

Marisa Barbosa de Aguiar

**Estudo estrutural por RMN do
Peptídeo Policatiônico Polybine I de
Veneno da Vespa Social *Polybia
paulista***

Dissertação para obtenção do Título
de Mestre em Biofísica Molecular,
área de concentração: Biofísica
Molecular. Instituto de Biociências,
Letras e ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho" – Unesp.

Orientador:

Prof. Dr. Valmir Fadel

São José do Rio Preto

2006

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Valmir Fadel, pela ótima orientação e pela paciência de me ensinar, tornando possível a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Walter Filgueira de Azevedo Júnior, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa.

Aos professores Dra. Claudia Elisabeth Munte e Dr. João Ruggiero Neto por participarem da minha banca de defesa e pelas críticas e sugestões feitas ao meu trabalho de mestrado.

Aos demais professores do departamento de Física, pelos ensinamentos e pela atenção.

A Márcia Perez, pela amizade e ajuda e, sobretudo por fazer o papel de uma co-orientadora.

À amiga Fermanda Canduri pela ajuda em momentos de dificuldade, pela paciência e pelas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Sistemas Biomoleculares, pela ajuda em muitos momentos e pela amizade.

Aos demais colegas do departamento de física, pela boa convivência.

Ao Pepeu, a sua esposa Márcia e ao seu filhinho pepeuzinho (Bruno), pela acolhida e por substituir a falta da minha família e pela amizade.

Às amigas Denise, Janaína, Livia e Lara pelo companheirismo e pelas as conversas tanto seriam como divertidas.

Às amigas Érika, Laura, Nádia, Miriam pela boa vizinhança e pelas noites de orgias alimentares.

Ao meu amigo Diego e companheiro, por ter enfrentado as dificuldades junto comigo e pela paciência.

Aos amigos de Brasília, Bia, Jucelino, Andréia e Lorena, pela ajuda e pela vivência harmoniosa.

Aos meus irmãos Marcone e Marcelo pela amizade, pelos conselhos e pela ajuda em todos os momentos.

A minha mãe, pelo apoio incondicional e pela mulher maravilhosa que é.

Ao meu gordinho pelo seu amor, pelo fomento e pela dedicação à família.

À CAPES pelo suporte financeiro.

E a Deus.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS	1
ÍNDICE GERAL	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE TERMOS E ABREVIACÕES	10
1. RESUMO	12
2. ABSTRACT	13
3. INTRODUÇÃO	14
3.1 ASPECTOS DA VESPA SOCIAL <i>POLYBIA PAULISTA</i>	15
3.2 COMPONENTE DE BAIXO PESO MOLECULAR DO VENENO DA VESPA SOCIAL <i>POLYBIA PAULISTA</i>	16
3.3 – INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM MEMBRANA LIPÍDICA	19
3.4 – ESPECTROSCOPIA DE RMN	21
3.4.1- DESLOCAMENTO QUÍMICO	25
3.4.2 - ACOPLAMENTO ESCALAR	29
3.4.3 – NOE	30
3.5 – EXPERIMENTOS DE RMN EM LÍQUIDOS	33
3.5.1 - PULSO DE 90°	34
3.5.2 - PULSO DE 180°	34
3.5.3 - AQUISIÇÃO DE UM ESPECTRO	35
3.5.4 – PRÉ-SATURAÇÃO DA ÁGUA	36
3.5.5 – PROCESSAMENTO DOS DADOS	36
3.5.5.1 - Correção de Fase	37
3.5.5.2 - Filtragem do Solvente	37
3.5.5.3 - Correção de linha	37
3.5.6- 1D RMN	38
3.5.7 - 2D RMN	39
3.6 - PROCEDIMENTO PARA A DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS PEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO.	41
3.6.1- IDENTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS DE SPINS	41
3.6.2 - ASSINALAMENTO DOS NOES	42
3.6.3 - ASSINALAMENTO SEQUENCIAL	42
3.6.4 - CÁLCULO ESTRUTURAL	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45

4.1 – SÍNTESE E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE POLYBINE I E II	45
4.2 – PRÉ-ANÁLISE DA AMOSTRA ATRAVÉS DO DICROÍSMO CIRCULAR	46
4.3 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA RMN	48
4.4 – COLETA DOS ESPECTROS POR RMN	48
4.5 – PROCESSAMENTO DOS DADOS E IDENTIFICAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS	49
4.6 – CÁLCULO ESTRUTURAL	50
 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO	 51
 6-CONCLUSÃO	 72
 7-BIBLIOGRAFIA	 74
 APÊNDICE A	 80
 PADRÕES DE ESPETROS TOCSY PARA OS 20 AMINOÁCIDOS	 80
 APÊNDICE B	 83
 TRANSFORMADA DE FOURIER	 83
 APÊNDICE C	 85
 NMRVIEW PARA ESPECTROSCOPIA HOMONUCLEAR	 85
COMO VISUALIZAR OS ESPECTROS NO PROGRAMA NMRVIEW	85
ABRINDO O NMRVIEW:	88
INSERINDO O ESPECTRO NO NMRVIEW	88
ARRUMANDO O ESPECTRO PARA ANÁLISE	90
CORREÇÃO DE FASE ATRAVÉS DO NMRVIEW	91
TRABALHANDO COM O ESPECTRO	93
Escolhendo uma região do espectro	93
Os botões do teclado que utilizamos p movimentar o espectro	93
ASSINALAMENTO DOS ÁTOMOS	94
 ANEXO	 99
 (SCRIPTS DO NMRVIEW)	 99

Índice de Figuras

Figura 1. Foto da vespa <i>Polybia paulista</i>	15
Figura 2. Proteína G, heterotrimérica	19
Figura 3. Possíveis mecanismos de ação da <i>Polybia paulista</i>	21
Figura 4. Modelo clássico do próton exposto a um campo magnético externo	22
Figura 5. Mostra o deslocamento do nível energético	23
Figura 6. Descrição do sinal do espectro	26
Figura 7. Espectro padrão 1D	27
Figura 8. Espectro padrão 2D	27
Figura 9. Estrutura geral de um α -aminoácido	28
Figura 10. Desdobramento de sinal por acoplamento escalar	30
Figura 11. Transições entre os estados	31
Figura 12. Desenho do equipamento de RMN	33
Figura 13. Pulso de 90°	34
Figura 14. Pulso de 180°	34
Figura 15. Sinal em modo absorvente e dispersivo	37
Figura 16. Seqüência de pulso do espectro 1D	38
Figura 17. Aparência do espectro homonuclear 2D	39
Figura 18. Experiência de RMN	39
Figura 19. Representa os diferentes tipos de espectros 2D	40
Figura 20. Fotografia do supercondutor OXFORD 600	48
Figura 21. Gráfico com a medida do Ponto Isoelétrico	52
Figura 22. Espectro de CD da Polybina I	53
Figura 23. Espectro de CD da Polybina I com variação de pHs	53

Figura 24. Espectro de CD da Polybine I com variação de TFE	55
Figura 25. Espectro 1D da Polybine I	57
Figura 26. Espectro 2D [^1H - ^1H]-COSY	59
Figura 27. Espectro 2D [^1H - ^1H]-TOCSY	59
Figura 28. Espectro 2D [^1H - ^1H]-NOESY	60
Figura 29. Representação de distâncias NOE	61
Figura 30. Gráfico com análise do deslocamento químico	62
Figura 31. Modelo estrutural da polybine I na forma não acetilada	66
Figura 32. Modelo estrutural da polybine I na forma acetilada	67
Figura 33. Modelo estrutural da dinâmica molecular (não acetilada)	70
Figura 34. Gráfico da dinâmica molecular (não acetilada)	70
Figura 35. Modelo estrutural da dinâmica molecular (acetilada)	71
Figura 36. Gráfico da dinâmica molecular (acetilada)	71
Figura 1B. Linhas de comando do script var_com.com	86
Figura 2B. Linhas de comando do script x.y.com	87
Figura 3B. Interface gráfica dos menus principais do NMRView	88
Figura 4B. Passos da abertura de um espectro	89
Figura 5B. Cursores e menu secundário	89
Figura 6B. Espectro 2D com menu secundário ativo	90
Figura 7B. Mostrando como se define as características do espectro	90
Figura 8B. Espectro 2D sem correção de fase	90
Figura 9B. Espectro 2D com a posição dos cursores para a correção de fase	91
Figura 10B. Janela que realiza a correção de fase: gráfico com correção	92
Figura 11B. Janela que realiza a correção de fase: gráfico com correção	92
Figura 12B. Espectro 2D com a fase acertada	93
Figura 13B. Mostra esquema para ampliar uma região do espectro	93

Figura 14B. Esquema para a detecção automática dos picos	94
Figura 15B. Janela com as listas de picos	95
Figura 16B. Formato do arquivo nome.seq.	95
Figura 17B. Mostra como se carrega a sequência.	96
Figura 18B. Mostra os passos para fazer o assinalamento dos resíduos	97
Figura 19B. Mostra os passos para obter as distâncias.	98

Índice de tabelas

Tabela 1 – Sequências primárias de alguns peptídeos	18
Tabela 2 – Valores de sensibilidade relativa dos átomos	23
Tabela 3 – Dados experimentais de Dicroísmo Circular	54
Tabela 4 – Lista dos deslocamentos químicos	63
Tabela 5 – Caracterização do conjunto das 10 estruturas da Polybina I acetilada e não-acetilada	65

Lista de Termos e Abreviações

1D	Espectro em uma dimensão
2D	Espectro em duas dimensões
Ac	Grupo acetil
FID (<i>Free Induction Decay</i>)	Sinal medido nos instrumentos de RMN, ocasionado das oscilações do componente na amostra após os pulsos de excitação.
CD	Dicroísmo Circular (Circular Dichroism)
COSY (<i>Correlated Spectroscopy</i>)	Espectro em 2D que mostra o acoplamento escalar(J) entre os spins através de até três ligações químicas.
Deslocamento Químico (<i>Chemical Shift</i>)	Diferenças de frequências de ressonância dos spins numa molécula.
DQF (<i>Double Quantum Filtered</i>)	E simplesmente uma versão da família de experimentos baseados em filtração direta no estado quântico $-p$.
DSS	4,4-dimetil-4-silapenato-1-sulfonato
Fator giromagnético (γ)	A razão entre a frequência de ressonância de um núcleo e a intensidade do campo magnético aplicado.
f_H	Fração de α -hélice
Frequência de Larmor	Frequência de ressonância de um spin inserido num campo magnético.
GDP	Guanosina-5'difosfato
GTP	Guanosina-5'trifosfato
Homogeneidade	Uniformidade de um campo magnético num certo volume.
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LPC	Lisofosfatidilcolina
NOE (<i>Nuclear Overhauser effect</i>)	Alteração da intensidade da magnetização longitudinal pelo acoplamento dipolar entre spins.
NOESY (<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)	Espectro de RMN bidimensional que examina acoplamento dipolar entre spins através do espaço.
PDB (<i>Protein Data Bank File</i>)	Formato do arquivo que são armazenados os dados de estrutura de peptídeos e proteínas.
RF	Onda eletromagnética com frequência na faixa de rádio (30kHz ~300MHz).
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROESY (<i>Rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i>)	Experimento que monitora a relaxação cruzada entre spins que estão em <i>spin-locked</i> pela aplicação de pulsos de rf.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Spin	Propriedade quântica fundamental da matéria.
T₁ (Relaxação spin –rede ou longitudinal)	Núcleos que ressoam com seus núcleos vizinhos e dissipam energia em sincronismo.
T₂ (Relaxação spin –spin ou Transversal)	Núcleos que podem mudar sua energia trocando energia entre eles sem mudar a energia total da amostra.
TFE	2,2,2 – Trifluoretanol
TFP	Tampão Fosfato de Potássio
TOCSY (Total Correlated Spectroscopy)	Experimento de RMN bidimensional que expia acoplamento escalar (J) entre spins através de múltiplas ligações químicas.
Wet (<i>water suppression enhanced through T1 effects</i>)	Técnica para suprimir o sinal da água através do aumento da relaxação T1.

1. Resumo

Os venenos de vespas sociais são ricos em peptídeos biologicamente ativos que causam alguns males ao ser humano como: dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas. Possuem em sua composição vários tipos de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas. Dentre eles, o que chama mais atenção na atividade farmacológica do veneno são os peptídeos policatiônicos. São diversas as atividades desses peptídeos como: neurotoxicidade, hemólise, liberação de histamina de mastócitos e antibactericida.

Neste trabalho, foram estudados peptídeos catiônicos da família Polybine, sintetizados pelo Departamento de Biologia, Unesp, Rio Claro-SP. Os peptídeos Polybine I e II foram sintetizados na forma acetilada e não-acetilada para o estudo detalhado da sua estrutura. Com este objetivo, utilizamos as técnicas de Dicroísmo Circular (CD), para uma análise da estrutura secundária da amostra e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o estudo da estrutura tridimensional do peptídeo em solução.

2. Abstract

Social wasp venoms are rich of biologically active peptides that may cause some malady to human such as prolonged pains, edema, erythema, allergies and systemic reactions. They have, in its composition, many kinds of biogenic amines, series of polycationics peptides and proteins. Among them, the most interesting thing in pharmacological activity are the polycationics peptides. These peptides show several activities like neurotoxicity, hemolytic activity, histamine releasing activity and antimicrobial activity.

In this project, cationic peptides of the Polybine family synthesized by the Department of Biology, CEIS/IBRC, UNESP, Rio Claro, SP were studied. The cationic peptides Polybine I and II were synthesized in acetylad and non-acetylad forms to the detailed study of the structure. This way, CD spectroscopy were performed to analyze secondary structure of the sample and, to analyze tree-dimension structure, NMR spectroscopy were used.

3. Introdução

Os insetos são os animais mais numerosos e amplamente distribuídos do planeta, abrangendo mais de 675 mil espécies conhecidas. Entre os insetos se encontram, além de outras ordens, a ordem Himenóptera onde estão incluídas as abelhas, as vespas e formigas. Os Himenópteros, devido ao desmatamento das florestas, habitat natural desses insetos, se deslocam para as cidades, fazendo seus ninhos em habitações humanas como refúgio (PEREIRA, 2003). Desta maneira é crescente o número de acidentes com este tipo de inseto. Em um levantamento de acidentes com himenópteros registrado no Hospital das Clínicas em São Paulo, observaram que as vespas foram responsáveis por aproximadamente 32,6% dos acidentes, seguidas das abelhas com 28,2% e as formigas 26,8%. O veneno inoculado pela ferroada desses insetos causam dores prolongadas, edemas, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (SOUZA, 2002). Este é um dos motivos pela qual a indústria farmacêutica investiga o seu veneno. O outro motivo é a produção de novas drogas para o combate de alguns tipos de doenças (p. ex. infecciosas e câncer), já que alguns dos componentes do veneno estão envolvidos em mecanismos que interferem em processos de sinalização celular.

Portanto, este trabalho tem como principal objetivo estudar a nova família de peptídeos policatiônicos Polybines, através do uso da técnica de espectroscopia de RMN, e compreender o mecanismo de ação e a função de algumas ações biológicas desses peptídeos, presente no veneno da vespa social *Polybia paulista*.

3.1 Aspectos da Vespa Social *Polybia paulista*

A filogenia das vespas pode ser interpretada pela divisão de três grandes superfamílias que vão se subdividindo em outras. Essas superfamílias estão divididas em: Bethyloidea, Sphecoidea e Vespoidea. A superfamília Vespoidea é dividida em três famílias: Masaridae, Eumenidae e Vespidae. A super família Vespidae é composta em três subfamílias: Stenogastrinae, Vespinae e Polistinae. A subfamília Polistinae é dividida em três grupos: Ropalidini, Polybiini e Polistini, sendo esta encontrada apenas no Brasil. A Polybiini é composta por 23 gêneros e 405 espécies sendo que apenas três gêneros pertencem aos continentes africano e asiático, o restante é distribuído na América do sul. O gênero *Polubia* pertence ao grupo Polybiini e se localiza no Brasil com uma concentração maior na região sudeste (PEREIRA, 2005).

A vespa *Polybia paulista* faz parte do gênero *Polubia*. O gênero *Polubia* representa vespas altamente sociais ou enxameantes, nome dado em razão da emissão periódica de enxames quando há superpopulação de indivíduos no ninho. Esse tipo de vespa tem como característica ter um ou mais favos, envolvidos por uma cobertura denominada envelope protetor, sendo essa característica que diferencia as espécies do gênero *Polubia* das outras.

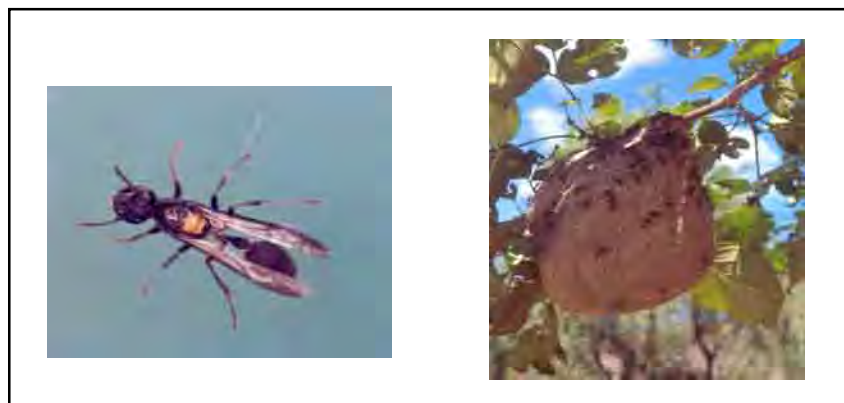


Figura 1: Foto da vespa *Polybia paulista* à direita e a esquerda o seu ninho.

