \vec{B}_o \otimes \vec{M} \quad (\text{A.4})$$

onde  $\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_{amostra} \vec{\mu}$ , que somente pode ser observada quando não está alinhada com  $B_o$ .

Como todos os núcleos de um corpo macroscópico precessionam defasados, no equilíbrio somente observamos uma magnetização macroscópica média  $M_o$  alinhada com o campo externo  $B_o$ , cuja intensidade é dada pela Lei de Curie:

$$M_o = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3kT} B_o \quad (\text{A.5})$$

onde  $N$  é o número de spins,  $\hbar$  é a constante de Planck dividida por  $2\pi$ ,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $I$  é o número quântico de spin,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\gamma$  é o razão giromagnética.

Esta é uma equação oriunda da mecânica quântica onde o sistema é descrito em termos de níveis discretos populados com probabilidade  $P_n$  definidas pela energia  $E_n$  de cada estado  $|n\rangle$  dada pela equação de Boltzmann

$$P_n = \frac{e^{-E_n/kT}}{\sum_i e^{-E_i/kT}}, \quad (\text{A.6})$$

sendo a magnetização longitudinal resultante da diferença entre a população dos níveis energéticos. O nível de mais baixa energia, e portanto mais populado, corresponde ao alinhamento do momento de dipolo paralelo com o campo  $B_o$ . Esta diferença populacional é da ordem de  $10^6$ , extremamente pequena, o que torna o sinal de RMN extremamente fraco.

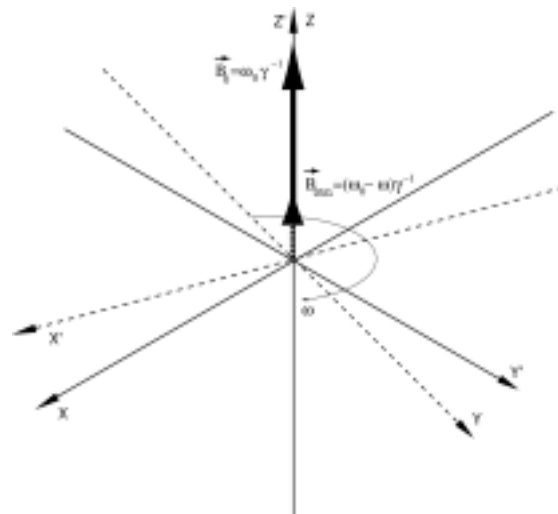
Convencionalmente, nos referimos à direção longitudinal de  $B_o$  como a direção “Z”, e a “X” e “Y” como direções transversais. Para ser detectado, o vetor magnetização deve variar temporalmente. Isto é conseguido desviando-se a magnetização da direção longitudinal, que dessa forma precessiona ao redor de Z, gerando componentes transversais X e Y oscilantes. Estes dipolos oscilantes, quando inseridos em um anel condutor, geram correntes, pelo Princípio da Indução de Faraday, sendo estas correntes o sinal que é detectado em RMN.

Como então desviar a magnetização de sua orientação longitudinal? Isto pode ser conseguido pela aplicação de um segundo campo magnético  $B_1$  não alinhado com  $B_o$ , fazendo com que a magnetização precessiona ao redor do campo resultante. Quando este segundo campo é desligado, a magnetização não se encontra mais alinhada com  $B_o$  e precessionará ao redor do mesmo. Para que este efeito seja conseguido com um campo magnético  $B_1$  estático, este deve ter intensidade comparável à  $B_o$ , o que implica na utilização de caros magnetos supercondutores. Felizmente, este problema pode ser contornado com a aplicação de campos magnéticos ressonantes, ou seja, radiação eletromagnética com a mesma frequência da precessão de M ao redor de  $B_o$ . Como a frequência de rotação da magnetização ao redor de  $B_o$  está na faixa de rádio

(10-100MHz), e  $B_1$  tem duração limitada, comumente nos referimos ao campo magnético  $B_1$  como pulso de RF.

O efeito da aplicação de radiação eletromagnética pode ser mais facilmente entendida se abandonarmos o sistema referencial estático do laboratório (XYZ) e adotarmos um novo sistema referencial (X'Y'Z'), chamado

*sistema girante*, que possui  $Z'$  alinhado com  $Z$ , mas o plano  $X'Y'$  rodando ao redor de  $Z$  com velocidade angular  $\omega$  como visto na Figura A.3.



**Figura A.3 – Sistema de coordenadas do laboratório XYZ e sistema girante X'Y'Z'. No sistema girante, a rotação é sentida pela magnetização como uma redução na intensidade de  $B_0$**

Se existe uma magnetização não alinhada com o campo externo  $B_0$ , um observador no sistema referencial do laboratório (XYZ), sabendo da existência do campo  $B_0$ , conclui que esta magnetização está precessionando ao redor de  $Z$  com velocidade angular  $\omega_0$ . De outra forma, ao observar a magnetização precessionando ao redor de  $Z$  com velocidade angular  $\omega_0$  pode concluir pela existência de um campo magnético  $B_0$  alinhado com  $Z$ , ambas conclusões baseadas na Equação (A.3).

O que aconteceria se este observador fosse agora transferido para o sistema girante descrito anteriormente. Ao olhar para a magnetização, ele a veria precessionando com

velocidade angular  $(\omega_o - \omega)$ . Para este observador, a simples mudança de referencial não implica na perda de validade da Equação (A.3), de maneira que ele conclui que a magnetização está sob ação de um campo magnético de intensidade  $B = (\omega_o - \omega)/\gamma$ . Se o sistema girante está exatamente “em ressonância”, ou seja, possui velocidade angular  $\omega = \omega_o$ , este observador dirá: não existe precessão, portanto não existe campo externo.

Usando este sistema, transformamos um problema dependente do tempo em um problema independente do tempo.

Quando introduzimos no sistema girante o campo  $B_1$ , que gira ao redor de  $B_o$  com velocidade angular  $\omega$ , como mostrado na Figura A.7, a magnetização sentirá um campo efetivo  $B_{eff}$  com intensidade dada por

$$B_{eff} = \sqrt{B_1^2 + (B_o - \frac{\omega}{\gamma})^2} \quad (A.7)$$

e precessionará com velocidade angular

$$\omega_{eff} = \sqrt{\omega_1^2 + (\omega_o - \omega)^2} \quad (A.8)$$

onde  $\omega_1 = \gamma \cdot B_1$ . \* Quando  $\omega$  é igual ou muito próximo de  $\omega_o$ , a diferença  $(\omega_o - \omega)$  torna-se nula ou praticamente nula, sendo neste caso  $B_{eff} = B_1$ , mesmo sendo  $B_1 \ll B_o$ .

---

\* No jargão da RMN, velocidade angular é tratada como frequência. Frequências indicadas por  $\omega$  estão em unidades de rad/s e frequências indicadas por  $\nu$  estão em unidades de Hz, e  $\omega = 2\pi\nu$ . A grandeza  $(\omega_o - \omega)$  é chamada *offset*, que é a diferença entre a frequência de excitação e a frequência de Larmor do spin.  
(Fonte: de <http://kristall1.min.uni-hannover.de/nmr/nmrtable/>)

A geração de radiação magnética circularmente polarizada  $B_1$ , não é trivial. O mesmo efeito é conseguido pela aplicação de radiação eletromagnética linearmente polarizada, por exemplo, da forma:

$$\vec{B}_1(t) = 2B_1 \cos(\omega t) \hat{i}, \quad (\text{A.9})$$

que pode ser decomposta em duas ondas circularmente polarizadas

$$\vec{B}_1(t) = B_1[\cos(\omega t) \hat{i} + \text{sen}(\omega t) \hat{j}] + B_1[\cos(-\omega t) \hat{i} + \text{sen}(-\omega t) \hat{j}]. \quad (\text{A.10})$$

O primeiro termo da equação acima é a onda circularmente polarizada desejada, com  $B_1$  rodando no plano XY ( ou estático no plano X'Y') e o segundo termo é também uma onda circularmente polarizada, mas com frequência  $-\omega$ , fora de ressonância, e portanto de efeito desprezível.

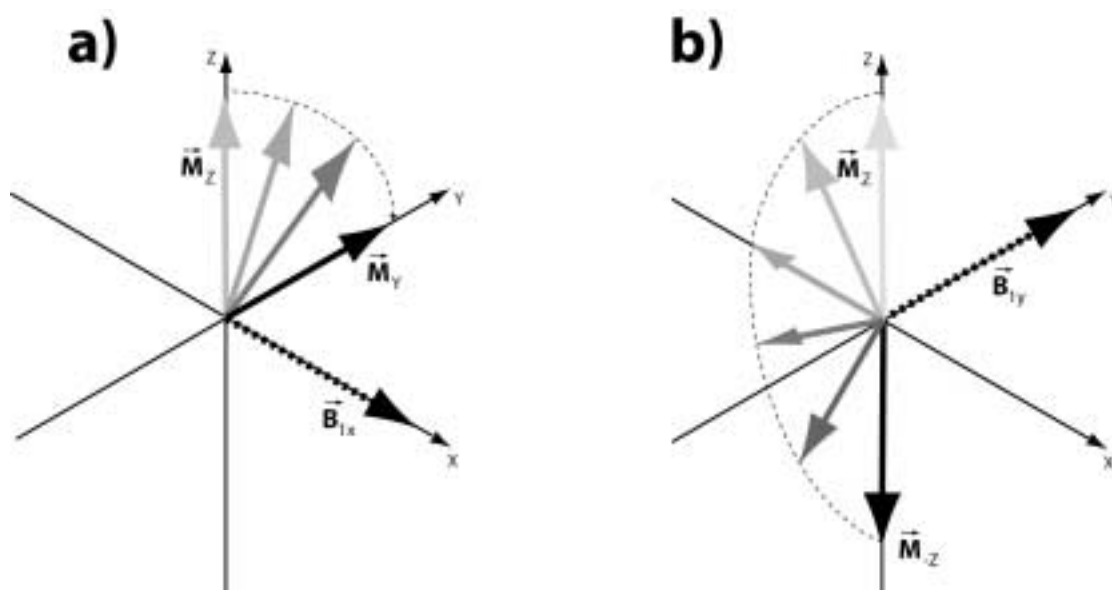
## **Pulso de Rádio Frequência (RF).**

Vamos analisar o caso mais simples, quando não existe *offset*, ou seja, a portadora do pulso de rádio frequência tem frequência igual à frequência de Larmor do spin a ser excitado. Nesta situação  $B_{\text{eff}} = B_1$  e o spin precessionará ao redor de  $B_1$  apenas. Por convenção,  $B_0$  é colocado na direção Z e  $B_1$  é aplicado nas direções transversais X' ou Y' do sistema girante. Quando então aplicamos  $B_1$  na direção X', a magnetização  $M$  iniciará um movimento de rotação ao redor deste eixo, movendo-se no plano Y'Z. Se aplicarmos este campo por um período limitado  $t_p$  (tipicamente da ordem de microssegundos),  $M$  se moverá formando um ângulo  $\alpha$  com o eixo Z. Este ângulo é normalmente chamado de ângulo de *flip* e o pulso que o gerou é nomeado pelo valor

do ângulo  $\alpha$  que produz, indiciado pelo eixo de aplicação. Assim teremos um pulso de  $180^\circ$  ao redor do eixo X indicado por  $180^\circ_x$ . O ângulo de *flip* é dado por

$$\alpha = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau_p \quad (\text{A.11})$$

Na grande maioria dos experimentos de RMN estes pulsos são quase que exclusivamente pulsos de  $90^\circ$  ou  $180^\circ$ . O pulso de  $90^\circ$  coloca a magnetização no plano transversal gerando uma máxima corrente induzida, e o pulso de  $180^\circ$  inverte a magnetização, e estas são, em suma, as razões da popularidade destes pulsos (Figura A.4).