3.2 Componente de baixo peso molecular do veneno da vespa social *Polybia paulista*

A espécie *Polybia paulista* (Figura 1) contém em seu veneno diversos tipos de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas. Os componentes peptídicos desses venenos são classificados em três grupos principais: (1) Cininas, análogas à bradicinina, responsáveis por dores, contração da musculatura lisa e redução da pressão sanguínea; (2) Mastoparanos, tetradecapeptídeos hidrofóbicos, que são degranuladores de mastócitos; e (3) Peptídeos quimiotáticos, tridecapeptídeos hidrofóbicos, com atividade quimiotática. O grupo do mastoparano, por exemplo, pode apresentar também atividades antimicrobiana, tendo como característica principal a estrutura anfifílica em α -hélice (SOUZA, 2002).

Os peptídeos policatiônicos Polybina I e II possuem duas funções biológicas conhecidas:

1. Degranulação de mastócitos: promove a liberação de mediadores pré-formados e geração de novos metabólitos derivados de lipídeos. Um exemplo de mediadores pré-formados é a histamina (determinando prurido, vasodilatação, permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, secreção mucosa, quimiotaxise de leucócitos, produção de prostaglandinas, secreção ácida gástrica e imunorregulação) e um exemplo de metabólitos derivado de lipídeos: prostaglandina D2 (PGD2) (propriedades de vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, vasopermeabilidade, contração de músculos lisos) (www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000427492003000500010).

-
2. Atividade quimiotática: movimento celular sendo direcionado para perto ou para longe de uma fonte de alguma substância química no seu ambiente. Um exemplo bem-estudado consiste no movimento quimiotático de certas células sanguíneas brancas (neutrófilos) na direção de uma fonte de infecção bacteriana (VOET, 2000).

Os Polybines não apresentam similaridade seqüencial com nenhum outro peptídeo conhecido (Tabela1), dessa forma, constituem uma nova família de peptídeos inflamatórios de veneno de vespa, possuindo *in vivo* na sua seqüência primária o N-terminal acetilado. Entre os peptídeos inflamatórios é muito rara a ocorrência natural de modificações químicas *in vivo* do grupo α -amino do N-terminal, apesar da maioria destas toxinas apresentarem o C-terminal amidado. Portanto, os polybines apresentam, dentre esses, a primeira descrição de peptídeos policatiônicos com o N-terminal bloqueado. Dessa maneira, foram sintetizados os peptídeos polybine I e II na forma acetilada e não acetilada, visando uma análise diferenciada da sua forma estrutural, correlacionando às atividades biológicas.

Estes peptídeos policatiônicos, geralmente, possuem atividades associadas a conformações em α -hélice tal como hemólises e antibioses. Já os Polybines têm predição de pouca ou nenhuma extensão de conformação de α -hélice, fazendo com que, aparentemente, essa seja a razão para explicar a ausência de hemólise e atividade antimicrobiana nesses peptídeos (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Tabela 1: Sequências primárias de alguns mastoparanos e peptídeos quimiotáticos para comparação com os peptídeos polybines. A cor verde indica resíduos polares, em vermelho os carregados negativamente e em azul os carregados positivamente.

Nome	Sequência Primária	Vespa
Polybines		
Polybine I	Àc - SADLVKKIWDNPAL - NH ₂	<i>Polybia paulista</i>
Polybine II	Àc - SVDMMVKGLKIWPL - NH ₂	<i>Polybia paulista</i>
	** * * * *	* **
Mastoparanos		
Mastoparano	INWKKMAATALKMI - NH ₂	<i>Parapolybia indica</i>
Mastoparano X	INWKGIAAMAKKLL - NH ₂	<i>Vespa xanthoptera</i>
Mastoparano C	INLKALLAVAKKIL - NH ₂	<i>Vespa crabro</i>
	** * * * *	**
Peptídeos quimiotáticos		
Ves-CP-T	FLPILGKILGGLL - NH ₂	<i>Vespa tropica</i>
Ves-CP-M	FLPILGKLLSGLL - NH ₂	<i>Vespa mandarina</i>
Vês-CP-A	FLPMIAKLLGGLL - NH ₂	<i>Vespa analis</i>
	*** * * *** **	

3.3 – Interação de Peptídeos com Membrana Lipídica

É de vital importância o estudo do mecanismo de ação dos peptídeos retirados dos venenos, porque estes, podem substituir substâncias que se ligam a receptores específicos da superfície celular, anulando ou bloqueando o ligante natural. Com isso abriu-se um vasto campo na pesquisa das estruturas secundárias e terciárias, e também das funções desses compostos, tanto em meio aquoso, como ligados a membranas-modelo ou biológicas, objetivando a produção de novas drogas. Os peptídeos podem tanto estabilizar quanto desestabilizar membranas (LORENZI, 2002).

Não se sabe ainda como os peptídeos policatiônicos Polybine interagem com a membrana lipídica, mas as propostas conhecidas para obter a liberação de histamina dos mastócitos por peptídeos que não são mastoparanos é por exocitose por ligação de peptídeos a proteína G (RIBEIRO *et al*, 2004). Neste mecanismo há uma interação direta do peptídeo policatiônico com a proteína G heterotrimérica, através de um mecanismo independente de receptor descrito à frente (MOUSLI *et al*, 1990).



Figura 2: Proteína G, heterotrimérica: subunidade alfa, representada pela cor azul ligada a GDP, em vermelho e as subunidade beta e gama, representadas pelas cores amarelo e verde.

Existem muitos tipos de proteínas G, cada uma é específica para um conjunto específico de receptores e para um conjunto de proteínas-alvo que surge na “cascata” de reações químicas posteriormente à ativação da proteína G. Todas elas, contudo, possuem uma estrutura similar entre si. Elas são compostas por três subunidades α, β, γ . No estado não estimulado, a subunidade α tem GDP ligado a ela como mostra a figura 2, e a proteína G não é funcional. Quando um ligante extracelular, por exemplo, os peptídeos degranuladores de mastócitos, ligam-se ao receptor ou diretamente à proteína G, essa é ativada, fazendo com que a subunidade α troque GDP por GTP. Isto faz com que a subunidade- α da proteína G se separe da subunidade- $\beta\gamma$, dividindo-se em duas moléculas (uma subunidade α e um complexo $\beta\gamma$), podendo a partir daí ativar reações químicas na membrana plasmática. Provavelmente, dessa forma, é obtida a lise do mastócito e, conseqüentemente a liberação de histamina (VOET, 2000).

A liberação de histamina pelo mastócito pode ser induzida por uma variedade de componentes estruturalmente diversos, incluindo poliaminas sintéticas ou naturais, peptídeos como os mastoparanos e os desgranuladores de mastócitos (p. ex. as polybines), hormônios como bradicimina e anafulataxinas, os neuropeptídeos como substância P, e os neuropeptídeos Y (BEHZAD *et al*, 1995).

A interação dos peptídeos com as proteínas G (mecanismo de estimulação celular) são realizadas de duas formas diferentes. Para explicar essas formas de interação, usaremos como exemplo a substância P (neuropeptídeos que ativam receptores NK_1 , NK_2 e NK_3 presentes na membrana celular). O primeiro mecanismo implica na passagem pela membrana plasmática, começando com uma interação na superfície celular com resíduos de ácido siálico, ou seja, esses neuropeptídeos interagem com as cargas negativas (atração eletrostática) na superfície lipídica e atravessam a membrana por interação hidrofóbica, onde se ligam ao C-terminal da

subunidade- α da proteína G (mecanismo independente de receptor), ou eles interagem com receptores que estão inseridos na camada lipídica. Esses receptores específicos irão se ligar ao C-terminal da subunidade α da proteína G (mecanismo dependente de receptor), conforme ilustrado na figura 3 (MOUSLI *et al*, 1990).

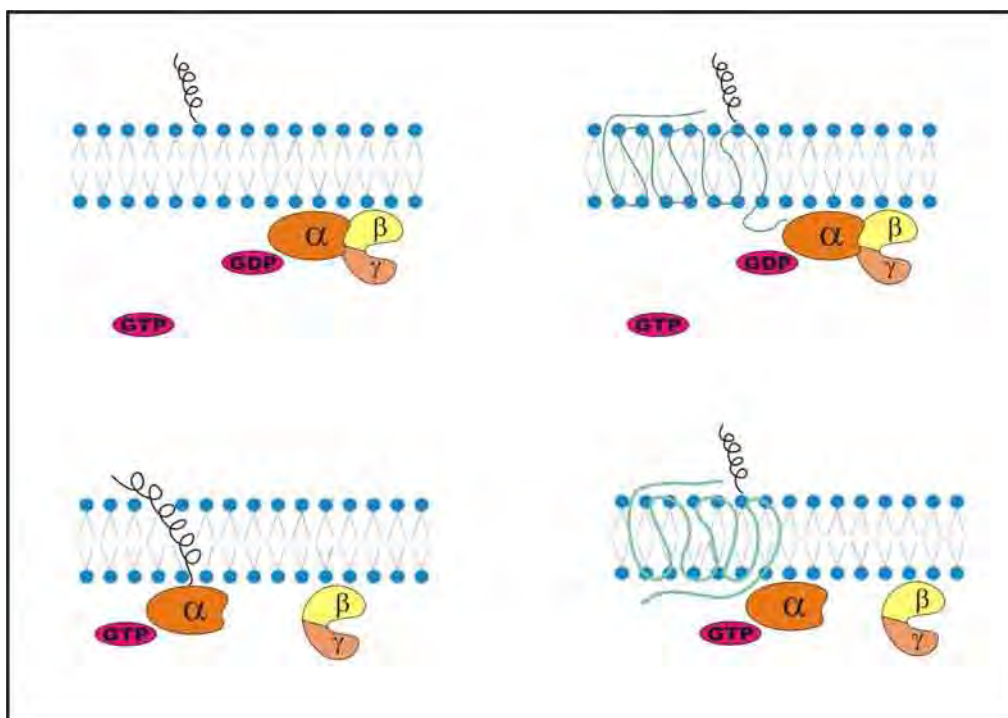


Figura 3: Possíveis mecanismos de ação da *Polybia paulista*. À esquerda o mecanismo independente de receptor, onde o peptídeo se liga diretamente à subunidade α da proteína G e a direita o dependente do receptor que se liga a um receptor específico da proteína para ativá-la.

3.4 – Espectroscopia de RMN

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é reconhecidamente uma técnica muito importante para a investigação a nível molecular, permitindo obter informações estruturais e dinâmicas para qualquer estado da matéria. Em particular é um método para determinar estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. O interessante em resolver estruturas de peptídeos através de RMN está no fato de serem componentes de baixo peso molecular e o método permite estudá-los em solução aquosa, mantendo características semelhantes às de seu estado natural

nos organismos. Peptídeos são constituídos por átomos de carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio, sendo este último o mais abundante dentre eles e muito importante para a aplicação da técnica de RMN.

O fenômeno da ressonância magnética é explicado compreendido através da mecânica quântica. No entanto, muito das idéias básicas podem ser moldadas numa estrutura semi-clássica, sendo esta uma forma didática para esclarecê-las.

Os núcleos atômicos possuem propriedades magnéticas importantes para o uso na espectrometria de RMN. Se esses núcleos atômicos possuírem os prótons e os nêutrons em quantidades ímpares, apresentarão um momento angular intrínseco chamado “spin”. Quando os prótons são sujeitos a um campo magnético externo, devido ao seu momento angular, o momento dipolo magnético μ_m não se alinha com o campo como a agulha de bússola; ele gira e precessiona como um pião ao redor da direção do campo magnético (Figura 4).

A frequência de precessão, é chamada de frequência de Larmor: $\bar{\omega}_0 = \gamma \bar{B}_0$, onde γ é a razão giromagnética, e B_0 é o campo magnético externo. A frequência ω é expressa em termos da velocidade angular e a energia de interação é:

$$E = -\mu_m \cdot B_0$$

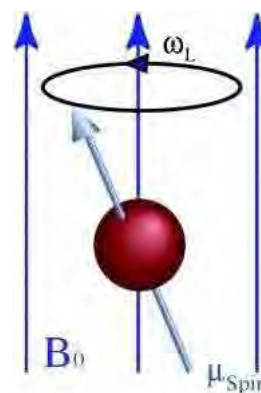


Figura 4: Representa o modelo clássico de um próton exposto a um campo externo.

Essa interação do próton com o campo externo resulta num desdobramento dos níveis de energia (figura 5). O número de níveis quantizados depende do spin I , dado pela série $I, I-1, I-2, \dots, -I$, ou seja, no núcleo existem $2I+1$ possíveis orientações. No caso do núcleo do átomo de hidrogênio, ele terá somente duas orientações possíveis devido ao seu **momentum angular intrínseco** – spin $\frac{1}{2}$, fazendo dele um alvo importante para RMN. Além disso, o fator giromagnético característico do

núcleo e a presença do vetor dipolo magnético de elevada intensidade, aumenta a sua sensibilidade para interferir e para responder a campos magnéticos externos (Tabela 2).

Tabela 2: Valores da sensibilidade de alguns isótopos interessantes para a técnica de RMN.

Núcleo	Sensibilidade relativa	Fator giromagnético ($10^7 \text{ rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$)
^1H	1,0	26,7520
^2H	0,0096	4,1066
^{13}C	0,016	6,7283
^{23}Na	0,093	7,0801
^{31}P	0,066	10,841
^{19}F	0,830	25,181

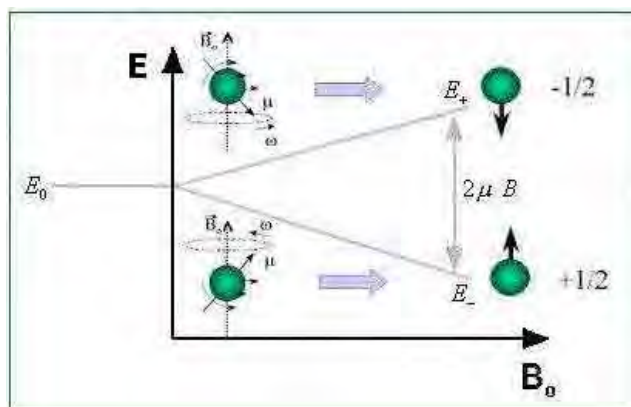


Figura 5: Desdobramento do nível energético para um átomo de hidrogênio. Contêm também as possíveis posições dos prótons em relação à energia. $s = +1/2$ fica paralelo ao campo no nível de energia menor e $s = -1/2$ fica antiparalelo no nível de energia maior. À direita do eixo variável não existe campo aplicado.

Até agora se mostrou o que acontece com um único átomo de hidrogênio exposto a um campo externo, mas quando se lida com uma quantidade muito grande deles tem-se uma soma de momentos de dipolos que chamaremos de magnetização ($\vec{M}$) :

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_j \vec{\mu}_i$$

A partir de agora, veremos o comportamento dos núcleos de hidrogênio numa visão macroscópica, quer dizer, lidaremos com todos os núcleos representados por um vetor magnetização. Esse vetor magnetização ($\vec{M}$), quando submetido a um campo variável (B_1) aplicado perpendicularmente ao eixo Z (representa a direção do campo externo B_0), tira a magnetização do seu estado de equilíbrio. O campo B_1 é aplicado por pulsos de radio frequência (RF) de curta duração, onde os prótons de baixa energia passam para níveis de maior energia. Esses prótons excitados com o tempo, tendem a voltar ao seu estado de equilíbrio. Este sinal é medido por uma bobina, e é chamado de sinal de decaimento de indução livre (Free Induction Decay - FID). Normalmente dois mecanismos de relaxação estão envolvidos: a relaxação longitudinal (spin-rede), T_1 e a relaxação transversa (spin-spin), T_2 .

- Relaxação longitudinal ou T1

Descreve a recomposição da componente longitudinal $M_0(z)$ quando há uma mudança na orientação da magnetização, implicando em troca de energia com o ambiente (rede). A restauração da população de equilíbrio dos estados α e β é governado pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^\alpha}{N^\beta} = e^{\frac{(E^\beta - E^\alpha)}{kT}}$$

-
- Relaxação transversal ou T2

Ocorre no plano perpendicular à direção do campo B_0 , descrevendo o desaparecimento da magnetização transversal ($M(x, y)$), onde os dipolos magnéticos μ_i interagem entre si com frequências levemente distintas, defasando com o tempo.

Quando ocorrem as relaxações descritas acima aparecem neste processo os principais fenômenos físicos que podem distinguir e fornecer informações sobre a molécula. Esses fenômenos constituem a formação dos espectros e são: o deslocamento químico, o acoplamento spin-spin e o acoplamento dipolar.

3.4.1- Deslocamento Químico

Nos espectro de RMN os sinais aparecem em escala crescente de frequência, da direita para a esquerda. Do lado esquerdo estão em campo baixo e os da direita estão em campo alto como mostrado na Figura 6.

Em uma molécula, os núcleos de hidrogênio estão em regiões de maior densidade eletrônica que outros, devido, por exemplo a estarem em ambientes com intensidade de campos magnéticos ligeiramente diferentes. Com isso, os prótons possuem posições diferentes no espectro o que é conhecido como deslocamento químico. Portanto, o deslocamento químico de cada próton vai depender do seu ambiente magnético, onde serão influenciados por campos magnéticos gerados por elétrons, por campos magnéticos que resultam de outros prótons vizinhos e por outros fatores como: dipolo da hélice e corrente do anel (*ring currents*).

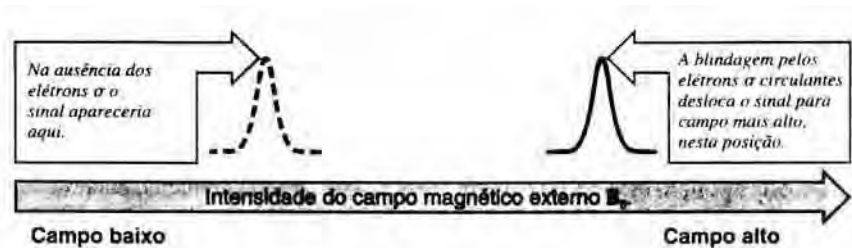


Figura 6: Descreve o sinal do espectro numa escala crescente da direita para a esquerda.

Os deslocamentos químicos são medidos em relação à absorção de prótons de compostos de referência. Um composto de referência é o DSS, o qual é pouco blindado e os sinais estão numa região do espectro onde poucos átomos de hidrogênio absorvem. Assim, o seu sinal não influencia nos sinais dos átomos de hidrogênio da amostra. O deslocamento químico de um próton, quando expresso em hertz, é proporcional à intensidade do campo magnético externo. Como normalmente utilizam-se espectrômetros de diferentes intensidades de campo magnético, é necessário expressar os deslocamentos químicos em uma forma que seja independente da intensidade do campo externo. O deslocamento químico é expresso em unidades de partes por milhão (ppm) e é medido em referência a um composto padrão para indicar o zero da escala do espectro como descrito abaixo:

$$\delta = \frac{\nu_{amostra} - \nu_{DSS}}{\nu_{DSS}} \times 10^6$$

Os átomos de hidrogênio quando ligados a outros átomos dos aminoácidos darão frequências diferentes no espectro. Por exemplo, os hidrogênios ligados ao carbono quiral (C_{α}) terão um deslocamento químico similar às outras ligações do mesmo tipo (Figuras 7 e 8). A ligação C_{α} - H forma a base da estrutura das biomoléculas que estarão ligados aos grupos funcionais (Figura 9).

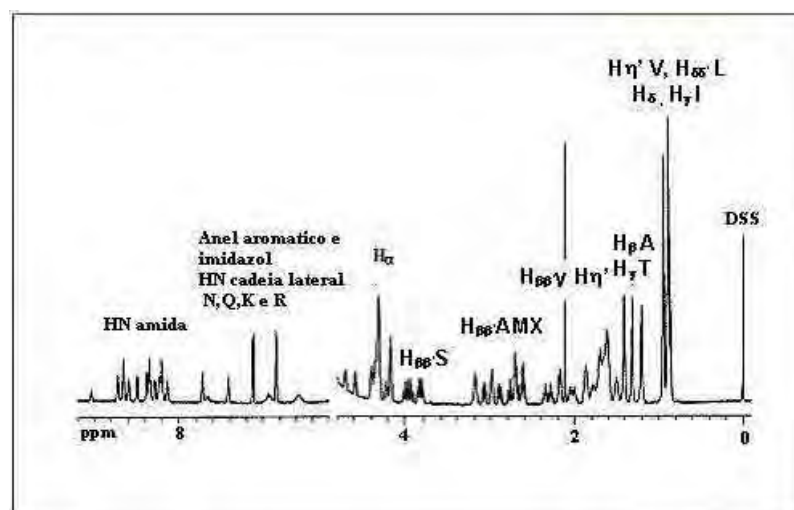


FIGURA 7: Espectro padrão 1D dos prótons que fazem parte do sistema de spin de cada resíduo.

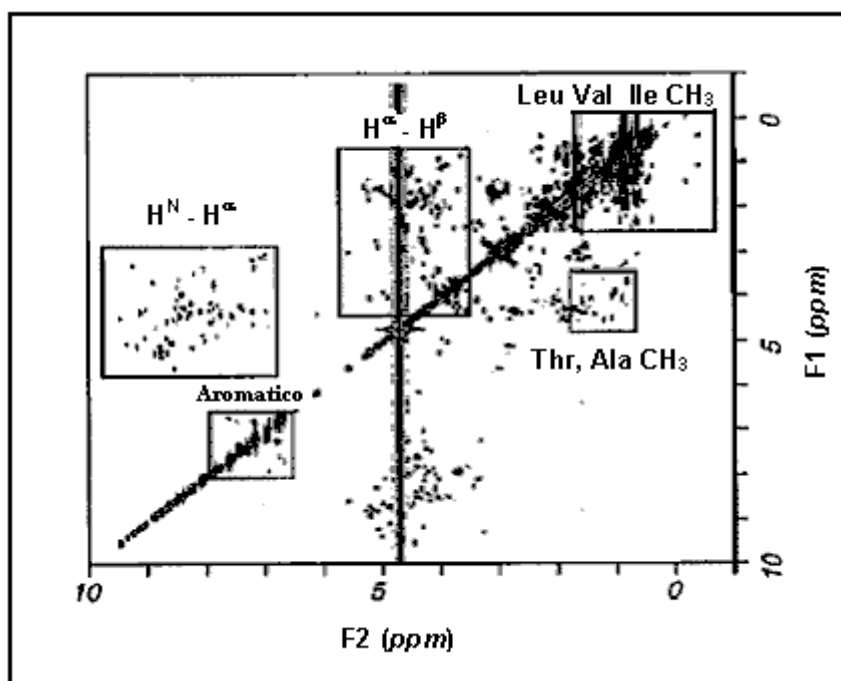


Figura 8: Espectro padrão COSY, onde estão localizados em lugares específicos, os prótons que fazem parte do sistema de spin de cada resíduo.

Foram obtidos padrões de medidas em solução aquosa para os 20 aminoácidos utilizando peptídeos modelos que foram tabelados por Bundi e Wunthrich em 1979 (Bundi e Wuthrich, 1979). Mais recentemente esses padrões de deslocamentos químicos, com distribuição estatística, baseados em dados experimentais, podem ser encontrados no BMRB (**B**iological **M**agnetic **R**esonance **B**ank). Os prótons de cada aminoácido formam um sistema de spins, ou seja, é um grupo de spins que são conectados por acoplamento spin-spin ou acoplamento 3J . Visto que esse acoplamento pode ser observado entre átomos de hidrogênio que estão separados por três ou menos ligações covalentes, cada aminoácido forma um único sistema de spin. As exceções são a Metionina, onde o grupo funcional ϵCH_3 não está conectado com o fragmento $\alpha CH - \beta CH_2 - \gamma CH_2$, os 3 resíduos aromáticos, onde os anéis não estão conectados com $\alpha CH - \beta CH_2$ e os resíduos: Arginina, Glutamina, Asparagina e a Histidina pela presença de nitrogênio na cadeia lateral (WÜTHRICH, 1986).

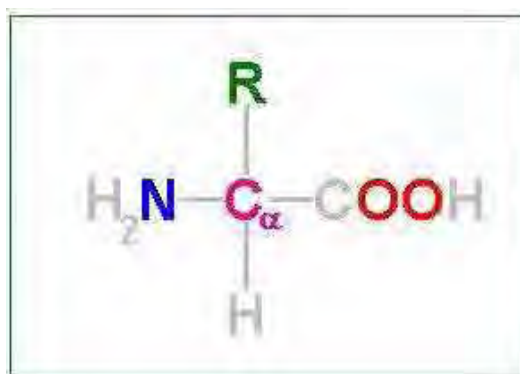


Figura 9: Estrutura geral de um α -aminoácido. Os grupos R diferenciam os 20-aminoácidos-padrão.

3.4.2 - Acoplamento escalar

O acoplamento J é responsável pelo desdobramento de sinal, causado pelo efeito dos campos magnéticos dos prótons sobre os átomos vizinhos, levando à divisão da linha de ressonância dos núcleos, somente quando os conjuntos de prótons possuem deslocamentos químicos diferentes. Como já falamos anteriormente, os prótons do núcleo de hidrogênio só podem estar orientados em duas maneiras diferentes num campo magnético externo: a favor do campo ou contra ele. Então, o momento magnético de um próton, num átomo adjacente, só pode afetar de duas maneiras o campo magnético de um próton onde o sinal é observado. A ocorrência desses dois efeitos levemente diferentes causa o surgimento de um pico num campo um pouco mais alto (em relação ao campo do sinal) e outro pico num campo um pouco mais baixo. A separação desses picos é chamado de constante de acoplamento (J_{ab}). Como o acoplamento é causado inteiramente por forças internas, as magnitudes das constantes de acoplamento não são dependentes da magnitude do campo aplicado (SOLOMONS, 1996). Na Figura 10 podemos observar a divisão da linha de ressonância entre prótons vizinhos.

A divisão das linhas de ressonância, causada pelo acoplamento J, é aditivo, de maneira que se um núcleo está acoplado a dois outros núcleos cada linha de ressonância resultante da divisão provocado pelo acoplamento com o primeiro núcleo será então dividida pelo segundo acoplamento.

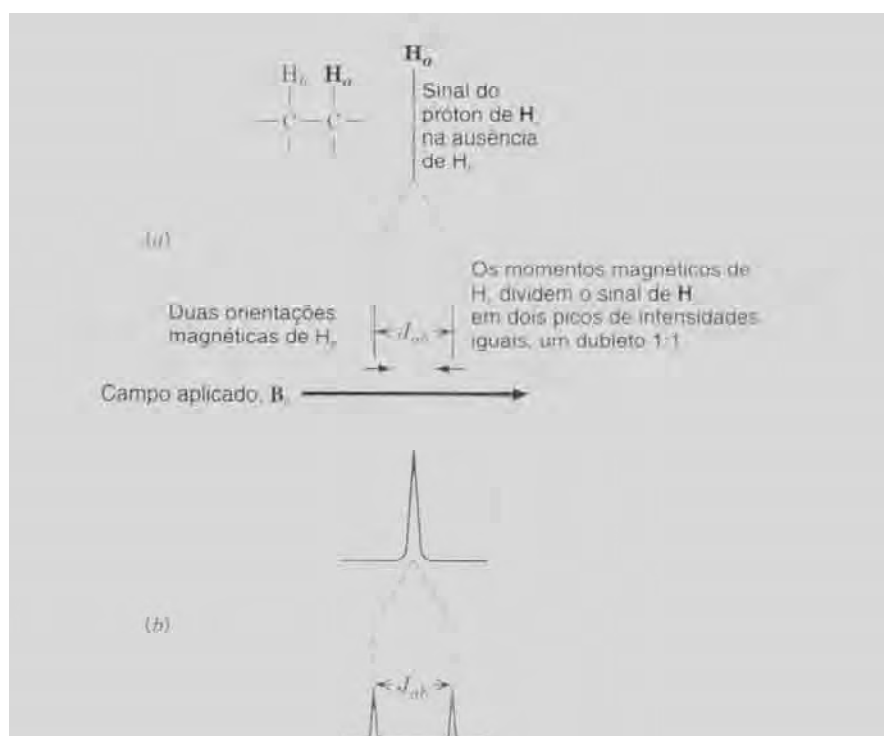


Figura 10: Desdobramento de sinal devido ao acoplamento escalar com um próton não-equivalente de um átomo de hidrogênio. Análise teórica em (a) e aparência real do espectro em (b).

3.4.3 – NOE (Zerbe, 2005; Ven, 1995)

Em um sistema de dois spins (I e S) temos os seguintes estados quânticos $\alpha\alpha, \alpha\beta, \beta\alpha, \beta\beta$ e transições entre eles acontecem. Transições que possuem mudanças de estado de somente um spin são chamados de **single-quantum coherences** (W_1) e levam à observação dos sinais durante o período de detecção. Há mais dois tipos de transições diferentes **double-quantum coherences** (W_2) e **zero-quantum coherences** (W_0) que não são diretamente observáveis mas possuem uma importante função para a descrição teórica do NOE. Essas transições determinam a relaxação-cruzada, σ_{IS} . W_2 ocorrendo após S estar saturado, provoca uma alteração positiva na intensidade I. Se W_0 ocorre, provoca uma alteração negativa em I. O sinal do NOE é positivo para moléculas pequenas e negativo para moléculas grandes. 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 GHz). Estas transições são provocadas por movimentos moleculares de mesma frequência; para moléculas pequenas em solução a frequência é da ordem de 10^{11} Hz e para moléculas grandes a frequência é da ordem de 10^7 Hz.

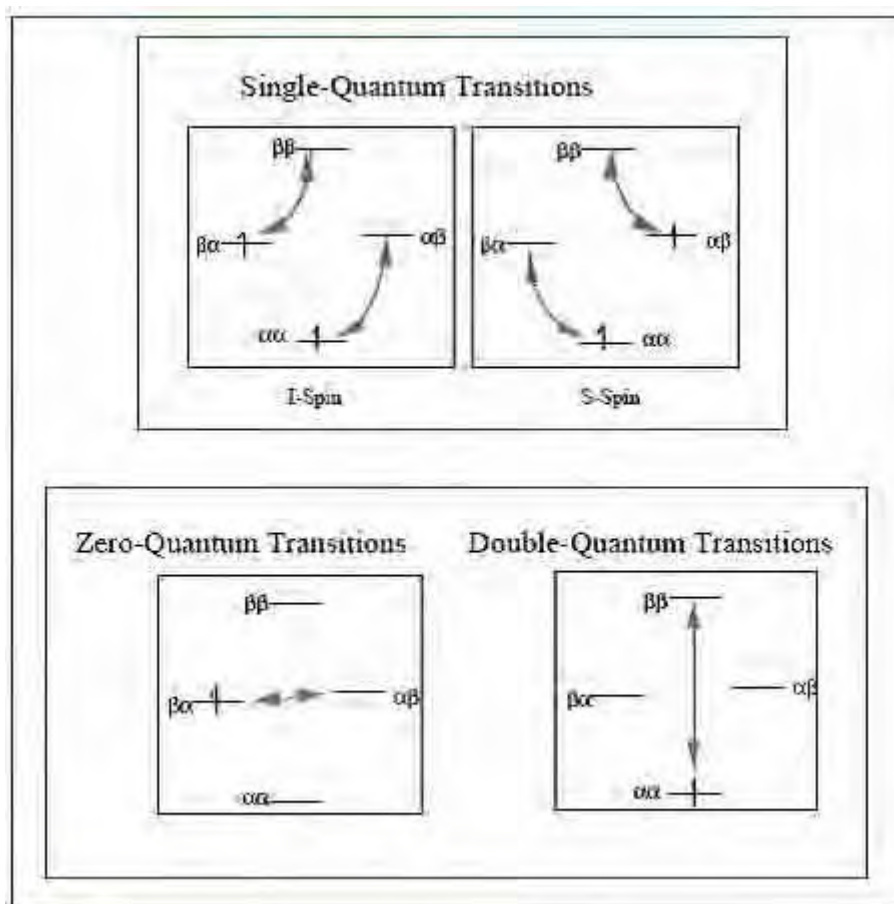


Figura 11: Transições entre os estados α e β . Na parte superior a transição W_1 e na parte inferior as transições W_0 e W_2 .

O efeito NOE (**Nuclear Overhauser Enhancement**) é um dos fenômenos utilizados, no qual se obtêm informações para o cálculo estrutural de uma proteína usando RMN, juntamente com informações de acoplamento escalar. O NOE é provocado pela interação dipolo-dipolo entre spins através do espaço quando existe uma distância mínima para surgir interação magnética entre os dipolos, enquanto

que o acoplamento escalar interage através de ligações químicas. O fator de medida do NOE η é definido como:

$$\eta = f_I\{S\} = \frac{(I - I_0)}{I_0}$$

$$f_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS}}$$

no qual I e I_0 são intensidades observadas da ressonância com e sem irradiação do spin S, respectivamente, e σ_{IS} é a relaxação-cruzada, definida como :

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0$$

onde caracteriza-se o grau de transições dipolo-dipolo que dá a origem do NOE e depende das distâncias inter-moleculares e o ρ_{IS} a relaxação-longitudinal é a constante de relaxação dipolar direta do spin I para o spin S. A eficiência através do qual o NOE é transmitido do spin I para o spin S depende da distância dos 2 prótons envolvidos e das propriedades relacionadas ao movimento das moléculas em solução.

$$\eta = f(t_c r^{-6})$$

3.5 – Experimentos de RMN em líquidos

No moderno espectrômetro de RMN a magnetização transversal é gerada por uma série de um ou mais pulsos de RF. A evolução no tempo da magnetização gera uma corrente variando com o tempo na sonda (*probe*) (Figura 12). A corrente é amplificada e digitalizada para um receptor e gravado pelo espectrômetro de RMN. O FID é o termo referente ao sinal adquirido durante o período de aquisição de dados. As propriedades da magnetização que gera o sinal captado durante a fase de aquisição, obviamente é dependente da maneira como ela foi excitada. Existe uma grande quantidade de diferentes seqüências de pulsos utilizadas com diferentes objetivos. Os pulsos adquiridos nas seqüências dos experimentos de RMN são definidos pelo tempo de duração do campo variável (B_1) e a potência (atenuação - $d\beta$) desse campo. Os pulsos básicos mais conhecidos são demonstrados nos tópicos logo abaixo.



Figura 12: Desenho esquemático, contendo os componentes que fazem parte do equipamento de RMN.

3.5.1 - Pulso de 90°

O pulso de 90° consiste na aplicação de um pulso onde o vetor magnetização se desloca do seu ponto de equilíbrio, levando a magnetização ao plano transversal como exposto na Figura 13.

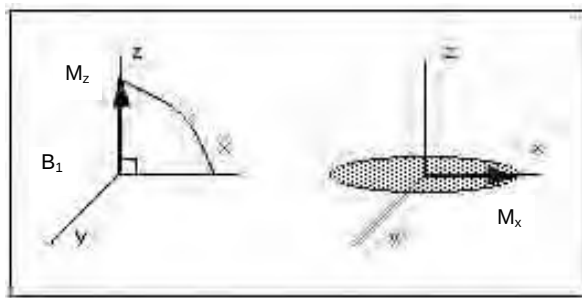


Figura 13: Movimento da magnetização M durante a aplicação de um pulso de 90°.

3.5.2 - Pulso de 180°

A proposta do pulso de 180° é a inversão da magnetização:

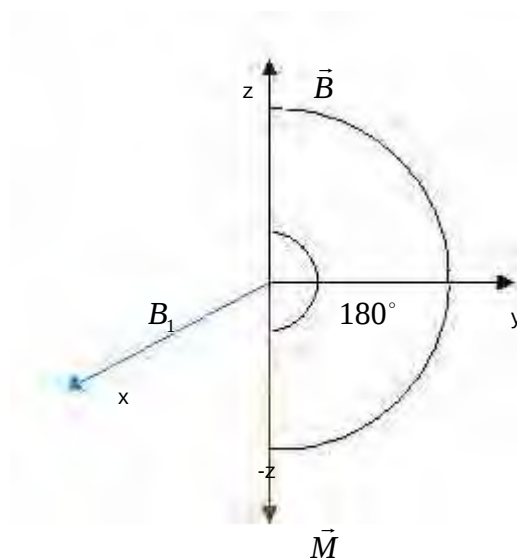


Figura 14: Movimento da inversão magnética. Pulso de 180°.