**Figura A.4 - Movimento da magnetização  $M$  durante a aplicação de um pulso de RF, em ressonância, no sistema girante. a) Pulso  $90^\circ_x$ : O campo  $B_{1X}$  é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial  $M_Z$  gire ao redor do eixo X, até a direção Y. b) Pulso  $180^\circ_x$ : O campo  $B_{1Y}$  é aplicado durante o tempo necessário para que a magnetização inicial  $M_Z$  gire ao redor do eixo Y, até a direção  $-Z$ . Durante este trajeto, a magnetização passa pela direção  $-X$ .**

## Relaxação e Equações de Bloch.

Não é de se esperar que depois de desviada de sua posição de equilíbrio e cessando a ação do agente causador deste desequilíbrio, a magnetização  $M$  continue precessionando para sempre. De fato existem mecanismos que relaxam a magnetização para sua orientação energeticamente mais favorável, ou seja, paralelo a  $Z$ . Existem dois processos envolvidos nesta relaxação.

### Relaxação Longitudinal

A energia potencial do sistema é definida pela quantidade de magnetização alinhada com o campo externo, a magnetização longitudinal  $M_z$ , dada pela expressão:

$$E_{pot} = -\vec{m} \cdot \vec{B} = -V \vec{M} \cdot \vec{B} = -VM_z B_0 . \quad (\text{A.12})$$

Uma mudança na orientação de  $M_z$  implica em troca de energia com o ambiente (rede). Este processo retorna a magnetização  $M_z$  para seu valor de equilíbrio  $M_0$  determinado pela distribuição de Boltzmann restaurando a população de equilíbrio dos níveis energéticos (Figura A.5). Por estas razões, a relaxação longitudinal também é chamada de relaxação spin-rede. Assumindo uma transição de primeira ordem, seu desenvolvimento é descrito pela equação:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{1}{T_1}(M_z - M_0) \quad (\text{A.13})$$

onde  $T_1$  a constante de tempo da relaxação longitudinal.



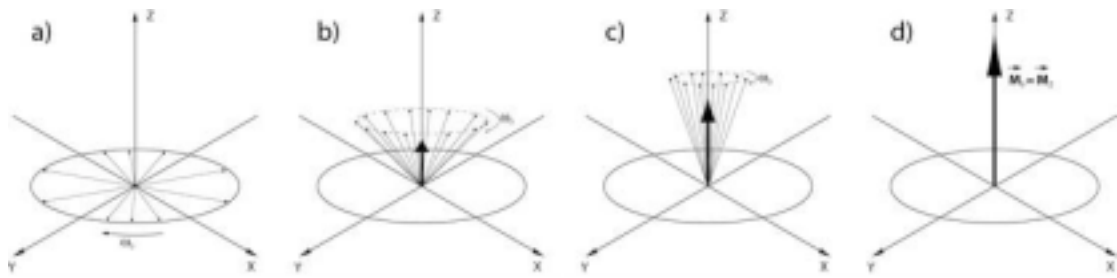


Figura A.5 . Processo de reconstrução da magnetização longitudinal  $M_z$  pela ação da relaxação spin-rede. a) O vetor magnetização total  $M$  é nulo. Todos os momentos magnéticos dos núcleos estão no plano  $XY$ , mas defasados. b) e c) Cada momento magnético alinha-se com o campo, construindo a magnetização  $M_z$ . Devido à defasagem, não existe magnetização transversal  $M_{XY}$ . d) A magnetização alcança seu estado de equilíbrio, onde  $M_0 = M_z$ .

## Relaxação Transversal

Como a magnetização de equilíbrio não possui componente transversal, esta deve se anular no processo de relaxação. Assumindo novamente uma transição de primeira ordem temos, para as componentes transversais:

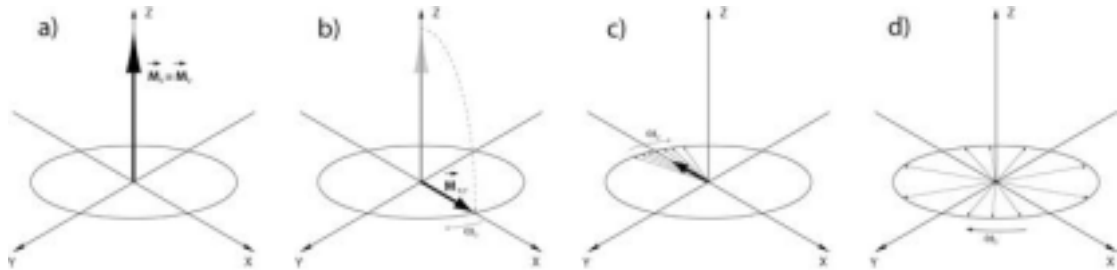
$$\frac{dM_x}{dt} = -\frac{1}{T_2} M_x \quad \text{e}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{1}{T_2} M_y \quad (\text{A.14})$$

onde  $T_2$  é a constante de tempo da relaxação transversal.

A origem deste efeito é o fato de que a magnetização total  $M$  é resultado da contribuição dos momentos magnéticos de dipolos individuais  $\mu_i$ , que devido a interações mútuas, precessionam com frequências levemente distintas, defasando com o tempo, levando a magnetização transversal a se anular (Figura A.6). Por esta razão,

a relaxação transversal também é chamada de relaxação spin-spin. Convém salientar aqui que o mesmo efeito pode ser causado pela inhomogeneidade do campo externo  $B_0$ .



**Figura A.6 - Processo de extinção da magnetização transversal pela ação da relaxação spin-spin. a) A magnetização encontra-se em repouso, alinhada com o campo externo. b) Após a aplicação de um pulso de  $90^\circ$ , a magnetização é colocada no plano transversal. c) A precessão de Larmor realizada por cada um dos momentos magnéticos que compõem a magnetização total é ligeiramente diferente, devido a interações entre os spins. d) com o transcorrer do tempo, os efeitos de defasagem são intensos o suficiente para destruir a magnetização transversal.**

## Equações de Bloch.

Combinando as equações diferenciais para a precessão de  $M$  causada por  $B_0$  com as relações de relaxação apresentadas acima, temos um conjunto de equações diferenciais acopladas chamadas de Equações de Bloch, para um estado que chamamos de precessão livre:

$$\begin{aligned} \frac{dM_x(t)}{dt} &= \gamma M_y B_0 - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} &= -\gamma M_x B_0 - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} &= -\frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (\text{A.15})$$

cuja solução é dada por

$$\begin{aligned}
M_x(t) &= [M_x(0)\cos(\omega_0 t) - M_y(0)\sin(\omega_0 t)]\exp(-t/T_2) \\
M_y(t) &= [M_y(0)\sin(\omega_0 t) - M_x(0)\cos(\omega_0 t)]\exp(-t/T_2) \\
M_z(t) &= M_0 + [M_z(0) - M_0]\exp(-t/T_1)
\end{aligned} \tag{A.16}$$

onde  $M_0$  é a intensidade da magnetização de equilíbrio na direção Z.

Durante a aplicação de um pulso de rádio frequência com intensidade  $B_1(x)$  e frequência  $\omega_1$ , teremos um campo efetivo  $B_{eff} = [B_1, 0, (B_0 - \omega/\gamma)]$ , e poderemos reescrever o conjunto das equações de Bloch, no sistema girante como:

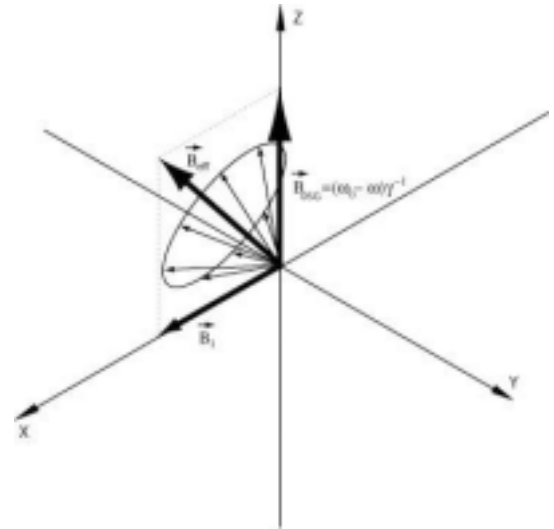
$$\begin{aligned}
\frac{dM_x(t)}{dt} &= (\omega_0 - \omega)M_y - \frac{M_x}{T_2} \\
\frac{dM_y(t)}{dt} &= -(\omega_0 - \omega)M_x - \frac{M_y}{T_2} + \omega_1 M_z \\
\frac{dM_z(t)}{dt} &= -\omega_1 M_y - \frac{M_z - M_0}{T_1}
\end{aligned} \tag{A.17}$$

onde  $\omega_1 = \gamma B_1$  e  $\omega$  é a frequência de rotação do sistema girante. Estas equações descrevem o comportamento da magnetização numa situação de irradiação “fora de ressonância”. Como o campo efetivo é mais intenso do que  $B_1$ :  $B_{eff} = [B_1^2 + (\omega_0 - \omega)^2]^{1/2}$ , o ângulo de *flip* é maior do que numa situação de irradiação “em ressonância”. Obviamente este efeito é menos intenso, quanto mais intenso for  $B_1$ . Para pulsos ideais que tenham a mesma influência sobre todos os prótons com diferentes deslocamentos químicos, é necessário que:

$$|\gamma B_1| \gg (\omega_0 - \omega)_{\max} \tag{A.18}$$

Tipicamente, em experimentos de RMN  $|\gamma B_1|$  é da ordem de 10 a 200kHz, e é de fato maior que a banda de valores típicos encontrados em um experimento com prótons, que é de 9kHz em um magneto de 900MHz.

Uma outra situação que podemos analisar sob o ponto de vista das equações de Bloch é o que chamamos de pulso *spin-lock*. Este pulso consiste de um pulso de 90° em uma direção transversal, Y' por exemplo, que coloca a magnetização na direção X', imediatamente seguido por um pulso longo na direção da magnetização, X' no nosso caso. Se observarmos as equações de Bloch, desprezando efeitos de relaxação, veremos que enquanto a magnetização transversal à



**Figura A.7 – Pulso fora de ressonância. A magnetização precessiona ao redor do vetor campo magnético efetivo  $B_{eff}$ .**

direção de aplicação do pulso oscila ao redor desta direção com frequência  $\omega_{eff} = -\gamma B_{eff}$ , a componente da magnetização longitudinal ao eixo em questão permanece inalterada. Então, esta seqüência de pulso prende a magnetização na direção X'. Na ausência de relaxação, a magnetização se manterá na direção X' do sistema girante indefinidamente. Isto também é verdade para pulsos fora de ressonância, desde que a intensidade do pulso seja intensa o suficiente para sobrepor seus efeitos (condição: Equação (A.18)). Se levarmos em conta a relaxação, a componente presa pelo *spin-lock* será dada por:

$$M_x(\tau) = M_x(0)e^{-\tau/T_{sl}}. \quad (A.19)$$

Da solução das equações de Bloch para o estado estacionário, onde  $\delta M_x / \delta t = \delta M_y / \delta t = 0$ , podemos deduzir que as outras componentes também zeram, uma vez que o campo é intenso o suficiente para preencher a condição necessária  $\omega_1^2 T_1 T_2 \gg 1$ . Então, a

magnetização tende a um valor nulo no equilíbrio  $M_o=(0, 0, 0)$ , efeito que chamamos de saturação. Este efeito é amplamente utilizado na saturação da magnetização devida ao solvente, nos experimentos de RMN em solução.