Um pulso de 180° é geralmente aplicado após os spins terem-se movido com frequências distintas entre eles, causando uma defasagem no sistema. Portanto, a inversão é feita para a reconstrução da magnetização original, refocando a evolução do deslocamento químico da magnetização transversal. Esse processo é conhecido como **spin echo**. Ele cancela os efeitos de precessão de Larmor e/ou acoplamento J.

3.5.3 - Aquisição de um espectro (Zerbe, 2005)

Depois de efetuarmos alguns passos como: verificar a temperatura correta, posicionar a amostra no equipamento (spinner) e inseri-la no magneto. Ativamos o campo. É importante estabilizar o campo magnético. Esse processo é chamado de **locking** e consiste em monitorar a frequência da linha do deutério para adquirirmos parâmetros observáveis do campo magnético externo do equipamento. Considerando que as frequências de precessão são proporcionais à intensidade do campo magnético, o mesmo necessita ser homogêneo em toda a extensão da amostra para obter a capacidade de observar pequenas diferenças de frequência (pequenos acoplamentos). Por isso é necessário fazer o **shimming**, que consiste em ajustar à homogeneidade do campo magnético. Para a detecção dos sinais temos no equipamento de RMN uma sonda (probe), onde encontramos um circuito ressonante composto basicamente por dois componentes: um capacitor (c) e uma bobina (ou indutância, L). Para melhorar a sensibilidade e o comprimento dos pulsos a leitora da sonda (probehead) precisa passar por uma afinação de transmissão da frequência e a impedância deve ser equilibrada. Esse processo é conhecido como TUNE e MACH. Em seguida, é realizado a calibração dos comprimentos e potência dos pulsos e depois se coloca os parâmetros para definir qual é o tipo de espectro

desejado, e em seguida se adquire o FID. Depois dos dados adquiridos do FID é feito o processamento desses dados.

3.5.4 – Pré-saturação da Água (Cavanagh, 1996)

A espectroscopia de RMN em líquidos sofre com a radiação do solvente. A técnica mais comum usada para a supressão de solvente é a pré-saturação do sinal do solvente durante o decaimento (*recycle delay*) usando um campo fraco de rf. A implementação da técnica de pré-saturação é muito simples e eficaz. As principais desvantagens são que os sinais do solvente (principalmente os H^α na proteína) podem ser saturados pelo campo de rf e a transferência de saturação pode, particularmente, saturar bastante os prótons. A qualidade da supressão da água obtida pela pré-saturação depende essencialmente da homogeneidade do campo magnético e, portanto da qualidade do Shimming.

Os tempos de irradiação na ordem de 1-2 s usando campos de rf com amplitudes de aproximadamente 50 Hz usualmente promovem adequadamente a supressão da água. Para cada nova amostra, o shimming, a frequência de irradiação e o poder de irradiação devem ser ajustados para otimizar a supressão de água. Atualmente, outras técnicas estão implementadas nos espectrômetros e são também largamente utilizadas como: watergate e wet.

3.5.5 – Processamento dos dados

A abordagem mais comum do processamento dos dados é converter os sinais digitalizados que estão no domínio do tempo em um espectro no domínio da frequência, aplicando a Transformada de Fourier (apêndice B). Existem outras técnicas de processamento que podem ser aplicados antes ou depois da

transformada de Fourier para maximizar as informações disponíveis no espectro (Cavanagh, 1996). Algumas dessas importantes técnicas estão descritas abaixo.

3.5.5.1 - Correção de Fase

A transformada de Fourier pode ser decomposta em uma parte real e uma imaginária do sinal. Na prática a parte real e imaginária do sinal são armazenadas numa localização separada na memória, onde a parte real mostra os sinais absorventes e a parte imaginária os dispersivos. A correção de fase otimiza todos os sinais absorventes deixando os sinais dispersivos invisíveis, ou seja, o sinal terá somente a parte real (Zerbe, 2005).

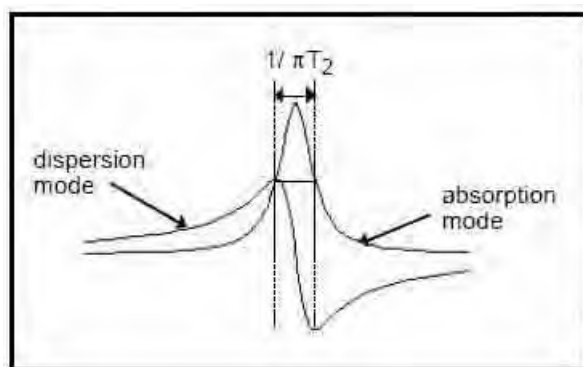


Figura 15: Sinal em modo absorvente e dispersivo.

3.5.5.2 - Filtragem do Solvente

A presença de artefatos perto da linha de ressonância do solvente no espectro pode encobrir informações importantes. Portanto, para limparmos essa região utilizamos funções pré-definidas como: SOL e POLYtime (Anexo – scripts do NMRView). A primeira é uma função de convolução no domínio do tempo e a outra é aplicada uma função polinomial.

3.5.5.3 - Correção de linha

Os problemas com linhas de base distorcidas podem causar erro na integração dos picos e perda de informações no procedimento de identificação dos

picos. Em geral, distorções de linha de base são causadas por desajuste dos primeiros pontos dos FID, esse problema acontece quando a intensidade do sinal é larga e pode ser corrigido suprimindo os primeiros pontos do sinal RMN. Há outros problemas de linhas de base que podem ser reparados como: direção e curvatura pela aplicação de subtração dos dados através de funções polinomiais.

3.5.6- 1D RMN

O experimento em 1D é o mais simples, utiliza a espectroscopia de RMN pulsada por transformada de Fourier, consistindo apenas de duas partes: preparação e detecção.

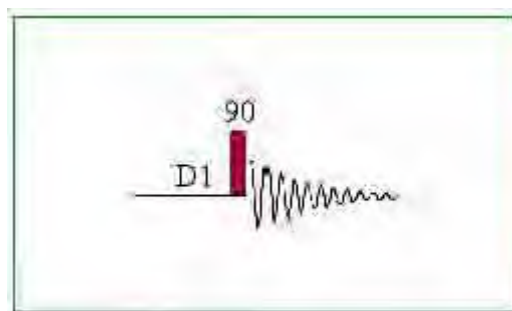


Figura 16: Seqüência de pulso do espectro 1D.

Basicamente, no período de preparação, os núcleos são excitados com somente um único pulso de 90°_x gerando logo em seguida um FID (Figura 16). O período de detecção grava o sinal, no domínio do tempo. O sinal, adquirido no domínio do tempo em uma ou mais acumulações (repetições) aumentando a relação sinal/ruído, é transformado (via transformada de Fourier) para o domínio das frequências, resultando no espectro (Figura 7). Atualmente existem vários experimentos de RMN 1-D desenvolvidos para o estudo das propriedades químicas e físicas da matéria. Em relação aos peptídeos e as proteínas, os espectros 1-D de prótons se tornam extremamente complexos e difíceis de serem analisados, em

função da grande quantidade de spins presente nas amostras. Espectros 1D nos permitem simplesmente analisar a amostra de uma maneira geral.

3.5.7 - 2D RMN

A introdução dessa ferramenta é essencial para elucidar a estrutura de uma molécula (peptídeos e proteínas), utiliza-se a dispersão de sinais em duas dimensões ortogonais e a identificação de correlações. A transformação dos dados no domínio do tempo para o da frequência é obtida pela transformada de Fourier bidimensional (ZERBE, 2005).

O experimento de RMN em 2-dimensões é caracterizado pela introdução de um segundo eixo de frequência, no qual permite a correlação entre as frequências dos spins.

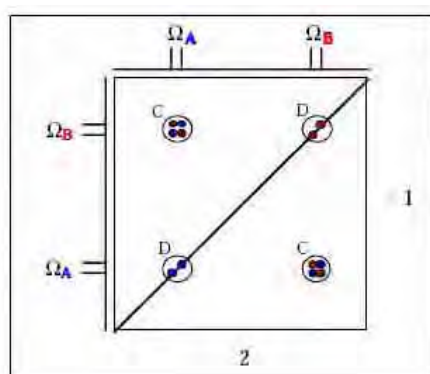


Figura 17: Aparência do espectro homonuclear COSY. (C) picos-cruzado indicam a correlação entre frequências dos spins e (D) picos diagonais mostram essencialmente o espectro 1D.

A sequência de pulsos presente nos espectro 2D contém quatro períodos diferentes como demonstrado na Figura 18.

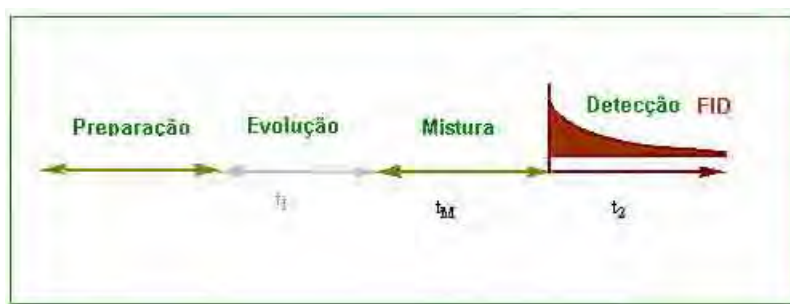


Figura 18: Esquema de intervalos de tempos para uma experiência de RMN em 2D.

Preparação: serve para criar a magnetização transversal. No caso de um espectro COSY, TOCSY e NOESY é aplicado um pulso de 90° para a excitação.

Evolução: é utilizado para monitorar a coerência¹ de interesse. No COSY, as coerências evoluem sob ação da precessão de Larmor e do acoplamento escalar. Já no NOESY, ao invés do acoplamento escalar, o monitoramento é feito através dos deslocamentos químico Ω_I e Ω_S . Este período de evolução é utilizado para a segunda codificação temporal necessária para a obtenção de um espectro 2D.

Mistura: neste período ocorre a transferência de magnetização do spin A para o spin B. As possíveis transferências podem contar com: Acoplamento Escalar (COSY e TOCSY) e Acoplamento Dipolar (NOESY e ROESY).

Deteção: neste período é incluída, simplesmente, a aquisição do FID.

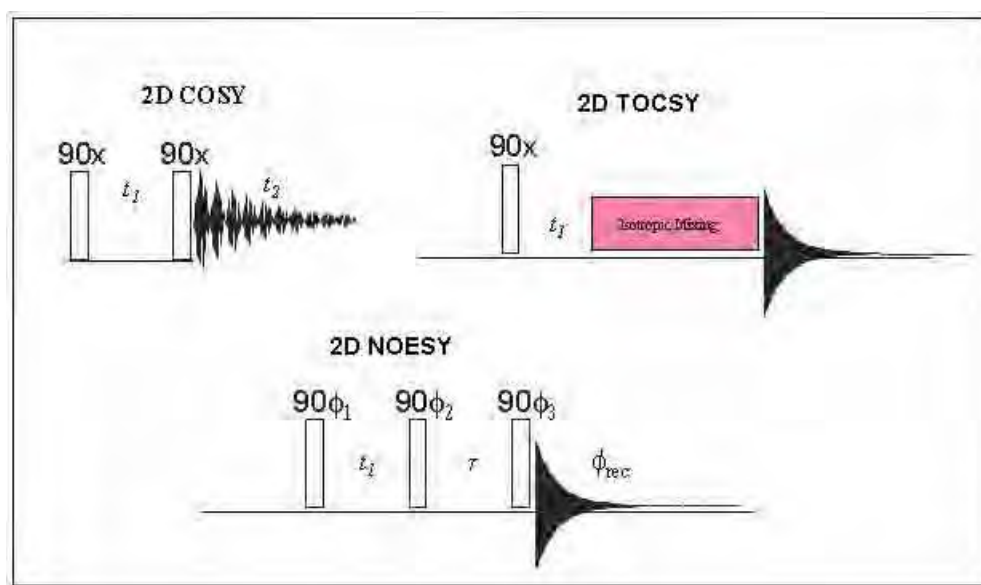


Figura 19: Representa os diferentes tipos de espectro 2D utilizados na análise de estrutura de proteínas.

¹ Coerência: são as transições que ocorrem entre os spins nas experiências de RMN.

3.6 - Procedimento para a determinação das estruturas dos peptídeos em solução.

Os procedimentos básicos para a determinação das estruturas de RMN de pequenas proteínas de 100 ou menos resíduos são baseados no método determinado por Wuthrich et al (Wuthrich, 1986), esses procedimentos estão sendo apresentados da seguinte ordem:

3.6.1- Identificação dos sistemas de spins

As ressonâncias de cada resíduo podem ser identificadas através de experimentos correlacionando as ressonâncias de prótons via acoplamento spin-spin, ou seja, que possuam o mesmo sistema de spin. Os experimentos 2D em RMN que fazem essas identificações são os espectros COSY e TOCSY. O espectro COSY é usado para correlacionar regiões (*fingerprint*) e medir acoplamento escalar. Essas regiões de interesse são $H^N - H^\alpha$ (*fingerprint* do esqueleto) e é ponto de partida para a identificação dos sistemas de spins dos resíduos no espectro TOCSY; a região $H^\beta - H^\alpha$; regiões onde possuem picos para identificar ressonâncias dos anéis aromáticos das cadeias da fenilalanina, tirosina, triptofano e histidina e picos que identifiquem grupos metil (isoleucina, valina, leucina). Esses espectros são usados para identificar sistemas de spins individuais (aminoácidos), onde os deslocamentos químicos correspondentes a cada sistema de spins é baseado nos padrões de espectros COSY, TOCSY e NOESY presentes no apêndice A.

3.6.2 - Assinalamento dos NOEs

Os picos inter-residuais são observados através do espectro NOESY, onde os picos cruzados NOE aparecem através de distâncias entre átomos de hidrogênio A e B localizados no resíduo na posição i e j, respectivamente e denotado por $d_{AB}(i, j)$. Essas distâncias são definidas na direção do N-terminal para o C-terminal da cadeia polipeptídica. Esta notação pode ser aplicada para as seguintes distâncias:

$$\begin{aligned}d_{\alpha N}(i, j) &= d(\alpha H_i, NH_j) \\d_{NN}(i, j) &= d(NH_i, NH_j) = d_{NN}(j, i) \\d_{\beta N}(i, j) &= \min\{d(\beta H_i, NH_j)\} \\d_{\alpha\alpha}(i, j) &= d(\alpha H_i, \alpha H_j) = d_{\alpha\alpha}(j, i) \\d_{\alpha\beta}(i, j) &= \min\{d(\alpha H_i, \beta H_j)\}\end{aligned}$$

3.6.3 - Assinalamento seqüencial

Com os picos cruzados intraresiduais (espectro COSY e TOCSY) e inter-residuais (espectro NOESY), temos então, a identificação dos resíduos presentes da cadeia polipeptídica. A identificação dos resíduos em relação a sua estrutura primaria é chamada de assinalamento seqüencial. Com o assinalamento seqüencial, podemos ordenar os sistemas de spin na seqüência correta da cadeia polipeptídica. Isso é feito com o uso das conexões seqüenciais $d_{\alpha N}(i, i+1)$, sempre presentes no espectro NOESY e ROESY de RMN, por representarem distâncias sempre menores que 5 Å, independentemente da estrutura da cadeia polipeptídica.

3.6.4 - Cálculo estrutural (Cavanagh, 1996; Cüntert, 1998; Fadel,

2003)

A análise da estrutura por espectroscopia de RMN é feita por parâmetros como: o deslocamento químico, acoplamento escalar e relaxação dipolar. O acoplamento escalar e interações dipolares formam a base de dados para o cálculo estrutural das proteínas. Dentre esses, o mais importante para a determinação da estrutura é o NOE. A constante de interação é proporcional ao inverso da sexta potência da distância entre a interação de dois prótons. Numa aproximação inicial de intensidades de picos-cruzados NOE, 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 a calibração do espectro. A obtenção das distâncias internucleares do espectro NOESY é feita pela relação:

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

onde S_{ref} e S_i são as intensidades de picos-cruzado integrados. Na prática, somente os picos de um espectro NOESY com reduzido tempo de mistura τ_m respeitam esta proporcionalidade. Mas, como são de pequena intensidade e com relação sinal/ruído inadequadas, adquirem-se espectros utilizando um tempo de mistura maior. Sobre essas condições as intensidades dos Picos-cruzado NOESY não são diretamente proporcionais as constantes de relaxação-cruzada entre a interação de spins porque a magnetização é transferida entre spins em múltiplos passos via “spins diffusion”². Portanto, para incluir o efeito “spin diffusion” no calculo estrutural e atribuído limites de erro inferior e superior as distâncias. Esse método é baseado na proposta de

² Spin diffusion - é uma transferência indireta de um spin para outro via outros spins na vizinhança.

Kalbitzer & Hengstenberg (Kalbitzer & Hengstenberg, 1993). A Minimização e o Refinamento da Estrutura são passos finais para a obtenção da estrutura da proteína; são análises mais detalhadas depois da realização do cálculo estrutural. Esses passos podem ser concluídos por recursos interativos (incluindo fixação estereo, presença de pontes de sulfeto, interações eletrostáticas e deslocamento químico).

4. Materiais e Métodos

4.1 – Síntese e Preparação das amostras de Polybine I e II

A descrição da síntese de peptídeos neste trabalho foi retirada do artigo, Ribeiro et al, 2004.

Os peptídeos foram preparados por um protocolo de síntese de fase sólida, usando os produtos químicos: N-9 Fluorofenilmetoxi-carbonil (Fmoc) e resina Novasyn TGS (Nova Biochem). Para o preparo do peptídeo apresentando o N-terminal acetilado, foi adicionado anidrido acético à resina contendo o peptídeo, mantendo-se sob agitação por uma hora para promover a acetilação.

Para promover a clivagem do complexo resina-peptídeo, essa foi tratada com ácido trifluoroacético, 1,2-etanoditiol, anisol, fenol e água (82,5: 2,5: 5: 5: 5 por volume) do complexo em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, foi realizada uma filtragem para remover a resina. Adicionou-se éter etil a 4°C ao material solúvel, causando a precipitação do peptídeo, coletado após centrifugação 1000 X g por 15 min. O peptídeo precipitado foi solubilizado em água e cromatografado em RP-HPLC, usando uma coluna (Shiseido C18, 250mm X 10mm, 5µm) sob eluição com 40% (v/v) de acetonitrila em água contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético a uma vazão de 2ml/min.

Os homogeneizados e seqüências dos peptídeos sintéticos (ambos acetilado e não-acetilado) foram monitorados por HPLC analítico e análise de ESI-MS.

4.2 – Pré-Análise da amostra através do Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular dos Polybines foram obtidos utilizando um espectropolarímetro Jasco-710 (JASCO Internacional Co. Ltd, Tokyo, Japan). Foram coletados na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 à 250 nm, à 25° C. A velocidade de varredura foi 20 nm/min, utilizando uma largura de banda de 1,0 nm, sensibilidade de 20 miligraus, tempo de resposta de 1 s e 0,1 nm de resolução. Os espectros finais foram obtidos a partir da média de 16 acumulações e se usou cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm.

Os espectros foram coletados em várias concentrações de 2, 2, 2-Trifluoretanol (TFE) adquirido da Merck e de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) da Pharmacia. Alternativamente, foi utilizada Lisofosfatidilcolina (LPC). Os peptídeos Polybine foram dissolvidos em água e em tampão fosfato de Potássio (10mM) em pH 6 a 9.

Fazendo a correção da linha de base, a elipticidade observada, θ (miligraus), foi convertida em elipticidade molar média, $[\Theta]$ (graus cm²/mol), usando a relação:

$$[\Theta] = \frac{100 \times \theta}{lcn}$$

Onde l é o caminho óptico da cubeta em centímetros, c é a concentração do peptídeo em milimolar e n é o número de resíduos do peptídeo.

Assumindo um modelo de dois estados, proposto por Rohl & Baldwin (Rohl & Baldwin, 1998), a elipticidade residual observada em 222 nm (Θ_{222}^{obs} em graus cm²/dmol resíduo) foi convertida em porcentagem de α -hélice (f_H) usando a equação :

$$f[\Theta] = \frac{([\Theta]_{222}^{obs} - [\Theta]_{222}^c)}{([\Theta]_{222}^H - [\Theta]_{222}^c)}$$

onde $[\Theta]_{222}^c$ é a elipticidade em 100% de random coil já com correção de temperatura (T em °C):

$$[\Theta]_{222}^c = (640 - 45T)$$

e $[\Theta]_{222}^H$ é a elipticidade residual para uma estrutura helicoidal dada por:

$$[\Theta]_{222}^H = (-42500 + 125T) \left(1 - \frac{x}{n}\right)$$

onde x é o número de carbonila não ligada, sendo que para peptídeos com o C-terminal amidado usamos x= 3 e x=4 para aqueles carboxilados, correspondentes ao nº de carbonilas do peptídeos não ligados numa hélice completa.

4.3 – Preparação da amostra para RMN

A amostra foi preparada em Tampão Fosfato de Potássio a 10mM, pH 6 com 40% (v/v) de 2,2-trifluoretol (TFE), para um volume final de 600 µl com uma concentração de 1mM. Foi adicionada, também, uma quantidade de 2,2 Dimethyl-2 – Silapentane-5-Sufanate (DSS) para a calibração dos deslocamentos químicos. Visando à conservação dessa amostra, foi adicionada ainda uma pequena quantidade de Azida de Sódio (antifúngica) e 5% de D_2O (água deuterada) para usar como referência no processo de **Locking**.

4.4 – Coleta dos espectros por RMN

As coletas dos espectros foram realizadas nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron – LNLS, onde utilizamos o espectrômetro Varian INOVA-600AS, mostrado na figura 20, operando à frequência de próton de 600 MHz.



Figura 20: Fotografia do supercondutor Oxford 600 da Varian.

Os dados do deslocamento químico foram expressos em partes por milhão (ppm) com relação ao pico do solvente de DSS, utilizado como padrão de referência e os espectros foram coletados a 25°C. O espectro 2D [¹H-¹H]-COSY foi adquirido com 1024 pontos para t_2 e 256 pontos para t_1 e outros espectros foram adquiridos com 1024 pontos para t_2 e 512 pontos para t_1 , com 8 acumulações por *FID* e uma janela espectral de 12 ppm. A princípio foram coletados espectros 1D para confirmação da integridade da amostra e posteriormente partimos para a coleta dos espectros em 2 dimensões. Para a identificação através de acoplamento J dos sistemas de spins de cada resíduo foram coletados espectros 2D [¹H-¹H]-COSY (AUE *et al*, 1976), 2D [¹H-¹H]-COSY-DQF (RANCE *et al*, 1983), 2D[¹H-¹H]-TOCSY e 2D[¹H-¹H]-TOCSY (GRIESINGER, 1996) com supressão de solvente por pré-saturação e wet (*water suppression enhanced through T1 effects*), com uma tempo de mistura $\tau_m = 300ms$. Para a análise do assinalamento seqüencial e a obtenção dos vínculos para o cálculo estrutural dos peptídeos foram coletados espectros 2D[¹H-¹H]-NOESY (WIDER, 1984) com tempo de mistura $\tau_m = 300ms$ e 2D [¹H-¹H]-ROESY (BAX *et al*, 1985) com diferentes tempos de mistura $\tau_m = 150ms$ e $\tau_m = 100ms$.

4.5 – Processamento dos dados e Identificação dos deslocamentos químicos

O processo de identificação dos deslocamentos químicos nos espectros 2D foi realizado depois do ajuste da fase e da linha de base, utilizando o programa NMRVIEW (JOHNSON *et al*, 1994). Com os espectros 2D ajustados, determinamos o assinalamento das linhas de ressonância de acordo com os princípios da

espectroscopia homonuclear proposta por Wuthrich (Wuthrich, 1986). Identificamos o sistema de spins para cada resíduo com os espectros 2D [^1H - ^1H]-COSY, e 2D [^1H - ^1H]-TOCSY, utilizando os programas NMRVIEW, CARAMOL e o XEASY (BARTELS, 1995). Para a identificação seqüencial dos aminoácidos foram analisados os espectros 2D [^1H - ^1H]-NOESY e 2D [^1H - ^1H]-ROESY. Os volumes dos picos cruzados NOE foram integrados utilizando o programa CARAMOL.

4.6 – Cálculo Estrutural

As distâncias calculadas através dos volumes NOE foram utilizadas para o cálculo estrutural usando o protocolo padrão (*simulated annealing*) do programa CNS (BRUGER *et al.*, 1998). O programa, a princípio, gerou um total de 100 estruturas, depois realizou uma minimização de energia, tirando as 10 estruturas de menor energia para a representação da estrutura calculada em formato PDB. Foi utilizado o programa MOMOL (KORADI *et al.* 1996) para análise estrutural e obtenção dos modelos.

5-Resultados e Discussão

Antes de empregar a técnica de RMN, foram obtidos espectros de CD para ambos os peptídeos estudados. O CD é muito utilizado para o estudo de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos, permitindo assim avaliar se a amostra possui estruturas de hélice- α , folha- β ou estrutura desordenada, seja ela, em solução aquosa ou contendo outro solvente específico. O CD foi utilizado neste trabalho com o intuito de verificar as condições da amostra, dependência da estrutura com a variação de pH e a escolha do indutor de estrutura. O primeiro conjunto de espectros medidos no CD foi feito em H₂O e TFE (40%), visando observar se a amostra estava em boas condições, ou seja, estruturada e comparar as duas formas de cada peptídeo. Observamos no espectro mostrado na Figura 22 que a amostra tem boa aparência devido ao surgimento de sinais positivos e/ou negativos que resulta numa estrutura ordenada ([http:// www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm](http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm)). De acordo com Susan *et al* (2000) o bloqueio dos dois terminais (forma acetilada), poderia dar mais estabilidade a estrutura e um poder de ação maior. A comparação das duas formas utilizando espectros de Dicroísmo Circular não revelou nenhuma diferença entre as formas acetilada e não acetilada. Portanto, essa estruturação contida no espectro (Figura 22) não comprova se realmente o bloqueio dos dois terminais ratifica as informações citadas anteriormente.

Em RMN a melhor condição para se obter bons sinais no espectro é ter pH abaixo da neutralidade, ou seja, um pH ácido. O ponto isoelétrico (PI), do peptídeo Polybine I foi determinado através de dados teóricos, obtendo um gráfico do número de carga pelo pH como demonstrado na Figura 21.

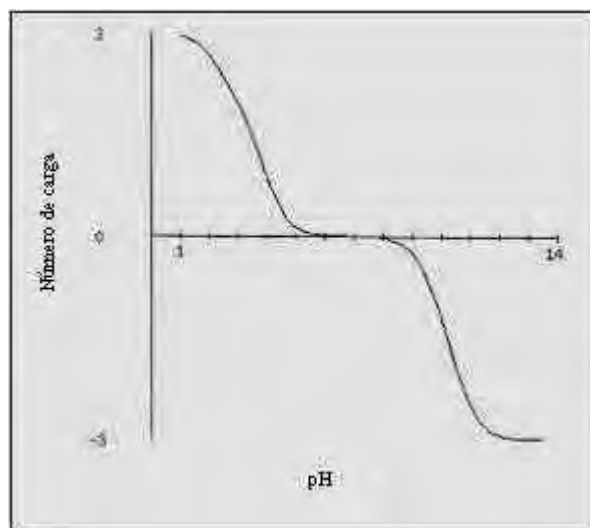


Figura 21: Gráfico com a medida do Ponto isoelétrico (PI) do peptídeo Polybine I.

Isso nos auxiliou na escolha dos pHs que deferíamos utilizar nos espectros de CD, para conseguir um pH adequado para ser usado nas amostras de RMM. Observando a faixa que vai do pH 5 ou 8 (Figura 21), a Polybine I possui praticamente carga líquida neutra. Isso já era esperado devido a presença de resíduos Asp (negativo) e Lys (positivo). Foram feitos espectros de CD no tampão fosfato de potássio nos pHs 6 e 8. A escolha foi feita através do gráfico mostrado na Figura 21, devido a faixa de estabilidade de carga.

No que se refere a mistura do tampão com o TFE não constatamos nenhuma variação no pH, o que não afetou a amostra durante as medidas de CD. Antes de realizar a variação do TFE obtivemos um espectro com SDS, TFE e LPC, substâncias que induzem a mudança conformacional da estrutura. Esses espectros foram utilizados para sabermos, dentre essas substâncias, qual seria a melhor opção para as medidas de RMN. O espectro (Figura 23) revelou que o TFE e o SDS mostraram mesmo comportamento conformacional na estrutura secundária. Portanto, ambos poderiam ser utilizados nas medidas de RMN.

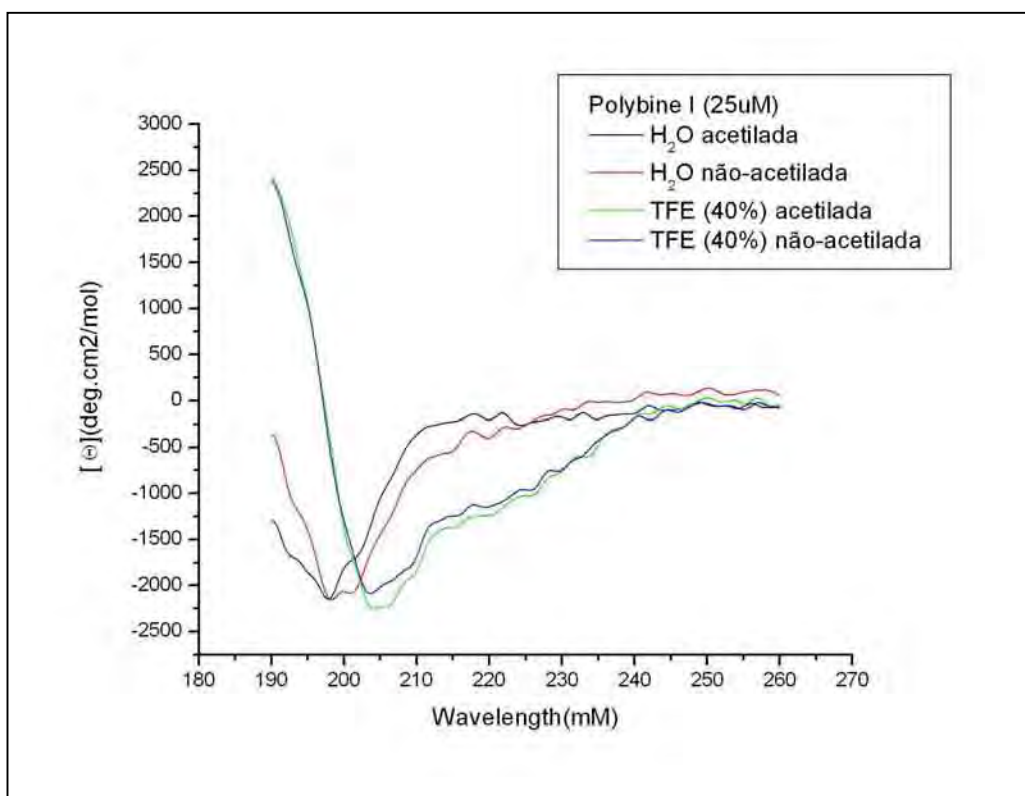


Figura 22: Espectros de CD da Polybiline I nas formas acetilada e não-acetilada a 25° C.

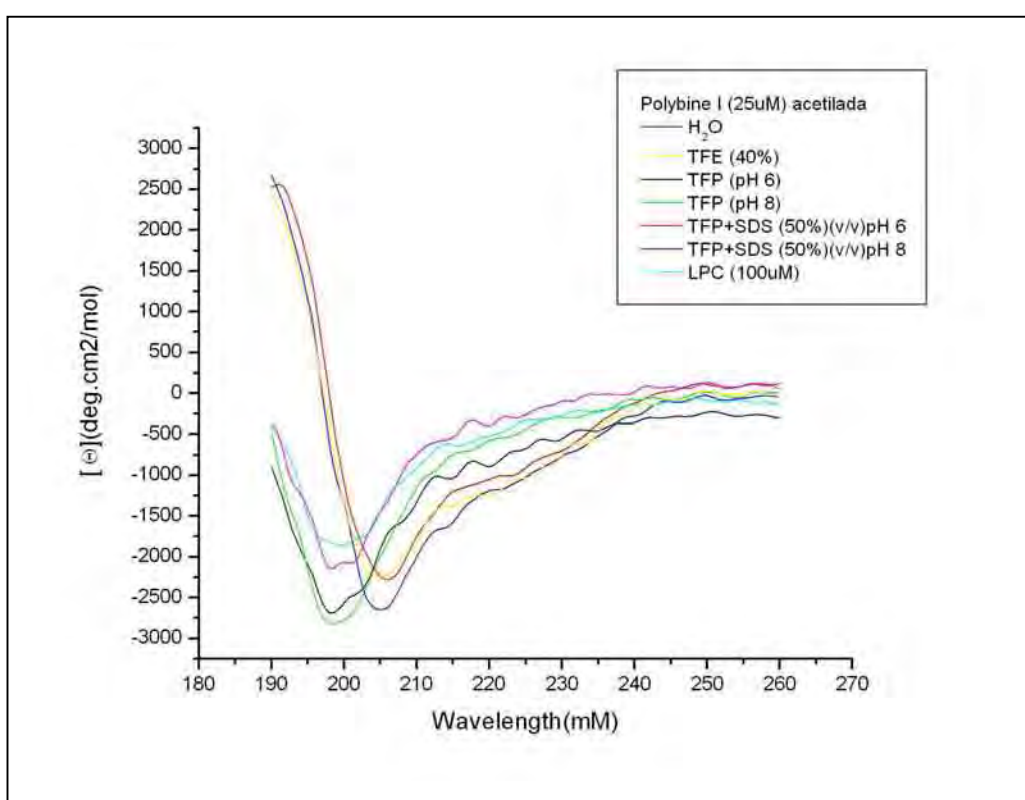


Figura 23: Espectros de CD da Polybiline I com variação de pHs em SDS, TFE e LPC em Tampão Fosfato de Potássio (TFP) a 25°C.

A Polybine I não-acetilada apresentou uma única banda negativa em 198nm e uma banda positiva a 189 nm, em H₂O, mostrando estrutura desordenada. Quando dissolvido em solução aquosa de TFE, ou na presença de bicamadas fosfolipídicas, a banda negativa se deslocou para 205 nm e indícios de formação de uma outra banda negativa, aproximadamente, a 222 nm indicando mudança conformacional de estrutura secundária. Em relação aos padrões de α -hélice (bandas negativas em 208 e 220nm) e folha- β (banda negativa em 214 nm) a Polybine I se caracterizou com hélice.

Realizamos a variação de TFE para mostrar qual seria a porcentagem que estabilizaria a mudança conformacional da estrutura. Estas medidas revelaram que deveria ser utilizada uma porcentagem de 40% de TFE nas amostras que foram usadas no espectrômetro de RMN, pois estas apresentaram estabilidade acima de 40% (Figura 24). A Polybine I obteve uma fração α -hélice de aproximadamente 30% (Tabela 3).

Tabela 3. Dados de Dicroísmo Circular com a elipticidade molar e fração α -hélice.