## **Sistema de Múltiplos Spins.**

O que torna a RMN uma técnica de largo espectro de aplicações e tão útil para estudos estruturais de moléculas é a possibilidade de extrairmos do sistema a ser estudado, não medidas do momento de spin dos átomos, mas distinguir átomos de uma mesma substância em uma molécula ou obter informações que permitem localizá-los espacialmente, pela interação mútua entre estes átomos. Os principais fenômenos físicos que fornecem-nos estas informações são o deslocamento químico e as interações spin-spin.

## **Deslocamento Químico (*Chemical Shift*).**

Embora não tenhamos mencionado anteriormente que a presença da própria amostra provoque distorções no campo magnético externo, isto de fato ocorre. Este fenômeno pode ser facilmente entendido se lembrarmos da presença de elétrons, que orbitam ao redor dos núcleos atômicos, comportando-se como pequenos eletromagnetos. Quando estes elétrons são colocados na presença de um campo magnético externo, o movimento destes elétrons é perturbado de modo a induzir um campo magnético que se opõe ao campo magnético externo de modo que temos:

$$B_0(\text{interno}) = (1 - \chi)B_0(\text{externo}) \quad (\text{A.20})$$

onde  $\chi$  é a susceptibilidade magnética da amostra. A susceptibilidade magnética é uma grandeza macroscópica positiva para materiais diamagnéticos, significando um campo interno ligeiramente menor que o externo neste caso, podendo ser positiva para materiais paramagnéticos. Além deste efeito de blindagem provocada sobre um núcleo atômico pelos seus elétrons, a presença de anéis nas cadeias laterais também perturba fortemente o campo magnético externo, da mesma forma que as distorções na distribuição eletrônica intrínseca dos átomos, ou provocadas por ligações químicas. Assim, por efeito de diferentes posições geométricas ou densidade eletrônica dentro de uma molécula, diferentes núcleos sentem localmente campos magnéticos levemente diferentes, refletindo em diferentes frequências de ressonância para os mesmos. Esta diferença na frequência de ressonância é chamada de deslocamento químico e a frequência de Larmor do spin  $j$ , em um sistema de múltiplos spins é dada por:

$$\omega_{0j} = \gamma B_0 (1 - \sigma_j). \quad (\text{A.21})$$

O deslocamento químico é, portanto, dependente do valor do campo externo  $B_0$ . Frequentemente, os deslocamentos químicos são indicados em ppm (partes por milhão), e medidos em referência a um composto padrão para indicar o zero da escala, de modo que temos:

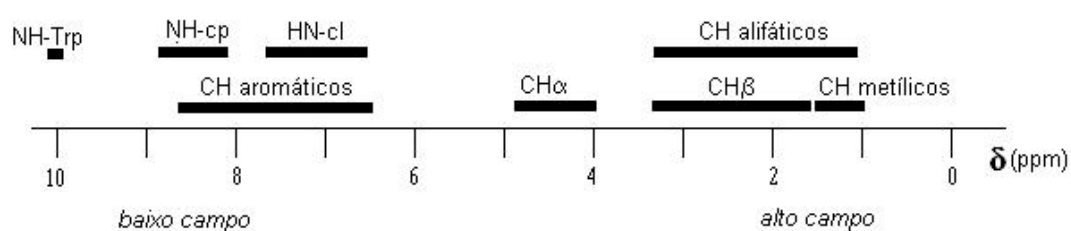
$$\delta = 10^6 \cdot \frac{\nu_{amostra} - \nu_{referência}}{\nu_{referência}} = 10^6 \cdot \frac{\sigma_{amostra} - \sigma_{referência}}{1 - \sigma_{referência}} \approx 10^6 (\sigma_{referência} - \sigma_{amostra}) \quad (\text{A.22})$$

com o deslocamento químico  $\delta$  independente do campo.

Para RMN em solução podem ser utilizados como padrão o TSP (ácido trimetilsilil propiônico), o DSS (4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfonato), entre outros, que apresentam alta blindagem, de modo que a maioria dos outros compostos possui deslocamento químico  $\delta$  positivo em relação a eles.

Em RMN é comum colocarmos a escala crescente, da direita para a esquerda. Por razões históricas a região de baixos valores de  $\delta$  é chamada de “campo alto” e a região de altos valores chamada de “campo baixo”.

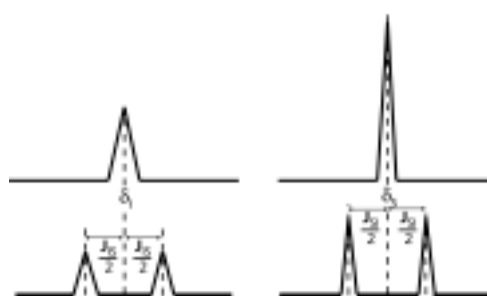
O cálculo teórico dos valores de deslocamento químico é extremamente complicado para macromoléculas como as proteínas e ácidos nucleicos, e valores práticos são extraídos de tabelas de referência, quando necessários. A Figura A.8 mostra como a ressonância de diferentes grupos de núcleos se distribui no espectro.



**Figura A.8 – Grupos de ressonâncias de  $^1\text{H}$  comuns em moléculas biológicas, com deslocamentos químicos similares, para moléculas em configuração aleatória.**

## Acoplamento Escalar

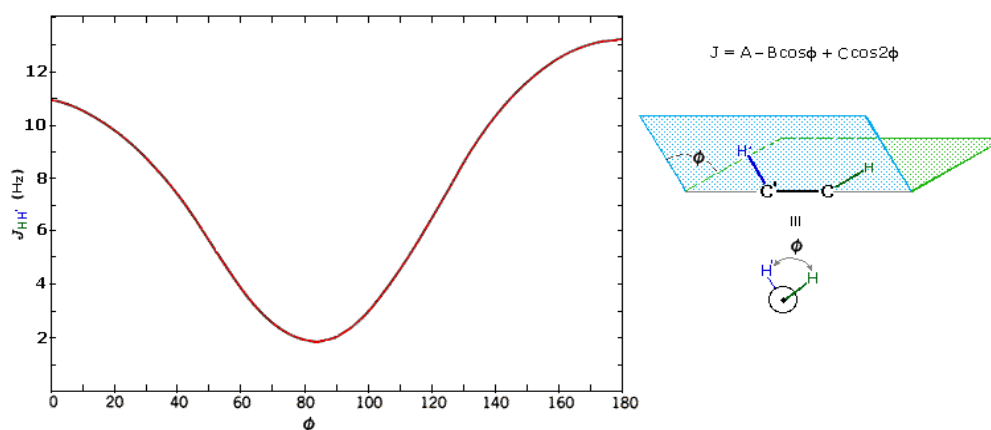
Também conhecido como acoplamento J, é responsável pelo desdobramento da linha de ressonância dos núcleos como esquematizado na Figura A.9. Este efeito é provocado pela interação entre os spins de dois núcleos, e mediada pela ligação química entre eles, razão pela qual este acoplamento também é chamado de spin-spin ou indireto. Em primeira aproximação, quando um núcleo com número quântico de spin S está acoplado a outro com número quântico de spin I, a ressonância do spin I é dividida em  $2S+1$  linhas e a ressonância do spin S em  $2I+1$  linhas. A distância entre as linhas do multipletto formado é dada pela constante de acoplamento J. Para núcleos com spin  $\frac{1}{2}$ , isto significa a divisão em dubletos. Usando um diagrama de níveis energéticos para dois spins semi-inteiros como visto na Figura A.11, podemos visualizar o efeito do acoplamento escalar. Sem a ação do acoplamento escalar, transições que envolvem a mudança de estado de um único spin tem mesma diferença de energia entre os níveis, e contribuem no espectro com uma ressonância única. Quando os spins estão acoplados, os níveis energéticos alteram-se, dando origem ao desdobramento da linha. O alcance deste acoplamento, na prática, é limitado a três ligações químicas.



**Figura A.9 – Diagrama mostrando o efeito do acoplamento J nas linhas de ressonâncias de dois spins I e S. Na primeira linha, representação das ressonâncias dos spins, sem o efeito do acoplamento. Na linha abaixo, o efeito de divisão das linhas de ressonância, por efeito do acoplamento.**



Para uma quantidade maior de ligações, o valor do acoplamento torna-se irrisório, sendo difícil sua medida. O valor da constante de acoplamento  $J$  é independente do campo  $B_0$ , e proporcional ao valor do produto dos fatores giromagnéticos dos núcleos acoplados ( $J \propto \gamma\gamma_s$ ). A divisão das linhas de ressonância causada pelo acoplamento  $J$  é aditiva, de maneira que se um núcleo está acoplado a dois outros núcleos, cada linha de ressonância resultante da divisão provocada pelo acoplamento com o primeiro núcleo será então dividida pelo segundo acoplamento.



**Figura A.10 – Valores da constante de acoplamento escalar  $J_{HH}$  para os hidrogênios geminais, em função do ângulo de torção  $\phi$**

Fonte : <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/nmr/Images/karplus1.gif>

Um importante aspecto prático do acoplamento  $J$  entre núcleos conectados por três ligações químicas ( $^3J$ ) é sua dependência com o ângulo diédrico entre os spins acoplados como mostrado na Figura A.10. Esta dependência é descrita pela equação semi-empírica de Karplus:

$$^3J = A \cos^2 \phi + B \cos \phi + C \quad (\text{A.23})$$

com os valores das constantes  $A$ ,  $B$  e  $C$  dependentes dos spins e da eletronegatividade dos átomos acoplados. Em geral, spins acoplados na posição *gauche* apresentam

pequenos valores de  $^3J$  e na posição *trans* apresentam altos valores. Para um acoplamento  $^3J_{HH}$ , 2-3Hz e 10-15Hz são valores típicos, respectivamente.

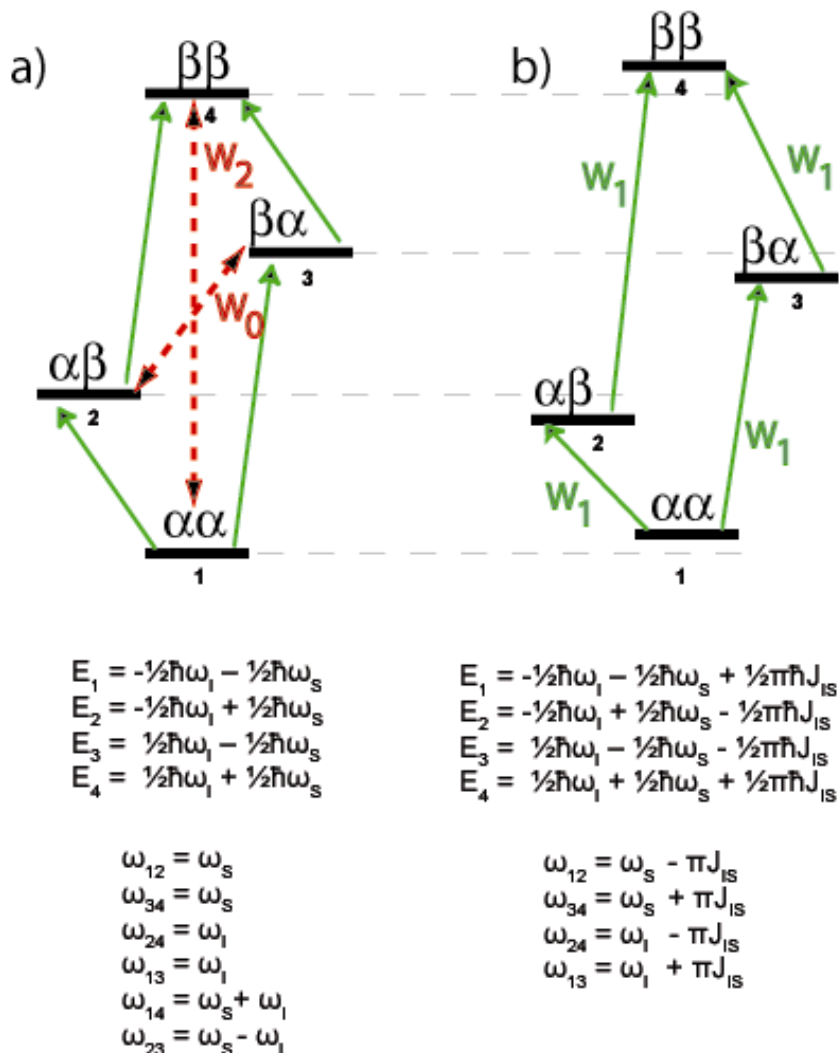


Figura A.11 – Diagrama de níveis energéticos para um sistema de 2 spins semi-inteiros I e S. Em a) temos os níveis energéticos e transições, sem acoplamento escalar e em b) os níveis energéticos sob efeito do acoplamento escalar. Abaixo de cada diagrama estão as energias de cada nível e a frequência de transição entre os níveis.  $W_1$  indicam transições espectroscópicas com a mudança no estado de somente um spin.  $W_0$  e  $W_2$  representam transições de ambos os spins causadoras de NOE.

## Nuclear Overhauser Effect (NOE)

O NOE é de grande importância na espectroscopia por RMN. Este efeito é oriundo da interação dipolo-dipolo entre spins. Diferentemente do acoplamento escalar, ocorre através do espaço, quando a distância entre eles é próximo o suficiente para os dipolos interagirem magneticamente. Devido a este acoplamento, os spins não relaxam independentemente. Enquanto que as componentes transversais relaxam para um valor nulo, o mesmo não acontece com as componentes longitudinais de I e S. O relaxamento destas componentes é acoplado, e regido pela equação de Solomon:

$$\frac{d}{dt}(\langle I_z \rangle - I_0) = -\rho_I(\langle I_z \rangle - I_0) - \sigma(\langle S_z \rangle - S_0) \quad (\text{A.24})$$

onde  $I_0$  e  $S_0$  são os valores de equilíbrio de  $\langle I_z \rangle$  e  $\langle S_z \rangle$ .

Veamos o exemplo de um sistema de 2 spins I e S, espacialmente próximos, mas sem acoplamento escalar. Supondo que o spin S esteja saturado, ao medirmos a ressonância do spin I, verifica-se uma alteração na sua intensidade, devido ao acoplamento dipolo-dipolo de I com S dado por

$$\eta = \frac{(I - I_0)}{I_0} = \frac{\sigma \gamma_S}{\rho_I \gamma_I} \quad (\text{A.25})$$

onde  $I_0$  é a intensidade de equilíbrio de I,  $\sigma$  é a taxa de relaxação cruzada e  $\rho_I = 1/T_I$  do spin I.

Como indicado na Figura A.11, é a transição que envolver a mudança dos 2 spins simultaneamente (relaxamento cruzado) que causa a alteração NOE. Se a transição

$W_2$  ( $\alpha\alpha\leftrightarrow\beta\beta$ ) ocorre após S estar saturado, provoca uma alteração positiva na intensidade de I. Se  $W_0$  ( $\alpha\beta\leftrightarrow\beta\alpha$ ) ocorre, provoca uma alteração negativa em I.  $W_0$  é uma transição cuja frequência é a diferença entre o deslocamento químico dos núcleos (da ordem de kHz) enquanto que a frequência de  $W_2$  corresponde à soma dos deslocamentos químicos (da ordem de  $10^9$  Hz). Estas transições são promovidas por movimento molecular de mesma frequência. Pequenas moléculas rodam em solução aquosa com frequência na ordem de  $10^{11}$ , enquanto que grandes moléculas rodam com frequência na ordem de  $10^7$ . Para pequenas moléculas  $W_2$  é predominante e a alteração NOE será positiva. Para grandes moléculas  $W_0$  torna-se maior que  $W_2$ , gerando uma alteração negativa.

A grandeza  $\sigma$  é extremamente dependente da distância entre os núcleos, tipicamente  $\propto 1/r^6$ , e portanto de grande valor em RMN estrutural. A grandeza  $\eta$  não depende da distância entre os núcleos, sendo sua medida apenas indicativa da proximidade dos núcleos, o suficiente para que experimentem acoplamento dipolar.

### **Troca Química (*Chemical Exchange*)**

Transições conformacionais ou trocas com o ambiente que envolva um certo núcleo podem ser detectadas por um experimento de RMN, provocando alteração no perfil da linha de ressonância do mesmo, ou fazendo com que um simples núcleo tenha um comportamento de um sistema múltiplo. Suponha que um núcleo realiza troca química a uma taxa constante  $k_{AB}$  entre dois estados magneticamente distintos, digamos A e B, com frequências de ressonância que diferem pela quantidade

$\Delta\nu=(\nu_A-\nu_B)$ . Em média, a ressonância do spin em cada estado distinto pode somente ser independentemente observada quando o tempo do experimento é da ordem de  $1/k_{AB}$ . Vamos agora considerar dois casos extremos: os casos de troca lenta, e de troca rápida, observando a ressonância do estado A, em precessão livre, durante a detecção do sinal de RMN. Após o pulso de RF  $90^\circ_x$ , a magnetização encontra-se no eixo Y e durante a precessão livre que se segue, três processos ocorrem. Primeiro, a relaxação transversal tem efeito, com taxa  $1/T_2$ ; segundo, a magnetização diminui de intensidade, pela perda de magnetização para o estado B por efeito da troca química; terceiro, magnetização oriunda de B e transferida para A. Agora, supondo que  $\Delta\nu \gg k_{AB}$ . Como A está em ressonância, no sistema girante  $\nu_A=0$  e  $\nu_B \gg k_{AB}$ . Assim, a cada vez que uma transferência de magnetização tem efeito, cada parte de  $M_b$  transferida será adicionada à  $M_A$  sem coerência, resultando numa distribuição de fase que em média resultará em zero. Como resultado final, na situação de troca lenta, teremos um alargamento da linha de ressonância de A, com uma relaxação transversal aparente

$$\frac{1}{T_{2_{app}}} = \frac{1}{T_{2_A}} + k_{AB} . \quad (A.26)$$

Quanto mais lenta a troca, menor será o alargamento da linha. Logicamente, o mesmo ocorre quando analisamos a linha de ressonância de B.

Agora, podemos analisar a situação oposta, onde  $\Delta\nu \ll k_{AB}$ , a situação de troca rápida. Nesta situação, os spins vão e voltam de um estado para outro mais rápido do que o tempo de uma precessão, de modo que observaremos uma frequência de rotação média  $\nu_{m\u00e9dia} = f_A\nu_A + f_B\nu_B$ , onde  $f_A$  e  $f_B$  são as frações de tempo que o spin permanece

em cada estado A ou B. Se a troca não é suficientemente rápida para termos uma média eficiente, um espalhamento da linha é esperado. Assim, na situação da troca rápida , o alargamento é tanto maior quanto menor for a taxa de transição.

## APÊNDICE B

### Formalismo Operador Produto

A representação rigorosa e formal da dinâmica de um sistema de spins é necessariamente feita pela aplicação da mecânica quântica. O conceito de momento angular é introduzido por similaridade com o conceito clássico e estendido para o momento angular intrínseco dos elétrons e núcleos (spin) pela solução da equação de Schrödinger

$$i\hbar \frac{\partial |\Psi(t)\rangle}{\partial t} = H |\Psi(t)\rangle \quad (\text{B.1})$$

e o valor esperado de um observável qualquer "A", é calculado por

$$\langle A \rangle = \langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle. \quad (\text{B.2})$$

onde H é o operador Hamiltoniano e a função de onda  $\Psi$  é um elemento do chamado espaço de Hilbert.

Tomando como base do espaço de Hilbert os autovetores do operador H, teremos

$$\Psi(t) = \sum_1^N c_i(t) |\Phi_i\rangle \text{ e} \quad (\text{B.3})$$

$$\langle A \rangle = \sum_i \sum_j c_i(t)^* c_j(t) \langle \Phi_i | \hat{A} | \Phi_j \rangle \quad (\text{B.4})$$

Como uma técnica experimental, em RMN o conhecimento dos observáveis é preponderante e o conhecimento da função de onda é dispensável. Portanto, toda a informação necessária encontra-se nos coeficientes  $c_i(t)^*c_j(t)$  da expansão representada na Equação (B.4). Isto sugere a construção de um operador que contém estes produtos como elementos de sua representação matricial:

$$\langle \Phi_k | \hat{\rho}(t) | \Phi_l \rangle = c_k c_l^* . \quad (\text{B.5})$$

Chamamos este operador de *operador densidade* e a matriz de *matriz densidade*.

Como o operador densidade é uma função das funções de estado, uma equação diferencial equivalente à equação de Schrödinger pode ser formulada, e teremos

$$i\hbar \frac{\partial \hat{\rho}}{\partial t} = \hat{H} \hat{\rho} . \quad (\text{B.6})$$

Este operador é agora um elemento do espaço de Liouville e a equação acima é chamada de equação de Liouville-von Neuman, cuja solução é:

$$\hat{\rho}(t) = e^{-\frac{i}{\hbar} \hat{H} t} \hat{\rho}(0) e^{\frac{i}{\hbar} \hat{H} t} \quad (\text{B.7})$$

Esta receita pode então ser aplicada para calcularmos o valor esperado de qualquer quantidade física F, onde

$$\langle F \rangle = Tr(\hat{\rho} \hat{F}) \quad (\text{B.8})$$

Para um sistema com um único spin (ou de maneira equivalente para um spin isolado) o estado do vetor magnetização pode ser especificado pelas suas componentes cartesianas x, y e z e analogamente, seu estado quântico pode ser especificado pela



magnitude dos operadores  $E/2$ ,  $I_x$ ,  $I_y$  e  $I_z$  ou pelo operador densidade formado pela combinação linear destes operadores, chamada base cartesiana. Outra base útil é composta pelos operadores  $I^\alpha$ ,  $I^\beta$ ,  $I^+(up)$  e  $I^-(down)$ .

Para um sistema de dois spins com  $I = S = 1/2$  fracamente acoplados, usualmente utiliza-se como base o produto dos autovetores de spin  $|m_I, m_S\rangle$ :

$$\begin{aligned} |\Phi_1\rangle &= |\alpha, \alpha\rangle \\ |\Phi_2\rangle &= |\alpha, \beta\rangle \\ |\Phi_3\rangle &= |\beta, \alpha\rangle \\ |\Phi_4\rangle &= |\beta, \beta\rangle \end{aligned} \tag{B.9}$$

A base de operadores assim formada pode ser classificada em 4 grupos, facilmente inteligíveis quando relacionamo-los aos operadores  $I^\alpha$ ,  $I^\beta$ ,  $I^+$  e  $I^-$ .