	Polybine I-não acetilada (50 μ M)	
	$[\Theta]_{222}$	f_H
TFP (pH 6)	-3411,253	0,0960924
TFE (30%)	-7534,970	0,231507
TFE (40 %)	-9151,940	0,284605
TFE (60%)	-10041,300	0,313810
TFE (80%)	-9950,480	0,310828

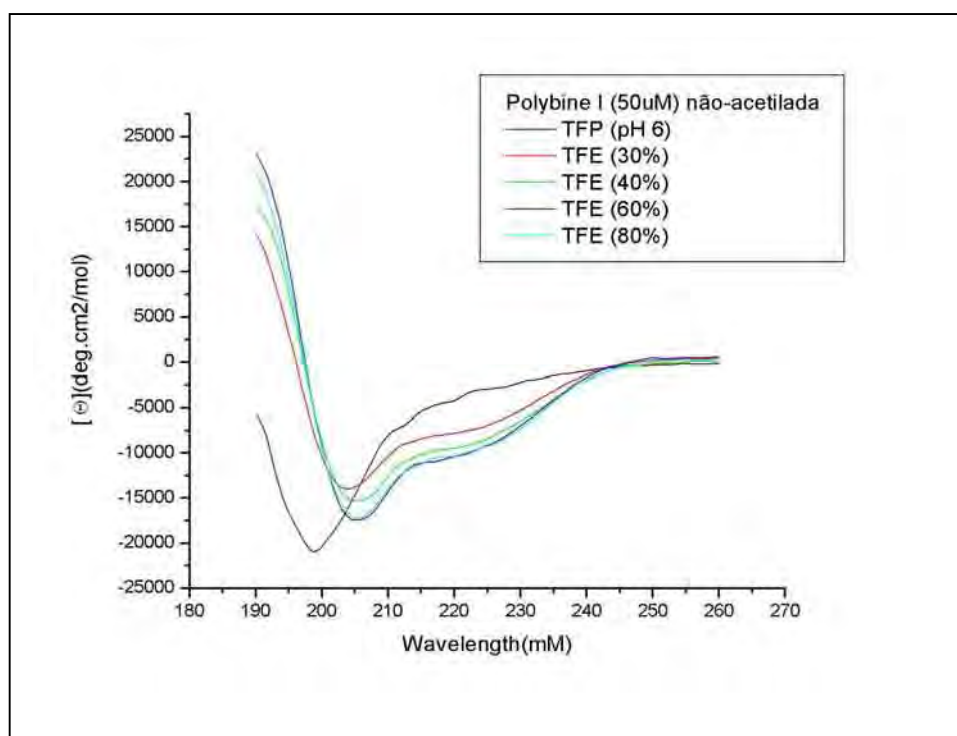


Figura 24: Espectros de CD dos peptídeos Polybiline I na forma não-acetilada em várias concentrações de TFE, Tampão Fosfato de Potássio (10mM), pH 6,0 e temperatura de 25°C.

Para a confirmação das informações obtidas anteriormente em CD, foram coletados espectros 1D-¹H para ambas as formas, acetilada e não-acetilada antes da coleta dos espectros 2D. Os aspectos gerais dos espectros 1D revelaram uma boa estabilidade na estrutura dos peptídeos devido a quantidade e aparência das linhas de ressonância se compararmos com a Figura 8. O espectro 1D da Polybiline I acetilada revelou duplicidade na linha de ressonância no próton HE1(10,1 ppm) do anel do triptofano (Figura 25). Uma análise posterior da amostra acetilada através de espectroscopia de massa, mostrou perda de parte da acetilação da amostra usada na coleta dos espectros de RMN. Conseguimos analisar os dados do espectro da amostra acetilada contendo ambas as formas quando determinamos a porcentagem de perda da amostra acetilada, fazendo uma proporção entre os volumes, no qual revelou aproximadamente 65% de perda de peptídeos acetilados na amostra.

Os primeiros dados analisados foram dos espectros da amostra não-acetilada e posteriormente os espectros com ambas as formas. Inicialmente analisamos os 2D

$[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -COSY, no qual identificamos na região do HN-H α 12 resíduos dentre os 14 da sequência primária da Polybina I não-acetilada. Os resíduos Ser1 e a Pro12 não apresentaram picos nessa região (Figura 26-a), devido a interação da água com o N-terminal da Ser1 e a ausência do NH da Pro12. Mas foi identificado, posteriormente, o próton H $^\alpha$ do resíduo da Pro12 em outra região quando se fez a identificação dos sistemas de spins no espectro 2D $[^1\text{H}-^1\text{H}]$ -TOSCY.

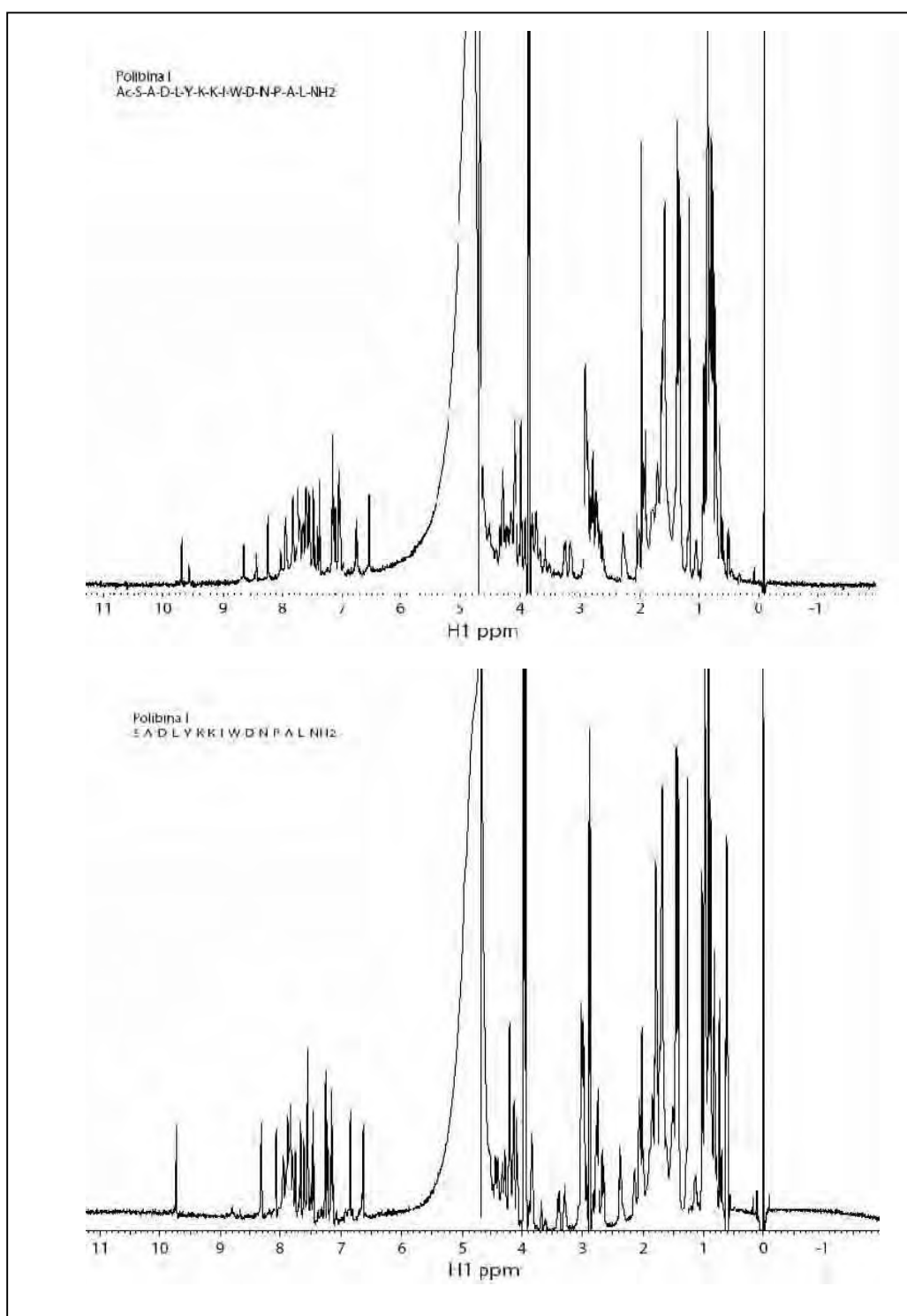


Figura 25: Espectro 1D- ^1H da Polybine I em ambas as formas. Acetilada acima e não-acetilada abaixo em Tampão Fosfato de Potássio, pH 6,0, 1mM a 25° C.

Já no espectro 2D [^1H - ^1H]-COSY contendo as formas acetilada e não acetilada foram identificados na região do HN-H α 16 resíduos (Figura 26-b), aparecendo o resíduo da Ser1 devido ao bloqueio do N-terminal da forma acetilada. No espectro 2D [^1H - ^1H]-TOSCY da figura 27-b é possível verificar a presença das duas formas. Tanto a forma acetilada como a não acetilada apresentaram deslocamentos químicos idênticos nos resíduos Leu4, Asn11 e Ala13 (Figura 27-b) esse resultado pode ser comprovado por picos Noe pela ligação de resíduos com o mesmo sistema de spin, mas que possuem deslocamentos químicos distintos em ambas as formas, por exemplo, a Leu4 se liga a Ala2 da forma acetilada e ao mesmo tempo, também, se liga ao resíduo Asp3 da forma não acetilada na região do HN-H α . O assinalamento dos picos NOE foi realizado no espectro 2D [^1H - ^1H]-NOESY (Figura 28). Foram assinalados no espectro sem acetilação 392 picos e deles 149 vínculos de distância máxima (upl – *upper limit constraints*). E no espectro da amostra acetilada foram assinalados 594 picos, sendo que 110 vínculos para a forma acetilada e 154 para a forma não –acetilada. Essas distâncias extraídas foram usadas no cálculo estrutural.

A perda da acetilação na amostra dificultou o assinalamento da polybine I acetilada, devido a pouca quantidade de picos NOE. Os gráficos da figura 28 mostram que a polybine I não acetilada possui uma quantidade maior de picos, principalmente, seqüenciais se comparado com a forma acetilada. A quantidade de distâncias de longo alcance praticamente não existe, principalmente, pelo tamanho do peptídeo (Figura 29-a).

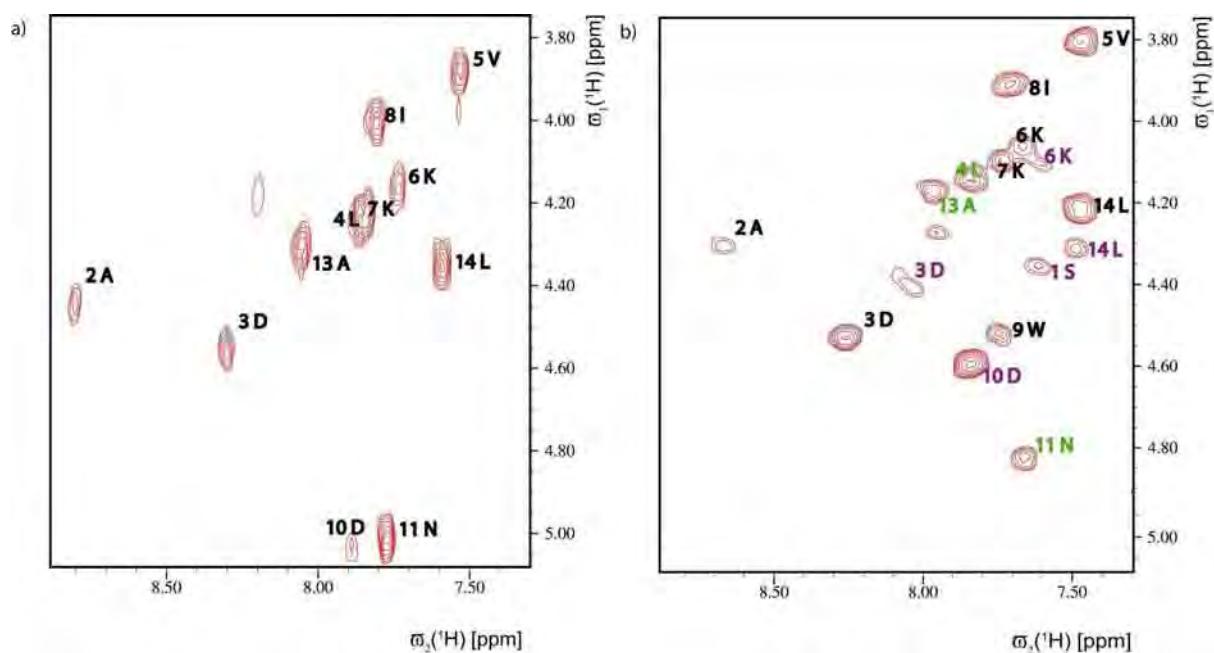


Figura 26: Região HN-H α do espectro 2D [^1H - ^1H]-COSY da Polybine I a 1mM, pH 6,0 a 25°C em TFP a 10 mM. Em amarelo os picos com a forma não acetilada, em lilás a forma acetilada e em verde para ambas as formas. (a) amostra sem acetilação e (b) amostra acetilada.

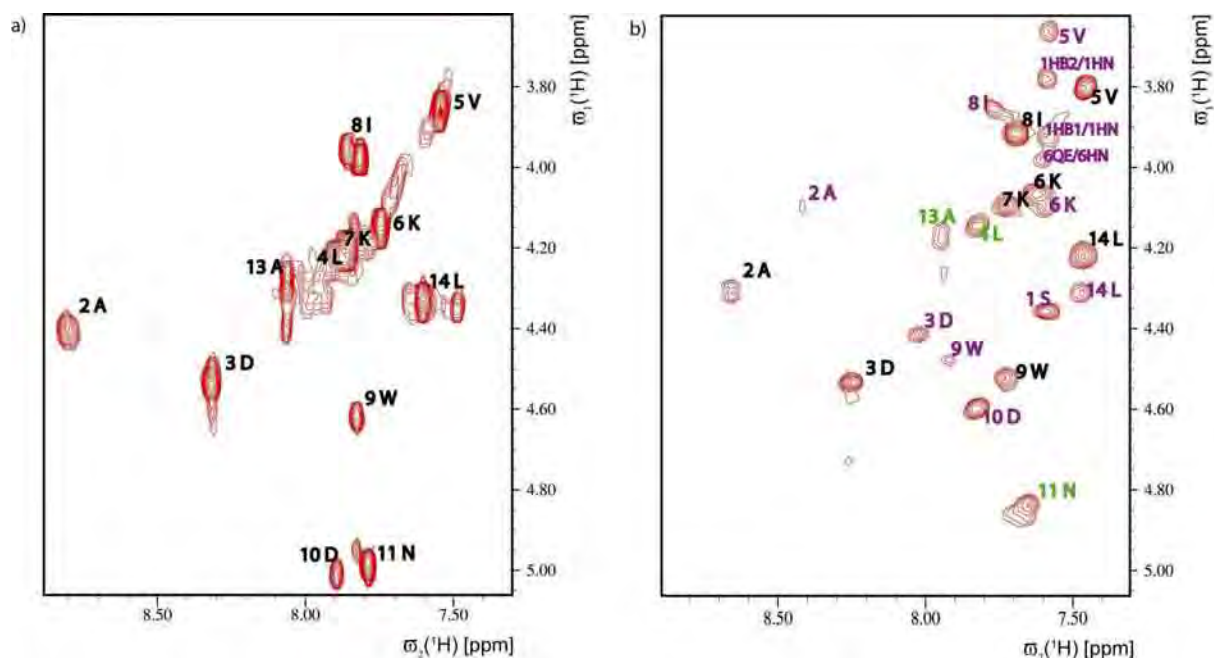


Figura 27: Região HN-H α do espectro 2D [^1H - ^1H]-TOCSY da Polybine I a 1mM, pH 6,0 a 25°C em TFP a 10 mM. Em amarelo os picos com a forma não acetilada, em lilás a forma acetilada e em verde para ambas as formas. (a) amostra sem acetilação e (b) amostra acetilada.

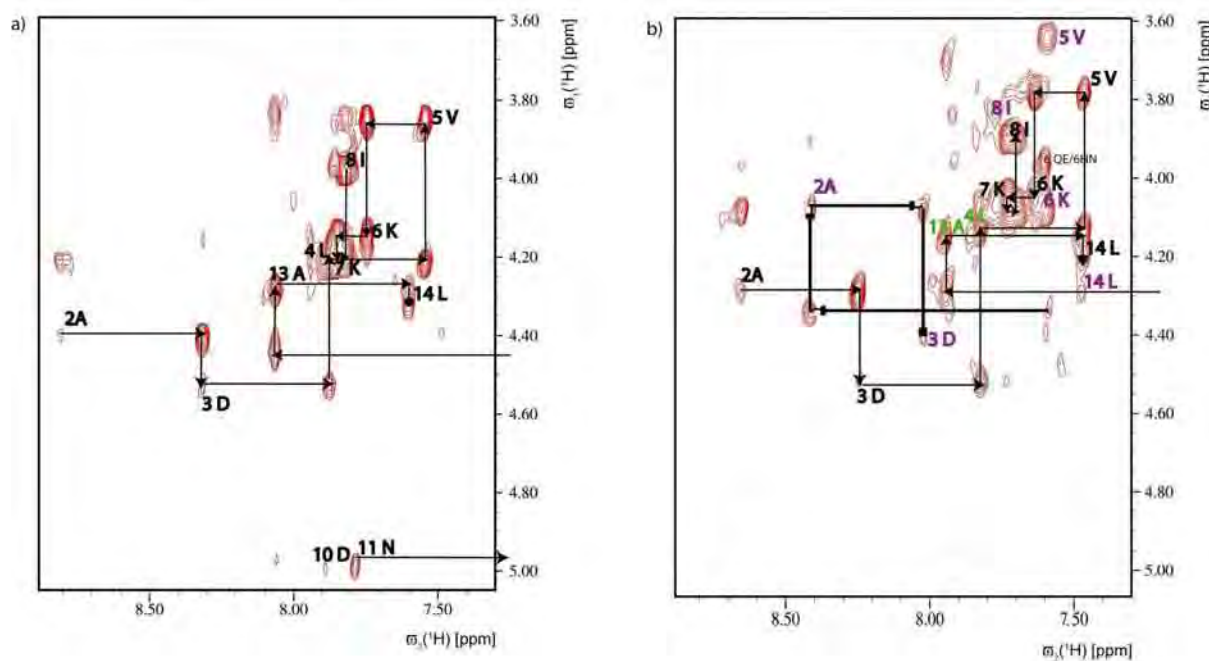


Figura 28: Região HN-H α do espectro 2D [^1H - ^1H]-NOESY da Polybiline I não - acetilada a 1mM, pH 6,0 a 25°C. A sequência de setas demonstra as conexões inter-residuais através do espaço entre o próton ligado ao carbono alfa de um resíduo e o próton ligado ao nitrogênio do resíduo subsequente ($d_{\alpha\text{N}}(i, i+1)$).