O primeiro grupo contém 4 termos, chamados termos populacionais:

$$|\alpha\alpha\rangle\langle\alpha\alpha| = I^\alpha S^\alpha; \quad |\alpha\beta\rangle\langle\alpha\beta| = I^\alpha S^\beta; \quad |\beta\alpha\rangle\langle\beta\alpha| = I^\beta S^\alpha; \quad |\beta\beta\rangle\langle\beta\beta| = I^\beta S^\beta.$$

Estes são os termos diagonais e como diz o nome, estão relacionados aos níveis de ocupação dos níveis quânticos.

Os seguintes 8 termos, chamados de transição quântica simples:

$$\begin{aligned} |\alpha\alpha\rangle\langle\alpha\beta| &= I^\alpha S^+; \quad |\alpha\beta\rangle\langle\alpha\alpha| = I^\alpha S^-; \quad |\beta\alpha\rangle\langle\beta\beta| = I^\beta S^+; \quad |\beta\beta\rangle\langle\beta\alpha| = I^\beta S^-; \\ |\alpha\alpha\rangle\langle\beta\alpha| &= I^+ S^\alpha; \quad |\beta\alpha\rangle\langle\alpha\alpha| = I^- S^\alpha; \quad |\alpha\beta\rangle\langle\beta\beta| = I^+ S^\beta; \quad |\beta\beta\rangle\langle\alpha\beta| = I^- S^\beta. \end{aligned}$$

Estes termos relacionados a transições de um único spin, descrevem coerências quânticas simples associadas a estas transições. Quando descrevemos o fenômeno de

RMN quanticamente, freqüentemente usamos o termo coerência que é uma generalização do termo magnetização, utilizado quando descrevemos o fenômeno da RMN pela ação de vetores. As transições simples são evidenciadas pela ação individualizada dos operadores *up* e *down*.

Dois termos chamados de transição quântica dupla:

$$|\alpha\alpha\rangle\langle\beta\beta| = I^+S^+; |\beta\beta\rangle\langle\alpha\alpha| = I^-S^-;$$

E por fim, os dois termos de transição quântica zero:

$$|\alpha\beta\rangle\langle\beta\alpha| = I^+S^-; |\beta\alpha\rangle\langle\alpha\beta| = I^-S^+.$$

Estes termos estão relacionados às coerências quânticas duplas e coerências quânticas nulas, respectivamente, nomes que pela ação dos operadores *up* e *down* se tornam igualmente evidentes.

Pela facilidade no tratamento e entendimento de pulsos de RF e evoluções temporais durante seqüência de pulsos, a base de Operadores Cartesianos  $E$ ,  $I_{x,y,z}$  e  $S_{x,y,z}$  é mais freqüentemente usada e os 16 operadores produto necessários para formar uma base cartesiana no espaço de Liouville são os 16 produtos entre  $E$ ,  $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$  e  $E$ ,  $S_x$ ,  $S_y$ ,  $S_z$ . Estas coerências também são classificadas em grupos, como segue:

Identidade	: E
Longitudinal	: $I_z, S_z, 2I_zS_z^*$
Transversal	: $I_x, I_y, S_x, S_y, 2I_xS_z, 2I_yS_z, 2I_zS_x, 2I_zS_y$
<i>Zero-quantum</i>	: $2I_xS_x, 2I_yS_y$
<i>Double-quantum</i>	: $2I_xS_y, 2I_yS_x$

Uma propriedade útil dos operadores produto é que eles comutam ciclicamente, ou seja

$$[\hat{A}, \hat{B}] = i\hat{C} \quad (\text{B.10})$$

Isto implica, numa conveniente expressão para a rotação de um operador sobre o outro

$$\exp(-i\theta C)A(\exp(i\theta C)) = A\cos\theta + B\sin\theta \quad (\text{B.11})$$

que é a equação fundamental do formalismo operador produto.

A força do formalismo operador produto é evidente quando utilizada em conjunto com os operadores cartesianos. Vejamos a evolução destes operadores nos casos de precessão livre e aplicação de pulso de rádio frequência.

---

\* O fator 2 é exigido para efeito de normalização.

## Precessão livre

Durante a precessão livre o sistema evolui sofrendo os efeitos do deslocamento químico do acoplamento escalar. Para o deslocamento químico temos  $H=\Omega_1 I_z$  onde  $\Omega$  é o *offset* do spin I e a rotação durante um tempo t será dada por

$$I_z \xrightarrow{\Omega_1 I_z t} I_z$$

$$I_x \xrightarrow{\Omega_1 I_z t} I_x \cos(\Omega_1 t) + I_y \text{sen}(\Omega_1 t) \quad (\text{B.12})$$

$$I_y \xrightarrow{\Omega_1 I_z t} I_y \cos(\Omega_1 t) - I_x \text{sen}(\Omega_1 t)$$

Neste exemplo podemos verificar que a evolução temporal dos operadores  $I_x$ ,  $I_y$  e  $I_z$  são similares à evolução das magnetizações  $M_x$ ,  $M_y$  e  $M_z$  utilizadas na representação vetorial, o que justifica a utilização adiante do termo magnetização para estes operadores cartesianos.

Para um sistema de dois spins, o Hamiltoniano para a evolução de I sobre ação do acoplamento escalar com constante  $J_{IS}$  é  $H=2\pi J_{IS} I_z S_z$ . Temos então:

$$I_z \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_z$$

$$I_x \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_x \cos(\pi J_{IS} t) + 2I_y S_z \text{sen}(\pi J_{IS} t) \quad (\text{B.13})$$

$$I_y \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} I_y \cos(\pi J_{IS} t) + 2I_x S_z \text{sen}(\pi J_{IS} t)$$

Para as coerências do tipo  $2I_x S_z$  teremos:

$$2I_z S_z \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_z S_z$$

$$2I_y S_z \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_y S_z \cos(\pi J_{IS} t) - I_x \text{sen}(\pi J_{IS} t) \quad (\text{B.14})$$

$$2I_x S_z \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z t} 2I_x S_z \cos(\pi J_{IS} t) - I_y \text{sen}(\pi J_{IS} t)$$

e as evoluções das coerências restantes podem ser obtidas pela troca dos índices.

## Pulsos de RF

A aplicação de um pulso de RF em um eixo produz uma rotação no plano ortogonal a ele e seu Hamiltoniano pode ser escrito como  $H = \alpha I_x$  para um pulso em x durante um tempo que implique em uma rotação de  $\alpha^\circ$ . Temos então:

$$I_z \xrightarrow{\alpha I_x} I_z \cos \alpha \mp I_y \text{sen} \alpha$$

$$I_y \xrightarrow{\alpha I_x} I_y \cos \alpha \pm I_z \text{sen} \alpha \quad (\text{B.15})$$

$$I_x \xrightarrow{\alpha I_x} I_x$$

Quando os operadores comutam, diversas ações simultâneas, como a ação do deslocamento químico e do acoplamento J durante a precessão livre, podem ser aplicadas em cascata, um após o outro, não interferindo no resultado final.

Os exemplos acima representam parte do problema. Quando analisamos a evolução de um sistema múltiplo spins, todas 15 dimensões que envolvem coerências devem ser analisadas. Embora pareça um trabalho descomunal, principalmente se levarmos em

conta que geralmente trabalhamos com seqüências de pulsos e *delays*, o problema pode ser descrito de forma simplificada pela seguinte equação:

$$C_q \xrightarrow{C_p(\theta)} \begin{cases} C_q, & se[C_q, C_p] = 0 \\ C_q \cos \theta + i[C_q, C_p] \sin \theta, & se[C_q, C_p] \neq 0 \end{cases} \quad (B.16)$$

e considerando que coeficiente do co-seno da segunda equação corresponde ao termo único da primeira equação, uma forma mais concisa de representar as equações acima pode ser utilizada:

$$C_q \xrightarrow{C_p(\theta)} \begin{cases} C_q, \\ i[C_q, C_p] \end{cases} \quad (B.17)$$

Esta notação é chamada de *branch diagram*.

# APÊNDICE C

## Experimentos básicos em RMN

Em geral, um experimento de FT-RMN começa com a magnetização alinhada com o campo externo  $B_0$  e consiste em uma seqüência de pulsos de RF e intervalos de tempos, seguido pela detecção da magnetização de um certo nuclídeo ( $^1\text{H}$  por exemplo) no plano transversal.

A magnetização é captada como um sinal magnético induzido em uma bobina, que evolui temporalmente  $S(t)$ , portanto no domínio do tempo, chamado FID (*Free Induction Decay*). Este sinal pode ser transformado em um sinal no domínio das frequências  $S(\nu)$  através da transformação de Fourier (FT)

$$S(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} S(t)e^{-2\pi i\nu t} dt \quad (\text{C.1})$$

onde o sinal de cada spin com diferentes frequências pode ser isolado individualmente. Propriedades matemáticas que se aplicam às funções originais e transformadas numa transformação de Fourier podem auxiliar no tratamento matemático dos dados obtidos, sem perda do conteúdo da informação.

## **1D RMN**

Este experimento consiste na excitação dos núcleos com um pulso de  $90^\circ$  e a captação do sinal de RMN durante a evolução temporal após este pulso. Um esquema de um experimento 1D FT-RMN é mostrado na Figura C.3.

Num espectro 1D, todas as informações estão contidas em 2 dimensões, frequência e intensidade. Dependendo da quantidade de ressonâncias presentes, o deslocamento químico poder ser obtido da posição das ressonâncias, o acoplamento escalar da divisão em multipletos e o número relativo de spins, das intensidades.

As propriedades da magnetização que gera o sinal captado durante a fase de aquisição, obviamente são dependentes da maneira como ela foi excitada. Existe uma grande quantidade de diferentes seqüências de pulsos utilizada com diferentes objetivos, algumas contendo dezenas de pulsos, o que torna extremamente difícil uma análise em bloco de seus efeitos. Felizmente, estas seqüências são compostas por subsequente aplicação de alguns elementos simples, que analisaremos a seguir.

### **Pulso de $90^\circ$**

O principal propósito deste pulso é criar magnetização transversal para ser detectada:



$$I_z \xrightarrow{90I_x} I_y$$

$$I_z \xrightarrow{90I_y} -I_x$$

Outro propósito seria a mistura de coerências, como a seguir:

$$2I_y S_z \xrightarrow{90I_x} -2I_y S_z \xrightarrow{90S_x} -2I_z S_y$$

Vemos que uma coerência transversa em I, e portanto caracterizada por uma frequência de Larmor  $\Omega_I$  foi convertida em uma coerência transversal em S, caracterizada pela frequência de Larmor  $\Omega_S$ . Coerência quântica múltipla também pode ser criada pelo pulso de  $90^\circ$ :

$$2I_y S_z \xrightarrow{90I_y} 2I_y S_z \xrightarrow{90S_y} -2I_y S_x$$

Note a importância da fase do pulso de  $90^\circ$  para determinar qual coerência será obtida ao final da seqüência de pulsos.

### **Pulso $180^\circ$**

O objetivo deste pulso é a inversão da magnetização:

$$I_z \xrightarrow{180I_x} -I_z$$

$$I_x \xrightarrow{180I_y} -I_x$$

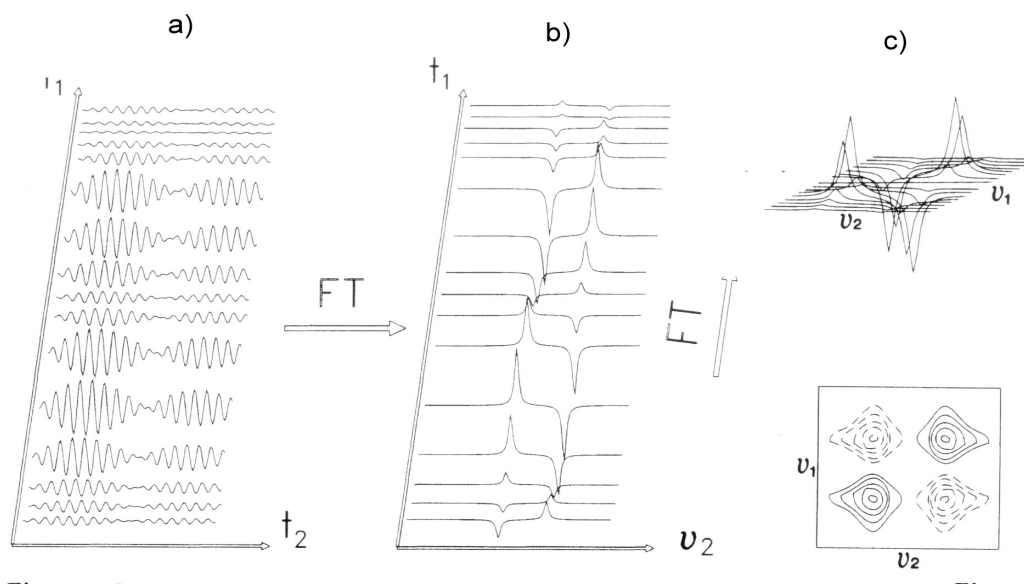
Quando inserido exatamente no meio de um período de precessão, o pulso de 180° age refocando a magnetização, cancelando os efeitos de precessão de Larmor e/ou acoplamento J. A idéia é simples: invertendo a magnetização, a perda de coerência provocada por estes efeitos age de maneira inversa durante o segundo período, reconstruindo a magnetização original. Este procedimento é denominado *Spin Echo*.

## 2D RMN

Em moléculas biológicas, espectros 1D têm seu uso restrito a fornecer informações qualitativas. A grande quantidade de spins presente na amostra resulta em superposição de ressonâncias impossibilitando uma análise quantitativa. Além disso, um espectro 1D, que em condições favoráveis pode indicar a presença de acoplamento entre spins, não é capaz de indicar qual spin está acoplado com qual. Além de permitir maior resolução nas ressonâncias separando a informação contida em um espectro 1D em duas dimensões, o maior propósito de um espectro 2D-RMN é a elucidação de padrões de conectividade entre os spins.

Um espectro 2D, com dois eixos de frequências é obtido pela transformação de Fourier bidimensional de dados no domínio do tempo, com dois eixos temporais ortogonais. Assim, para a construção de um espectro 2D torna-se necessária à

aquisição de um sinal como função de duas variáveis temporais. Em essência, isto é conseguido pela modulação de um espectro normal de RMN-1D como função de uma variável de intervalo de tempo  $t_1$ , como a separação entre 2 pulsos de RF.



**Figura C.1 - Representação esquemática da obtenção de um espectro 2D-RMN por transformada de Fourier bidimensional. a)  $N_2$  FID são adquiridos para diferentes tempos de evolução  $t_1$ . b) A primeira transformada de Fourier é aplicada para cada um dos espectros adquiridos, resultando em uma coleção de  $N_1$  espectros na dimensão de frequências ( $\nu_2$ ). c) A transformada de Fourier é aplicada na segunda dimensão ( $t_1$ ), gerando o espectro bidimensional na dimensão das frequências ( $\nu_1 \times \nu_2$ ). Na parte superior, o espectro é mostrado numa perspectiva tridimensional e na parte inferior, como linhas de contorno (figura adaptada de van de Ven, 1995).**

Assim, enquanto que para compor um espectro 1D, o FID adquirido é composto por  $N$  pontos e uma transformada de Fourier é efetuada, em um experimento 2D,  $N_1$  diferentes espectros 1D são adquiridos, um para cada diferente  $t_1$ , com  $N_2$  pontos cada. Para conseguir o espectro final, é necessário efetuar primeiramente  $N_1$  FTs de  $N_2$  pontos cada, e posteriormente  $N_2$  FTs de  $N_1$  pontos (Figura C.1). Comparado com um espectro 1D, para obtermos um espectro 2D é necessário muito mais tempo, tanto na aquisição dos dados como no processamento dos mesmos.

A seguir, analisaremos os 2 espectros 2D básicos em RMN estrutural, COSY e NOESY.

## **COSY (CORrelated SpectroscopY)**

O conceito básico por trás do experimento COSY é a transferência de coerência de um spin para outro, via acoplamento escalar no limite de acoplamento fraco. Como este acoplamento se dá via ligações químicas, este experimento explicita informação sobre a estrutura química da molécula em estudo. Experimentos 2D são geralmente divididos em 4 etapas: preparação, evolução, mistura e detecção, como descritas a seguir:

**Preparação:** é neste estágio que uma determinada coerência é criada. No experimento COSY consiste em, com a magnetização em equilíbrio ao longo de Z, aplicar um pulso de  $90^\circ$ , para a criação de magnetização transversa.

**Evolução:** durante este período coerências de interesse são monitoradas. Em COSY, as coerências evoluem sob ação da precessão de Larmor e do acoplamento escalar. Este período de evolução é utilizado para a segunda codificação temporal necessária para a obtenção de um espectro 2D.

**Mistura.** Neste estágio coerências são transferidas entre os spins. Em COSY isto é conseguido pela aplicação de um pulso de  $90^\circ$  em ambos os spins.

**Detecção.** Aqui é feita a detecção do sinal. Durante este período novamente os spins estão evoluindo sob ação da precessão de Larmor e do acoplamento escalar.

Para um sistema de dois spins IS teremos, simplificadamente:

$$I_z \xrightarrow{90I_x} \xrightarrow{-\frac{1}{2}Jt_1, \Omega_1 t_1} \xrightarrow{90I_x} \xrightarrow{-\frac{1}{2}Jt_2, \Omega_1 t_2} F_I(t_1, t_2)$$

$$S_z \xrightarrow{90S_x} \xrightarrow{-\frac{1}{2}Jt_1, \Omega_1 t_1} \xrightarrow{90S_x} \xrightarrow{-\frac{1}{2}Jt_2, \Omega_1 t_2} F_S(t_1, t_2)$$

Para um sistema homonuclear, onde o sinal captado é proporcional à magnetização alinhado com o eixo Y do sistema girante

$$F_I + F_S = F(t_1, t_2) \propto I_y(t_1, t_2) + S_y(t_1, t_2)$$

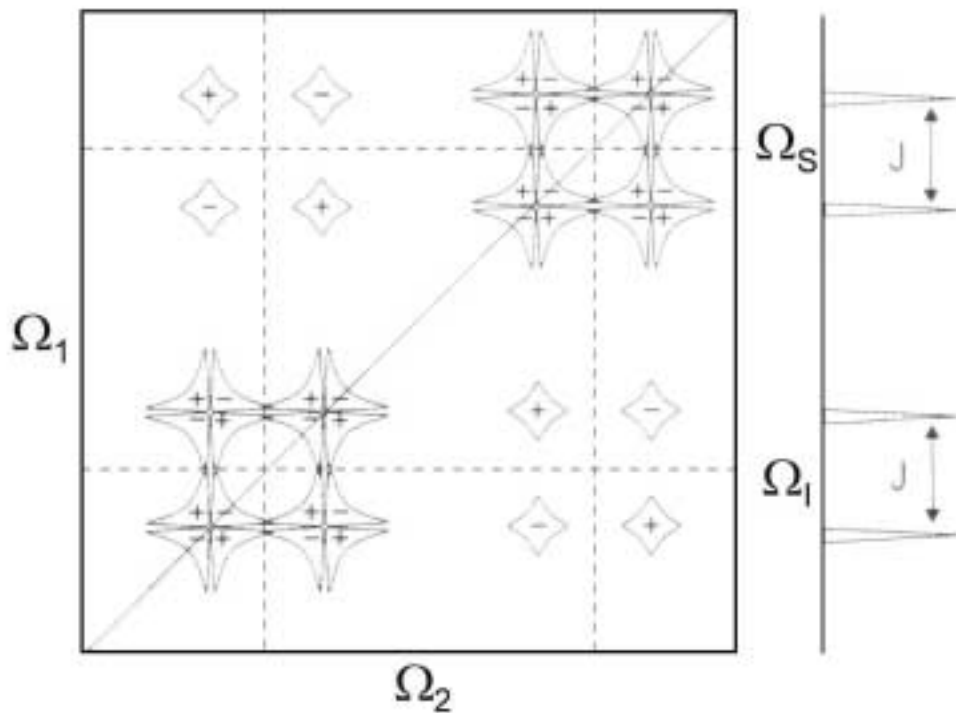
$$F(t_1, t_2) \propto \cos\left(\frac{1}{2}Jt_1\right) \sin(\Omega_I t_1) \cos\left(\frac{1}{2}Jt_2\right) \sin(\Omega_I t_2) +$$

$$+ \cos\left(\frac{1}{2}Jt_1\right) \sin(\Omega_S t_1) \cos\left(\frac{1}{2}Jt_2\right) \sin(\Omega_S t_2) +$$

$$+ \sin\left(\frac{1}{2}Jt_1\right) \sin(\Omega_I t_1) \sin\left(\frac{1}{2}Jt_2\right) \sin(\Omega_S t_2) +$$

$$+ \sin\left(\frac{1}{2}Jt_1\right) \sin(\Omega_S t_1) \sin\left(\frac{1}{2}Jt_2\right) \sin(\Omega_I t_2)$$

Após a transformada de Fourier, este sinal dará origem a um espectro bidimensional com o padrão mostrado na Figura C.1. Os dois primeiros termos darão origem aos picos diagonais  $(\Omega_I, \Omega_I)$  e  $(\Omega_S, \Omega_S)$  e os dois restantes darão origem aos picos de maior interesse, os chamados picos de correlação  $(\Omega_I, \Omega_S)$  e  $(\Omega_S, \Omega_I)$ . Os picos de correlação, que na verdade é um conjunto de picos devido aos multipletos criados pelo acoplamento escalar, são os indicadores da existência deste acoplamento. Os termos dependentes de J são os responsáveis pela modulação em fase (co-seno) ou antifase (seno), como apresentado na mesma Figura C.2.