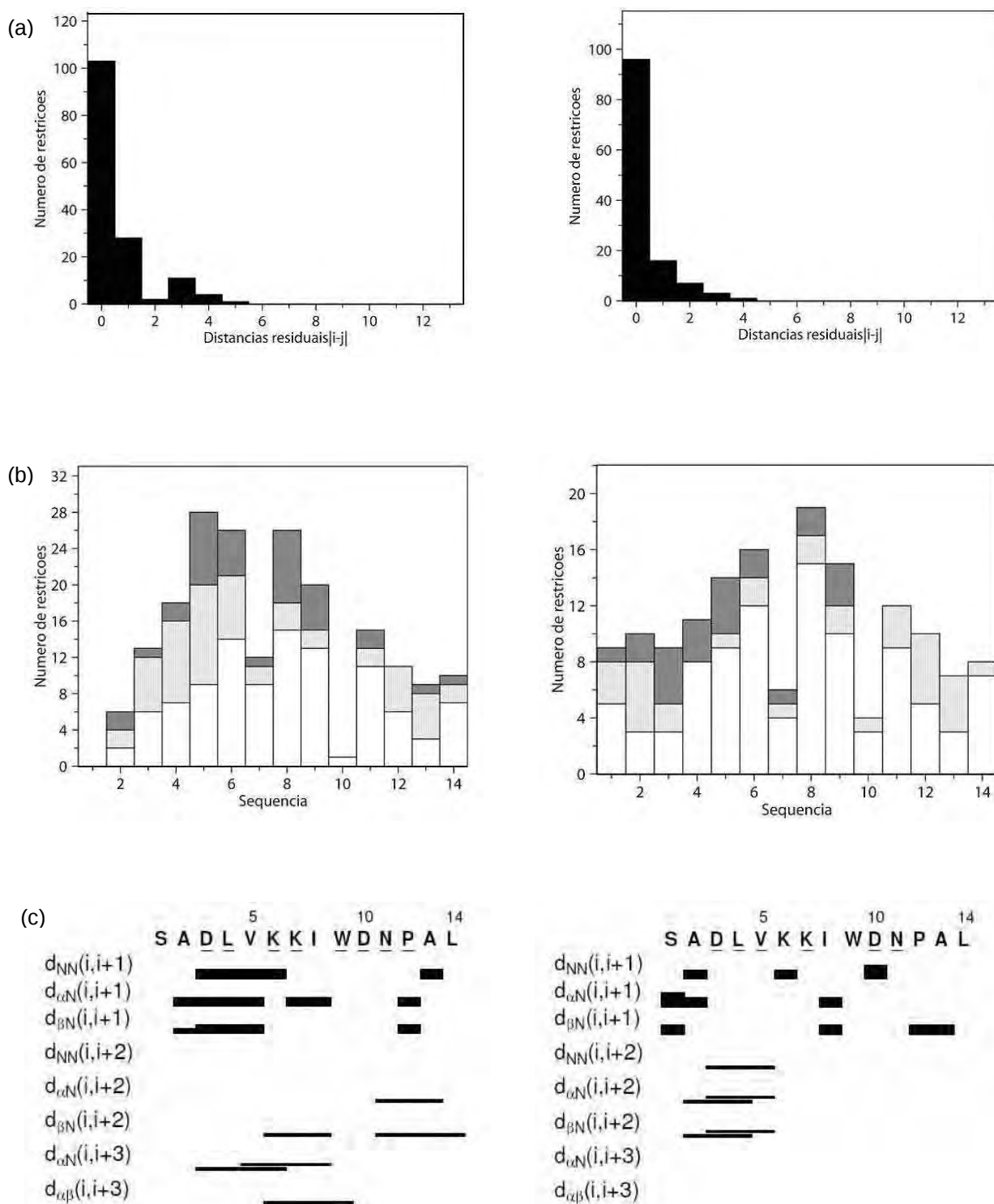


Figura 29: Representação de distâncias NOE: a esquerda contém informações da Polybiline I não-acetilada e a direita da Polybiline I acetilada. (a) representa a distribuição de restrições em função das distâncias NOE, (b) representa a distribuição de restrições em função de cada resíduo; em branco restrições intra-residual, em cinza claro restrições sequenciais, em cinza escuro distâncias residuais (medium-range) e (c) representa os limites de distância superior com distâncias de curto e médio alcance.

O deslocamento químico de cada resíduo poderá ser verificado na tabela 4. Esses deslocamentos químicos nos deram informações de estrutura secundária através do método CSI (*Chemical Shift Index*). De acordo com o protocolo desenvolvido por Wishart *et al* (WISHART *et al*, 1992) os deslocamentos químicos dos prótons- α obtidos dos dados dos espectros da Polybine I menos os deslocamentos químicos padrão ($\Delta\delta$) deram informações de estrutura secundária através de valores fixos: -1, 0, 1. Se a variação for seguida por quatro -1 consecutivos sem interrupção de 1, indicará a presença de hélice. Se o grupo for de 3 ou mais 1 consecutivos sem interrupção por -1 esse terá padrão de fita- β . Os outros grupamentos são considerados como coil. Na Polybine I não acetilada indicou estrutura em coil, enquanto que na Polybine I acetilada os resíduos de 1 a 9 apresentaram hélice, mostrando que a tendência é que a polybine I acetilada seja mais estruturada (Figura 31).

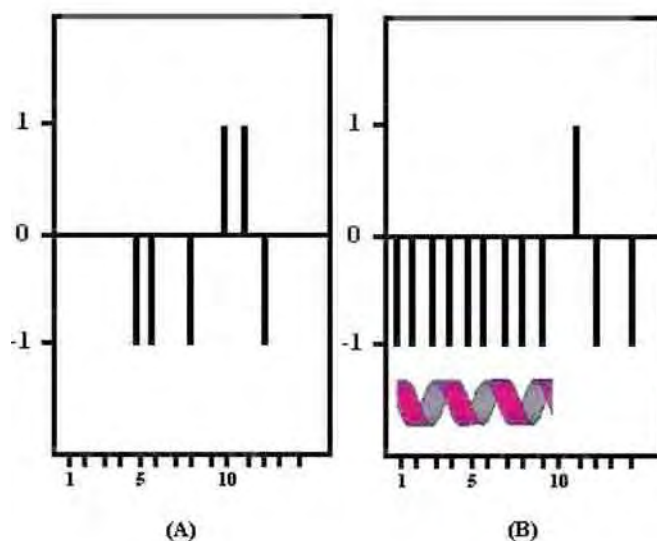


Figura 30: Gráfico da análise dos deslocamentos químicos da Polybine I. (A) Polybine I não acetilada e (B) Polybine I acetilada.

Tabela 4. Lista dos deslocamentos químicos com unidade em ppm dos prótons da Polybline I nas formas não acetilada e acetilada.

			Poly_sa		Poly_ac		
nº do resíduo			δ padrão	δ ₁	δ ₂	Δδ ₁	Δδ ₂
1	Ser	H	8,29	-	7,591	-	-
1	Ser	HA	4,49	-	4,340	-	-0,150
1	Ser	HB2	3,88	-	3,918	-	-
1	Ser	HB3	3,86	-	3,785	-	-
1	Ser	HG	5,33	-	-	-	-
2	Ala	H	8,18	8,802	8,416	-	-
2	Ala	HA	4,26	4,390	4,089	0,130	-0,171
2	Ala	HB	1,37	1,466	1,348	-	-
3	Asp	H	8,32	8,313	8,023	-	-
3	Asp	HA	4,6	4,512	4,398	-0,088	-0,202
3	Asp	HB2	2,73	2,757	2,723	-	-
3	Asp	HB3	2,69	2,658	2,723	-	-
4	Leu	H	8,22	7,872	7,829	-	-
4	Leu	HA	4,31	4,207	4,128	-0,103	-0,182
4	Leu	HB2	1,63	1,694	1,572	-	-
4	Leu	HB3	1,55	1,694	1,572	-	-
4	Leu	HG	1,51	-	-	-	-
4	Leu	HD1	0,77	0,981	0,847	-	-
4	Leu	HD2	0,74	0,920	0,803	-	-
5	Val	H	8,28	7,544	7,597	-	-
5	Val	HA	4,17	3,848	3,655	-0,322	-0,515
5	Val	HB	1,99	2,136	1,994	-	-
5	Val	HG1	0,84	1,025	0,925	-	-
5	Val	HG2	0,82	0,928	0,801	-	-
6	Lys	H	8,19	7,743	7,603	-	-
6	Lys	HA	4,27	4,138	4,078	-0,132	-0,192
6	Lys	HB2	1,78	1,860	1,799	-	-
6	Lys	HB3	1,76	1,722	1,640	-	-
6	Lys	HG2	1,38	1,465	1,475	-	-
6	Lys	HG3	1,36	1,465	1,344	-	-
6	Lys	HD2	1,61	1,538	-	-	-
6	Lys	HD3	1,6	1,538	-	-	-
6	Lys	HE2	2,92	3,010	3,975	-	-
6	Lys	HE3	2,92	3,010	3,976	-	-
6	Lys	HZ	7,49	-	-	-	-
7	Lys	H	8,19	7,850	7,778	-	-
7	Lys	HA	4,27	4,192	4,073	-0,078	-0,197
7	Lys	HB2	1,78	1,829	1,771	-	-
7	Lys	HB3	1,76	1,691	1,662	-	-
7	Lys	HG2	1,38	1,449	1,465	-	-
7	Lys	HG3	1,36	1,449	1,466	-	-
7	Lys	HD2	1,61	1,509	-	-	-
7	Lys	HD3	1,6	1,509	-	-	-
7	Lys	HE2	2,92	2,983	-	-	-
7	Lys	HE3	2,92	2,983	-	-	-
				Poly_sa	Poly_ac		

nº do resíduo			δ padrão	δ ₁	δ ₂	Δδ ₁	Δδ ₂
7	Lys	HZ	7,49	-		-	-
8	Ile	H	8,28	7,820	7,771	-	-
8	Ile	HA	4,18	3,969	3,843	-0,211	-0,337
8	Ile	HB	1,8	1,847	1,786	-	-
8	Ile	HG12	1,18	1,131	-	-	-
8	Ile	HG13	1,23	1,517	-	-	-
8	Ile	HG2	0,8	0,828	-	-	-
8	Ile	HD1	0,69	0,728	0,703 e 0,590	-	-
9	Trp	H	8,28	7,824	7,922	-	-
9	Trp	HA	4,7	4,605	4,472	-0,095	-0,228
9	Trp	HB2	3,2	3,383	3,270	-	-
9	Trp	HB3	3,15	3,291	3,166	-	-
9	Trp	HD1	7,15	7,256	7,148	-	-
9	Trp	HE1	10,1	9,726	9,568	-	-
9	Trp	HE3	7,34	7,658	7,825	-	-
9	Trp	HZ2	7,29	7,455	7,330	-	-
9	Trp	HZ3	6,87	7,145	7,453	-	-
9	Trp	HH2	7	7,218	-	-	-
10	Asp	H	8,32	7,891	7,826	-	-
10	Asp	HA	4,6	4,978	4,603	0,378	0,003
10	Asp	HB2	2,73	2,815	2,698	-	-
10	Asp	HB3	2,69	2,815	2,633	-	-
11	Asn	H	8,35	7,787	7,662	-	-
11	Asn	HA	4,68	4,964	4,810	0,284	0,130
11	Asn	HB2	2,81	2,940	2,813	-	-
11	Asn	HB3	2,77	2,761	2,622	-	-
11	Asn	HD21	7,32	7,549	7,394	-	-
11	Asn	HD22	7,16	6,643	6,522	-	-
12	Pro	H2	8,51	-	-	-	-
12	Pro	HA	4,39	4,428	4,838	0,038	0,448
12	Pro	HB2	2,07	2,366	2,205	-	-
12	Pro	HB3	2,03	2,046	1,913	-	-
12	Pro	HG2	1,93	-	2,202	-	-
12	Pro	HG3	1,91	-	2,202	-	-
12	Pro	HD2	3,64	3,887	4,347	-	-
12	Pro	HD3	3,62	3,828	3,773	-	-
13	Ala	H	8,18	8,059	7,946	-	-
13	Ala	HA	4,26	4,273	4,156	0,013	-0,104
13	Ala	HB	1,37	1,429	1,310	-	-
14	Leu	H	8,22	7,643	7,475	-	-
14	Leu	HA	4,31	4,313	4,291	0,003	-0,019
14	Leu	HB2	1,63	1,756	1,577	-	-
14	Leu	HB3	1,55	1,648	1,508	-	-
14	Leu	HG	1,51	1,427	-	-	-
14	Leu	HD1	0,77	0,885	-	-	-
14	Leu	HD2	0,74	0,885	0,781	-	-

Realizou-se através do programa CNS o cálculo de 100 modelos para cada peptídeo, os quais foram submetidos a um processo de minimização de energia, obtendo 10 confôrmeros que foram superpostos utilizando o programa MOLMOL. As estruturas finais de ambas as formas da Polybine I apresentaram um N-terminal rígido, enquanto o C-terminal permaneceu desestruturado pela presença dos resíduos Asn11 e Pro12. A asparagina tem uma cadeia lateral curta que contém átomos eletronegativos como N e O, podendo formar ligações de hidrogênio com os átomos eletronegativos da cadeia principal, impedindo assim, possíveis pontes de hidrogênio (i, i+4), que estabilizam uma hélice e a prolina, devido à sua estrutura cíclica, quebra a seqüência das α -hélices. As estruturas em ambas as formas apresentaram, dentre os 10 confôrmeros superpostos, pequena volta nos resíduos de 5 a 8, fazendo uma ligação de prótons i, i+4, indicando volta de α -hélice.

Tabela 5. Caracterização do conjunto das 10 estruturas da Polybine I acetilada e não-acetilada. O cálculo e a minimização foram realizados com o programa CNS.

	Polybine I não-acetilado	Polybine I acetilado
Distâncias NOE	149	110
Violações NOE > 0,2	1	4
RMSD para os átomos da cadeia principal	2,97,±0,83 Å	2,75±0,67 Å
RMSD para os átomos pesados	4,05±0,97 Å	4,33±0,97 Å
RMSD da cadeia principal dos resíduos de 2 a 10.	0,95±0,32 Å	0,90±0,41 Å
RMSD dos átomos pesados dos resíduos de 2 a 10.	2,17±0,53 Å	2,41±0,75 Å
Energias (kcal/mol ⁻¹)		
Total	77,6±8,9	112,8±5,6
Ligação	3,2±0,45	6,5±0,6
Ângulo	29,3±4,4	30,1±2,6
Impropia	2,1±0,7	1,85±0,4
Van der Waals	22,8±4,5	27,65±2,5
NOE	20,2±2,5	46,6±4,3

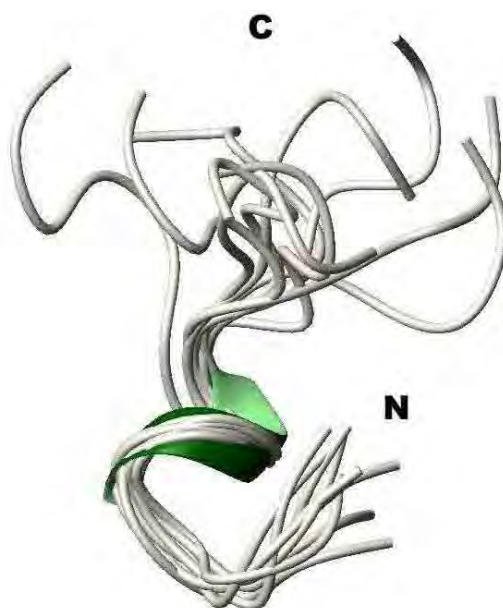
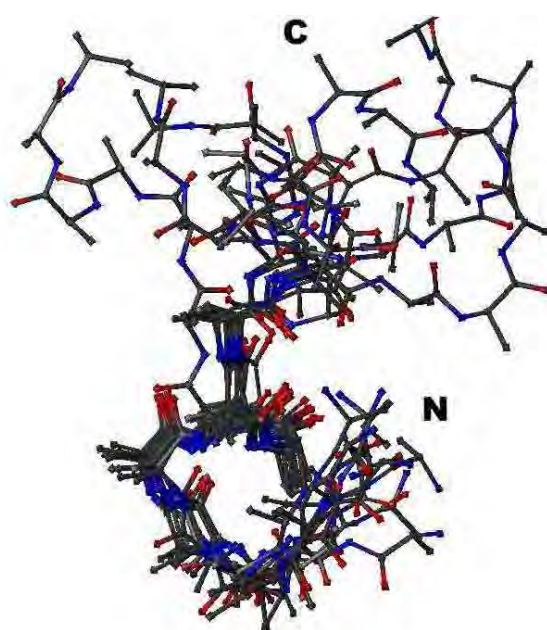


Figura 31. Modelo estrutural da superposição de 10 confôrmeros da polybion I na forma não-acetilada. A estrutura acima representa os átomos da cadeia principal e os átomos C β da cadeia lateral e abaixo a estrutura em **ribbons**.