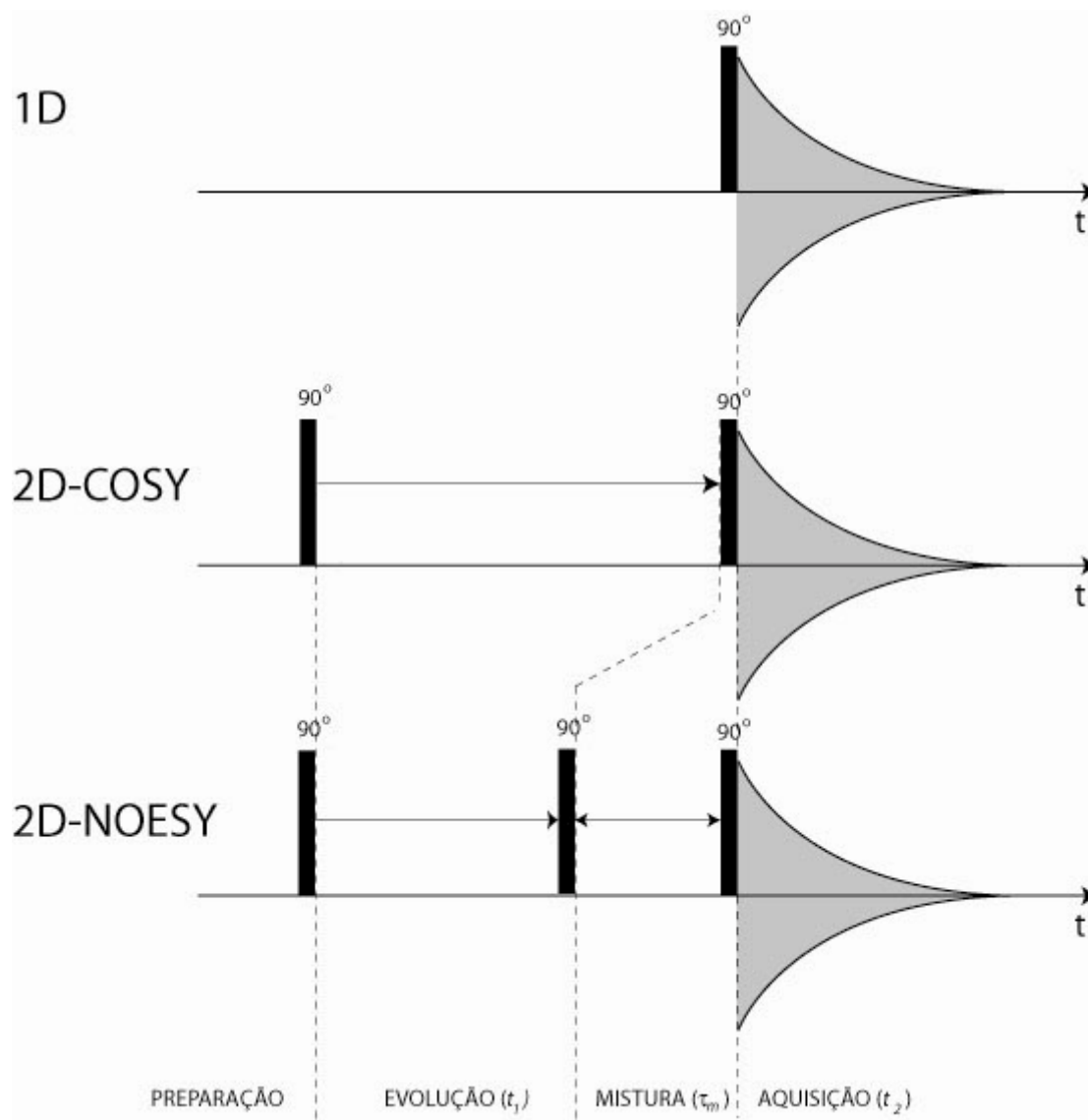
**Figura C.2 – Representação esquemática de um espectro COSY para 2 spins acoplados I e S. À direita está representado o espectro 1D. As linhas pontilhadas indicam a ressonância dos spins desacoplados (figura adaptada de van de Ven, 1995).**

No exemplo acima, somente foi considerado o acoplamento ativo entre os spins I e S. Na verdade, um espectro COSY pode ser severamente complicado pelo acoplamento simultâneo entre mais do que dois spins ou por acoplamentos passivos. Esquemas de filtragem de coerências são implementados através da excitação e detecção em diferentes fases, de modo a eliminar efeitos indesejados, simplificando os espectros. Exemplos destes esquemas são TPPI (*Time-Proportional Phase Incrementation*) e States, que são utilizados na geração de espectros como DQF-COSY (*Double Quantum Filtred COSY*) ou TQF-COSY (*Triple Quantum Filtred*), não discutidos aqui.

Como vimos anteriormente, o acoplamento escalar alcança no máximo 3 ligações, portanto, em um experimento COSY, somente é possível visualizar acoplamentos entre spins até este limite. Alternativamente, existem experimentos que podem, dentro de um sistema de spins, mostrar conexões além deste limite. Um exemplo é o experimento TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) ou HOHAHA (Homonuclear Hartmann-HAhn). Neste experimento, o segundo pulso de  $90^\circ$  do experimento COSY é substituído por um pulso *spin-lock*. Este pulso provoca polarização cruzada, ou uma troca de magnetização entre dois spins, unicamente via acoplamento escalar, não sofrendo efeito da precessão de Larmor, tornando-os equivalentes (condição de Hartmann-Hahn) e permitindo a transferência de magnetização no limite de acoplamento forte. Além de atingir praticamente todo o sistema de spins, o espectro TOCSY apresenta picos de perfil único, reduzindo a complexidade do espectro.

### **NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)**

O experimento NOESY é de fundamental importância na determinação da estrutura espacial da molécula. O propósito do experimento NOESY é estabelecer conectividades entre spins via relaxação cruzada, pela transferência de magnetização longitudinal. As quatro fases que usamos para descrever um experimento 2D são então:



**Figura C.3 – Esquema experimental para de 3 experimentos básicos em RMN homonuclear. Para os experimentos 2D, as linhas pontilhadas indicam os limites das etapas envolvidas.**

Preparação: analogamente ao experimento COSY, com a magnetização em equilíbrio ao longo de Z, aplica-se um pulso de  $90^\circ$ , para a criação de magnetização transversa.

Evolução: neste estágio a magnetização evolui sob ação da precessão de Larmor durante um tempo  $t_1$  e são portanto, marcadas com seus deslocamentos químico  $\Omega_I$  e  $\Omega_S$ . Aqui, supomos que não existe acoplamento escalar entre estes spins. Na



seqüência aplica-se um pulso de  $90^\circ_x$  para gerar a magnetização longitudinal. Como um pulso de  $90^\circ_x$  transfere a magnetização Y para  $-Z$  e não afeta a magnetização X, um subsequente experimento onde se aplica um pulso de  $90^\circ_{-x}$  é realizado. Este pulso transfere a magnetização Y para Z e não altera a magnetização X. A subtração dos dois sinais obtidos, cancela portanto a magnetização em X, mantendo somente a magnetização longitudinal em Z.

Mistura: durante este período, as magnetizações longitudinais  $I_z$  e  $S_z$  evoluem de maneira dependente, regido pela equação de Solomon, como vimos anteriormente, por um período determinado  $\tau_m$ . Ao fim deste período um novo pulso de  $90^\circ$  é aplicado para gerar a magnetização detectável.

Detecção: nesta fase o sinal evolui sob ação da precessão de Larmor e é detectado durante um tempo  $t_2$ .

Ao final desta seqüência temos:

$$F(t_1, t_2) \propto I_0 \left[ (1 - R_{II} \tau_m) \cos(\Omega_I t_1) \cos(\Omega_I t_2) - R_{SI} \tau_m \cos(\Omega_I t_1) \cos(\Omega_S t_2) \right] \\ + S_0 \left[ (1 - R_{SS} \tau_m) \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_S t_2) - R_{IS} \tau_m \cos(\Omega_S t_1) \cos(\Omega_I t_2) \right]$$

Após a FT o primeiro e o terceiro termos geram os picos diagonais ( $\Omega_I, \Omega_I$ ) e ( $\Omega_S, \Omega_S$ ). O segundo e o terceiro termos dão origem aos picos de correlação no espectro NOE. Para  $\tau_m$  não muito longo, a intensidade dos picos é proporcional às taxas de relaxação cruzada  $R_{IS}=R_{SI}$ . A informação estrutural do espectro NOE vem do fato de as taxas de relaxação cruzada  $R_{IS}$  ser proporcional ao inverso da sexta potência da distância internuclear entre I e S ( $R_{IS} \propto 1/r_{IS}^6$ ).

## **APÊNDICE D**

### **RMN - Introdução Histórica**

A idéia de ressonância magnética nuclear foi primeiramente apresentada por Cornelius Jacob Gorter, um físico holandês que apesar de várias tentativas não teve sucesso em observar o fenômeno por ele predito. Posteriormente, em Setembro de 1937, Gorter visitou Isidor Isaac Rabi na Universidade de Columbia, e sugeriu a possibilidade de verificar o fenômeno em um feixe gasoso de moléculas, a especialidade de Rabi. Nos dias posteriores Rabi e seus colegas começaram a realizar experimentos e em Janeiro de 1938 publicou o artigo que descreve a primeira verificação do fenômeno. Gorter foi citado nos agradecimentos do artigo como o autor original da idéias, mas foi Rabi que recebeu prêmio Nobel de Física de 1944 por este experimento.

Nos anos posteriores, com o advento da Segunda Grande Guerra, estudos em RMN foram praticamente abandonados, com os pesquisadores envolvidos direcionando seus esforços no desenvolvimento de fontes de microondas para utilização em radares, exceto por Gorter, que mesmo durante a guerra na Europa, continuou tentando observar RMN em materiais em estado não gasoso, infelizmente falhando novamente.

Em 1945, Felix Bloch, retornando a Stanford, começou a trabalhar com RMN. Juntamente com Willian Hansen, um especialista em eletrônica e Martin Packard, então estudante, começaram a tentar por em pratica uma idéia tida por Bloch um ano antes, para observar RMN em sólidos.

Enquanto isto, no MIT Edward Purcell e seus colegas Henry Torrey e Robert Pound, estavam empregados para relatar em livros os desenvolvimentos em radar conseguidos durante a guerra. Durante uma conversa após o almoço, em Setembro de 1945, tiveram a idéia de como detectar RMN em sólidos. A idéia de realizar algum experimento real entusiasmou os três pesquisadores. Realizando seus experimentos nos períodos de descanso, aos sábados e domingos, após gastar algum tempo para montar o aparato necessário, em Dezembro de 1945 estavam preparados para realizar seu intento: a primeira observação de RMN em sólido (um quilograma de parafina), mas a tentativa mostrou-se infrutífera. Tentaram novamente no próximo sábado, mas nada de novo. Foi quando, numa última tentativa antes de deixarem o laboratório, um deles sugeriu aumentar a corrente do eletromagneto e finalmente tiveram sucesso na primeira observação do fenômeno de RMN em sólidos. Curiosamente, eles estavam aptos a visualizar o fenômeno desde a primeira tentativa, não conseguindo porque o laboratório abandonado onde montaram seu equipamento era extremamente frio.

Pouco tempo depois, em Janeiro de 1946, Bloch, Hansen e Packard observaram sinal de RMN oriundo de água, em um aparato consideravelmente diferente do utilizado por Purcell, Torrey e Pound, mas em um laboratório igualmente frio. Possivelmente Bloch e seus colegas poderiam ter tido a primazia na visualização de RMN em sólidos se Packard não tivesse insistido em visitar seus pais no Oregon em Dezembro. O comitê do Prêmio Nobel reconheceu as descobertas de Bloch e Purcell como simultâneas e independentes, e agraciou ambos com o prêmio de física em 1952.

Foi somente em 1950, com a técnica refinada, que Warren Proctor e Fu Chun Yu, na Universidade de Stanford, observaram que nitrato de amônia ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) mostrava dois distintos sinais para o núcleo de nitrogênio, que a RMN deixou de ser uma técnica de

medida de momento magnético de núcleos para iniciar sua utilização como técnica de expressão em química. Utilizada primeiramente por químicos orgânicos para resolver a estrutura de pequenas moléculas, atualmente é utilizada cada vez mais na elucidação de estruturas mais complexas, incluindo grandes moléculas biológicas.

O avanço mais significativo na técnica de RMN foi à utilização das idéias do matemático francês do século 18 Jean-Baptiste Fourier aplicadas de uma maneira prática como mostrada primeiramente pelo físico inglês Peter Fellgett, em sua tese de doutorado de 1949. Os experimentos de RMN inicialmente utilizavam a técnica de excitação contínua CW (*continuous wave*) que simplificada significa excitar a amostra continuamente com uma radiação eletromagnética que tem sua frequência modificada de maneira contínua, observando quando a amostra responde esta excitação. Durante a maioria do tempo os instrumentos estão “esperando” pelo sinal importante, observando apenas ruído, significando perda de tempo. Como mostrado por Fellgett, uma maneira mais inteligente seria excitar a amostra de uma só vez com todas as frequências simultaneamente e captar de uma só vez todas as respostas. Esta técnica chamada de Transformada de Fourier, aplicada em diversas técnicas analíticas como espectroscopia infravermelha e outras, revolucionou a RMN. Esta técnica, desenvolvida no meio dos anos 60 por Richard Ernst, é conhecida como RMN Pulsada.

Ernst, conhecido como o pai da moderna RMN, também esteve envolvido em uma outra revolução: a RMN bidimensional. Com o avanço da RMN no estudo de moléculas cada vez maiores, uma das dificuldades era a enorme quantidade de informação constante nos espectros coletados, A RMN-2D foi uma das maneiras utilizadas para contornar este problema. Apresentada como uma idéia pela primeira

vez em 1971, na Ampère International Summer School, em Baskopolje, antiga Jugoslávia, um congresso de estudantes, pelo físico belga Jean Jeener, foi primeiramente demonstrada na prática por Ernst em 1974. No congresso onde Jeener apresentou suas idéias estava um estudante de Ernst que tomou notas, e retornando à Zurique, onde trabalhavam na ETH, mostrou-as a Ernst que decidiu desenvolvê-las. Por suas contribuições, Ernst foi agraciado com o Prêmio Nobel de Química de 1991.

Sendo utilizada desde seu início quase que exclusivamente por químicos, a RMN-2D abriu as portas para estudos de biomoléculas mais complexas. Até 1984, a única técnica utilizada para obter informação da estrutura tridimensional de biomoléculas era a difração de raios X, quando Kurt Wüthrich, em seus laboratórios na ETH-Zurique, resolveu a estrutura 3D da proteína BUSI (*bull seminal plasma inhibitor*)- a primeira estrutura tridimensional de uma proteína resolvida por RMN. No início a comunidade científica foi cética em relação ao método, uma vez que a estrutura cristalográfica desta proteína era bem conhecida e poderia ter sido utilizada para obter a estrutura por RMN. O problema foi resolvido quando a estrutura da proteína Tendamistat foi resolvida simultaneamente por RMN e raios X, obtendo-se resultados virtualmente idênticos. Embora BUSI e Tendamistat sejam proteínas relativamente pequenas, com peso molecular por volta de 7 kDa, atualmente, com os avanços subsequentes na capacidade computacional e na intensidade dos campos magnéticos utilizados (de 0,2 Tesla utilizado por Bloch para os atuais 23 Tesla), das técnicas de RMN 3D e 4D e do uso de isótopos, estrutura 3D de proteínas de até 60kDa são agora acessíveis, sendo possível a obtenção de informações locais em estruturas de até 900kDa.

## Bibliografia

Bartels, C., Xia, T.H., Billeter, M., Güntert, P. & Wüthrich, K. (1995). "The program XEASY for computer-supported NMR-spectral analysis of biological macromolecules." J. Biomol. NMR **6**: 1-10.

Beltran, J. R., Mascarenhas, Y. P., Craievich, A. F. & Laure, C. J. (1985). "Saxs study of structure and conformational changes of crotamine." Biophys. J. **47**(1): 33-35.

Beltran, J. R., Mascarenhas, Y. P., Craievich, A. F. & Laure, C. J. (1990). "SAXS study of the snake toxin alpha-crotamine." Eur. Biophys. J. **17**(6): 325-329.

Billeter, M., Braun, W. & Wuthrich, K. (1982). "Sequential resonance assignments in protein <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectra. Computation of sterically allowed proton-proton distances and statistical analysis of proton-proton distances in single crystal protein conformations." J Mol Biol **155**(3): 321-346.

Cavanagh, J. (1996). Protein NMR spectroscopy : principles and practice. San Diego, Academic Press.

Endo, T., Oya, M., Ozawa, H., Kawano, Y., Giglio, J. R. & Miyazawa, T. (1989). "A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crotamine." J. Protein Chem. **8**(6): 807-815.

Fox, J. W., Elzinga, M. & Tu, A. T. (1979). "Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin a isolated from the venom of Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*)." Biochemistry **18**(4): 678-684.

Gonçalves, J. M. & Vieira, L. G. (1950). "Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética." An. Acad. Bras. Cienc. **22**: 141-150.

Gonçalves, J.M. (1956) Purification and properties of crotoamine. In: Venoms, Buckley, E.E., Porges, N. eds. p.261, Washington, D.C., Am. Assoc. Adv. Sci.

Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. and Ernst, R.R. (1996). "Clean-TOCSY for <sup>1</sup>H spin system identification in macromolecules." J. Am. Chem. Soc. **110**: 7870-7872.

Griesinger, C., Sørensen, O.W. & Ernst, R.R. (1987). "Practical aspects of the E.COSY technique - measurement of scalar spin coupling-constants in peptides." J. Magn. Reson. **75**: 474-492.

Güntert, P. (1998). "Structure calculation of biological macromolecules from NMR data." Q Rev Biophys **31**(2): 145-237.

Güntert, P., Billeter, M., Ohlenschläger, O., Brown, L.R., & Wüthrich K. (1998). "Conformational analysis of protein and nucleic acid fragments with the new grid search algorithm FOUND." J. Biomol. NMR **12**: 543-548.

Güntert, P., Braun, W. & Wüthrich, K. (1991). "Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA." J Mol Biol **217**(3): 517-530.

Güntert, P., Dötsch, V., Wider, G. & Wüthrich, K. (1992). "Processing of multi-dimensional NMR data with the new software PROSA." J. Biomol. NMR **2**: 619-629.

Güntert, P., Mumenthaler, C. & Wüthrich, K. (1997). "Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA." J. Mol. Biol. **273**(1): 283-298.

Hampe, O. G., Vozari-Hampe, M. M. & Gonçalves, J. M. (1978). "Crotamine conformation: effect of pH and temperature." Toxicon **16**(5): 453-460.

Henderson, J. T., Nieman, R. A. & Bieber, A. L. (1987). "Assignment of the aromatic <sup>1</sup>H-NMR resonances of myotoxin a isolated from the venom of *Crotalus viridis viridis*." Biochim. Biophys. Acta **914**(2): 152-161.

Holm, L. & Sander, C. (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J Mol Biol **233**(1): 123-138.

Kawano, Y., Laure, C. J. & Giglio, J. R. (1982). "Laser Raman study on crotamine." Biochim. Biophys. Acta(705): 20-25.

Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." J. Mol. Graph. **14**(1): 51-55.

Koradi, R., Billeter, M. & Güntert, P. (2000). "Point-centred domain decomposition for parallel molecular dynamics simulation." Computer Physics Communications **124**: 139-147.

Laure, C. J. (1975). "Die Primärstruktur des Crotamins." Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **356**(2): 213-215.

Laure, C.J. (1990) Veneno da *Crotalus durissus terrificus*: crotamina, crotoxina, crotapotina, fosfolipase: obtenção, estrutura e função. In: Proceedings of the first



Brazilian congress on proteins, pp. 1-8 (Oliveira, B. and Sgarbieri, V., Eds.).  
Campinas: Editora da Unicamp

Luginbühl, P., Güntert, P., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). "The new program OPAL for molecular dynamics simulations and energy refinements of biological macromolecules." J. Biomol. NMR **8**(2): 136-146.

Marion, D., Ikura, K. & Bax, A. (1989). "Improved solvent suppression in one- and two-dimensional NMR spectra by convolution of time-domain data." J. Mag. Reson **84**: 425-430.

Nedelkov, D., O'Keefe, M. P., Chapman, T. L. & Bieber, A. L. (1997). "The role of Pro20 in the isomerization of myotoxin a from *Crotalus viridis viridis*: folding and structural characterization of synthetic myotoxin a and its Pro20Gly homolog." Biochem. Biophys. Res. Commun. **241**(2): 525-529.

Nicastro, G., Franzoni, L., de Chiara, C., Mancin, A. C., Giglio, J. R. & Spisni, A. (2003). "Solution structure of crotamine, a Na<sup>+</sup> channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom." Eur J Biochem **270**(9): 1969-1979.

O'Keefe, M. P., Nedelkov, D., Bieber, A. L. & Nieman, R. A. (1996). "Evidence for isomerization in myotoxin a from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*)." Toxicon **34**(4): 417-434.

Ownby, C. L. (1998). "Structure, functions and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms." J. Toxicol. Toxin. Rev. **17**(2): 213-238.

Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. (1992). "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions." J Biomol NMR **2**(6): 661-665.

Rance, M., Sørensen, O. W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R. R. & Wüthrich, K. (1983). "Improved spectral resolution in cosy 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering." Biochem. Biophys. Res. Commun. **117**(2): 479-485.

Richarz, R. & Wüthrich, K. (1978). "Carbon-13 NMR chemical shifts of the common amino residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH." Biopolymers **17**: 2133-2141.

Siqueira, A. M., Martins, N. F., De Lima, M. E., Diniz, C. R., Cartier, A., Brown, D. & Maigret, B. (2002). "A proposed 3D structure for crotonamine based on homology building, molecular simulations and circular dichroism." J. Mol. Graph. Model. **20**(5): 389-398.

Sklenár, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V. (1993). "Gradient-Tailored Water Suppression for 1H - 15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity." J. Magn. Reson **102**: 241-245.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res. **22**(22): 4673-4680.

Torres, A. M., de Plater, G. M., Doverskog, M., Birinyi-Strachan, L. C., Nicholson, G. M., Gallagher, C. H. & Kuchel, P. W. (2000). "Defensin-like peptide-2 from platypus venom: member of a class of peptides with a distinct structural fold." Biochem. J. **348**: 649-656.

Toyama, M. H., Carneiro, E. M., Marangoni, S., Barbosa, R. L., Corso, G. & Boscherio, A. C. (2000). "Biochemical characterization of two crotonamine isoforms

isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets."

Biochim. Biophys. Acta **1474**(1): 56-60.

Ven, F. J. M. v. d. (1995). Multidimensional NMR in liquids : basic principles and experimental methods. New York, Wiley-VCH.

Wider, G., Macura, S., Kumar, A., Ernst, R.R., Wüthrich, K. (1984). "Homonuclear Two-Dimensional <sup>1</sup>H NMR of Proteins. Experimental Procedures." J. Magn. Reson. **56**: 207-234.

Wüthrich, K. (1986). NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York, Wiley.