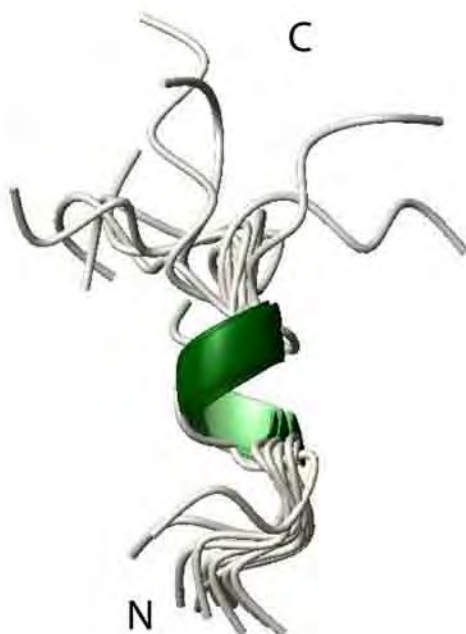
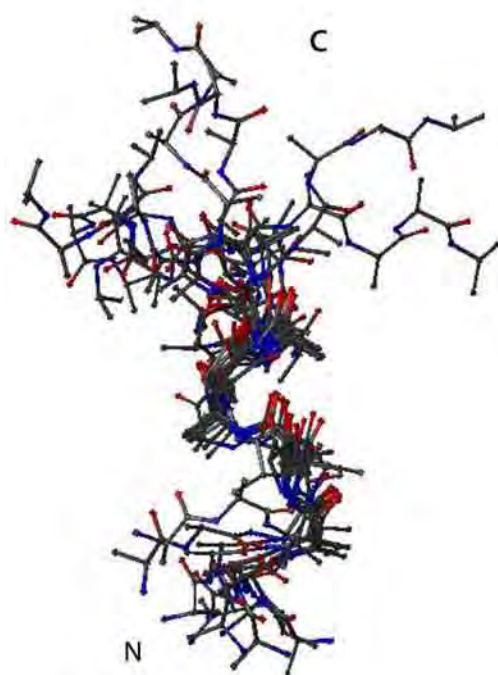


Figura 32. Modelo estrutural da superposição de 10 confôrmeros da polybionin I na forma acetilada. A estrutura acima representa os átomos da cadeia principal e os átomos C β da cadeia lateral e abaixo a estrutura em **ribbons**.

Foram resolvidas duas estruturas para a Polybine I não acetilada, uma da amostra não acetilada e a outra da amostra acetilada, cada uma com 10 confôrmeros superpostos representando a estrutura. Esses dois grupamentos não tiveram distinção entre eles. Num desses grupos apareceu hélice em um dos confôrmeros, as outras permaneceram com conformação em **coil**, no entanto, identificamos uma possível ligação de ponte de hidrogênio entre o carbono do resíduo Leu4 e o nitrogênio do resíduo Ile8 com uma distância média de 2,48 Å (padrão-2,5 a 3,5 Å). Já na Polybine I acetilada também foi feita a superposição de 10 confôrmeros em que 50 % apresentaram hélice. Esse resultado nos sugere que a forma nativa da Polybine I com os seus terminais bloqueados seja mais estável do que somente como o C-terminal amidado. Esse resultado também foi comentado anteriormente na análise de estrutura secundária analisando os deslocamentos químicos.

Para a confirmação desses resultados o aluno de doutorado Carlos Emídio, do Departamento de Física da Unesp de São José do Rio Preto, realizou estudos por dinâmica molecular.

A dinâmica molecular foi feita com o intuito de reproduzir as condições experimentais: numa caixa contendo TFE e água na proporção de 40/60%, o peptídeo foi simulado nas condições não acetilado e acetilado, partindo, para cada uma dessas condições, de uma hélice Ideal e da estrutura calculada por ressonância magnética obtidos neste trabalho, representado pelo pdb de mínima energia dentre os 10 confôrmeros calculados. Simulamos a presença de um banho térmico a 300K através do acoplamento de temperatura *berendsen* e a pressão também foi mantida constante, em 1 atm. Conflitos estéricos iniciais nas configurações iniciais foram removidos através de uma minimização de energia com 1000 passos de *steepest descent*. A posição dos solventes foi reajustada antes da

dinâmica molecular com uma dinâmica de restrição de posição (50 ps) no peptídeo. A dinâmica de produção, em que observamos as mudanças conformacionais tiveram 3000 ps de duração, usando campo de força do *gromos 45a3* e as interações de longa-distância corrigidas com campo de reação.

Os resultados de dinâmica nos mostraram que realmente a polybine I não acetilada não possui estabilidade na sua estrutura variando sempre na formação de hélice e coil em todo o tempo de dinâmica mesmo partindo de uma estrutura totalmente em hélice. Em relação a Polybine I acetilada a formação de hélice foi conservada em todo o tempo de dinâmica para ambas as condições.

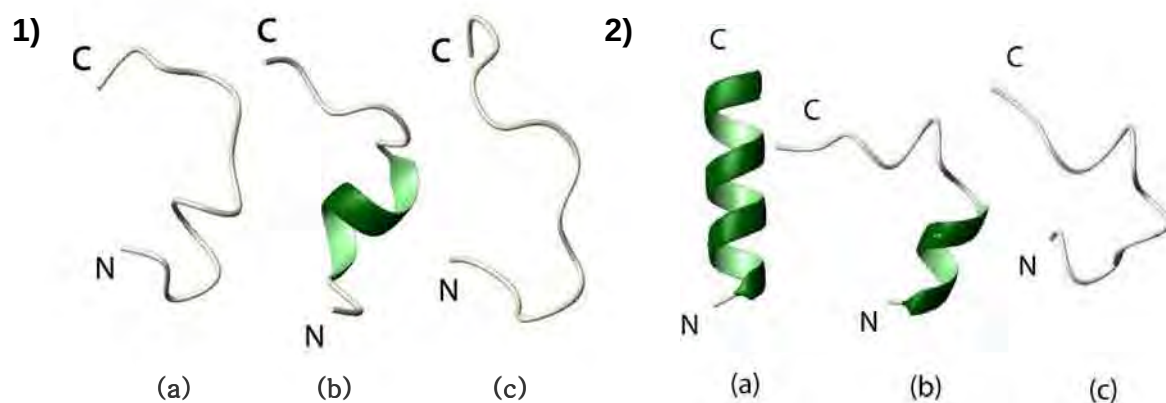


Figura 33. Modelo estrutural da dinâmica molecular da Polybiline I não - acetilada em tempos diferentes. (1) representa a dinâmica molecular partindo do pdb dos dados de RMN e (2) representa a dinâmica molecular de uma hélice perfeita. (a) 0ns, (b) 1ns e (c) 3ns.

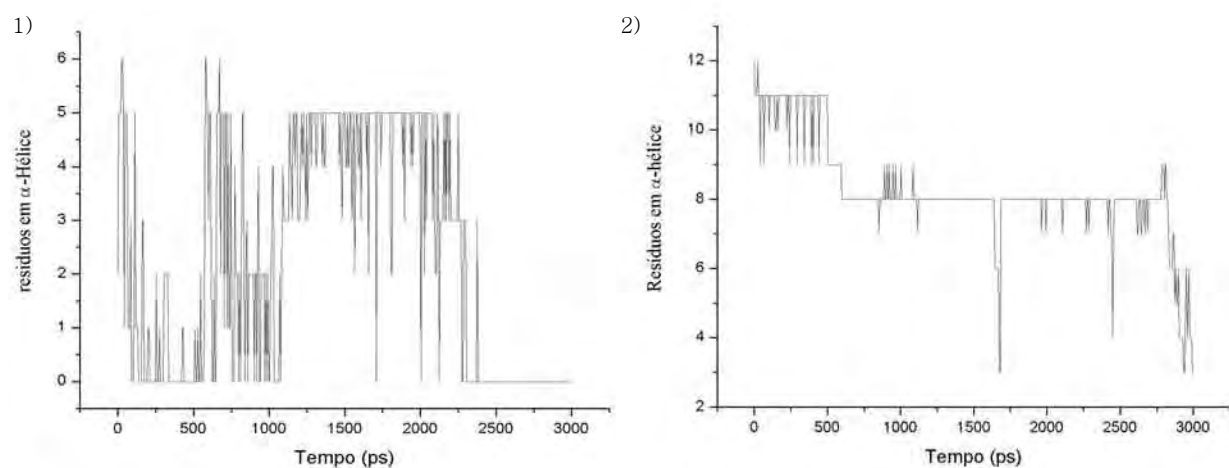


Figura 34. Representa os gráficos dos resíduos em α -hélice pelo tempo de dinâmica molecular da Polybiline I não acetilada. (1) representa a dinâmica molecular partindo do pdb dos dados de RMN e (2) representa a dinâmica molecular de uma hélice perfeita.

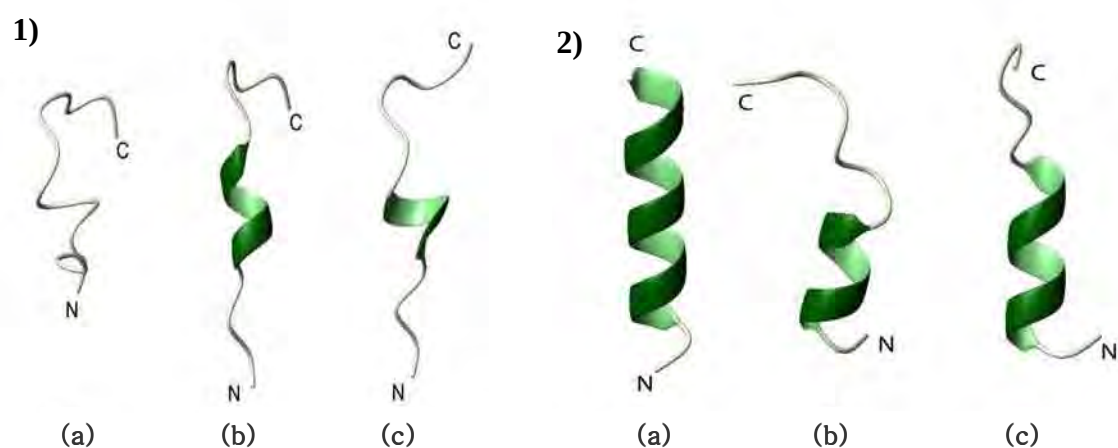


Figura 35. Modelo estrutural da dinâmica molecular da Polybione I acetilada em tempos diferentes. (1) representa a dinâmica molecular partindo do pdb dos dados de RMN e (2) representa a dinâmica molecular de uma hélice perfeita. (a)0ns, (b) 1ns e (c) 3ns.

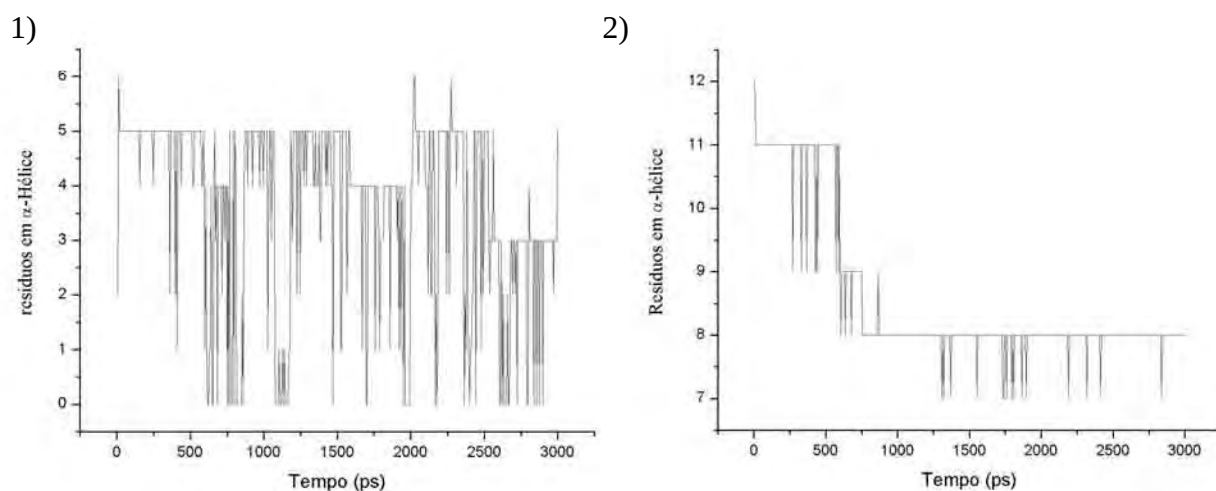


Figura 36. Representa os gráficos dos resíduos em α -hélice pelo tempo de dinâmica molecular da Polybione I acetilada. (1) representa a dinâmica molecular partindo do pdb dos dados de RMN e (2) representa a dinâmica molecular de uma hélice perfeita.

6-Conclusão

A descoberta de uma nova família de peptídeos policationicos, os Polybine, despertou uma curiosidade entre esse tipo de peptídeo, devido ao bloqueio do N-terminal com acetil. Dentre essas toxinas é muito rara a ocorrência de modificações químicas do grupo α -amino do N-terminal, geralmente por essas toxinas possuírem somente o C-terminal amidado. Esses peptídeos, no entanto, apresentam na sua forma nativa os dois terminais bloqueados e possuem um poder de degranulação de mastócitos e quimiotático superior ao peptídeo sintético com somente o C-terminal bloqueado. Há um grande interesse em compreendermos a razão pela qual esse fenômeno acontece, podendo se revelar um grande potencial para a atividade inflamatória. Portanto a proposta desse projeto de mestrado foi resolver as estruturas nas formas acetilada e não acetilada através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e observar estas duas formas.

A técnica de dicroísmo circular utilizada como complemento nos revelou uma média de 30% de formação de fração de hélice. E se compararmos esses resultados com os obtidos em RMN (28,6%), se observa similaridade, mostrando coerência de resultados entre as duas técnicas. Em relação ao poder de ação biológico da polybine I acetilada, sugerimos que isso ocorra devido a uma maior estabilidade conformacional, sendo que o conjunto de confôrmeros apresentou voltas de α -hélice (50%) do modelo que representa a estrutura. A estrutura não acetilada apresentou em sua maioria, confôrmeros em coil mostrando menor estabilidade na estrutura.

E possível sugerir também, que o grau de estabilidade dessas estruturas esteja relacionada a interações de resíduos carregados da sequência primaria. Os resíduos carregados podem tanto estabilizar a hélice como desestabilizá-la,

dependendo da posição que se encontram pode haver formação de ponte salina ou não (MARQUESE & BALDWIN, 1987). No caso da polybine I a pouca formação de α -hélice (resíduos 5 a 8) pode estar ligado a esses resíduos carregados. Na sequência primária da Polybine I existem os seguintes resíduos carregados: Asp 3 e 10, Lys6 e 7, no qual a formação de ponte salina desses resíduos acontecem quando possuem as seguintes posições $i, i+3$ ou $i, i+4$ para ponte salina simples e para ponte salina formando um triplete as posições $i+4, i+8$ ou $i+3, i+6$ na estrutura secundária (IQBALSYAH & DOIG, 2005). Portanto a Polybine I tem tendência a formação de ponte salina, mas na análise das estruturas observamos que a uma disputa entre as Lisinas na interação com o Aspartato. Se observarmos a figura 30 podemos perceber que a formação de hélice é bem maior do que o modelo de estrutura representado pelos confôrmeros nas figuras 31 e 32. Podemos sugerir, então, que as posições das lisinas possam estar desestabilizando a formação de hélice entre os resíduos de 1 a 10.

7-Bibliografia

AUE, W.P., BATHOLDI, E., ERNST, R.R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. J. Chem. Phys. (1976); 64:2229 –46.

BARTELS, C., XIA, T.H., BILLETER, M., GÜNTERT, P. & WUTHIRICH, K. The program XEASY for computer-supported NMR-spectral analysis of biological macromolecules. J. Biomo. NMR. (1995); 6:1-10.

BAX, A., DAVIS, D.G. J. Magn. Reson. (1985); 63: 207-213.

BRUNGER, A.T. *et al.* Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.* (1998) D, 54:905-921.

CAVANAGH, J. Protein NMR spectroscopy: principles and practice. San Diego: Academic Press, 1996.

CHUANG, C.C., HUANG, W.C., YU, H.M., WANG, K.T. & WU, S.H. Conformation of *Vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. BBA (1996); 292:1-8.

FADEL, V. Estrutura tridimensional da crotamina extraída do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* utilizando ressonância magnética nuclear. São José do Rio Preto, 2003. 99p. Tese (doutorado em biofísica Molecular) – IBILCE –UNESP.

FERRY, X., BREHIN, S., KAMEL, R. & LANDRY, Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides* (2002); 23:1507-15.

GRIESINGER, C., OTTING, G., WÜTHICH, K. & ERNST, R.R. Clean-TOCSY for ¹H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* (1996); 110: 7870-7872.

GÜNTERT, P. Struture calculation of biological macromolecules from NMR data. Q Rev. Biophys. (1998); 31(2): 145-237.

GÜNTERT, P., MUMENTHALER, C. & WÜTHRICH, K. Torsion angle dynamics for NMR struture calculation with the new program DYANA. J. Mol. Biol. (1998); 31(2): 145-237.

HIGASHIJIMA, T., BURNIER J. & ROSS E.M. Regulation of Gi and G0 by mastoparan related peptides and hydrophilic amines. J Biol Chem. (1990) ;265:14176–86.

HIGASHIJIMA, T., UZU, S., NAKAJIMA, T. & ROSS E.M. Mastoparan a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). J Biol Chem. (1988); 263:6491–94.

IQBALSYAH, T. M. & DOIG, A. J. Anticooperativity in a Glu-Lys-Glu Salt Bridge Triplet in an Isolated α -Helical Peptide. Biochemistry. (2005); 44:10449-56.

JOHNSON, B.A. & BLEVINS, R.A. J. Biomo. NMR. (1994);4: 603 –614.

JONES, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol. (1999); 292:195-202.

KALBITZER H.R., HENGSTENBERG W., The solution structure of the histidine-containing protein (HPr) from *Staphylococcus aureus* as determined by two-dimensional two-dimensional ^1H NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem. (1993); 216:205-14.

KHIAV, B.E., MOUSLI, M., BRONNER, C. & LANDRY, Y. Human and rat cutaneous mast cells: involvement of a G protein in the response to peptidergic stimuli. EJP (1995); 272: 97-102.

KORADI, R., BILLETER, M. & WUTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. J. Mol. Graph.(1996); 14(1): 51-55.

LORENZ D, WIESNER B, ZIPPER J, WINKLER A, KRAUSE E, BEYERMANN M, et al. Mechanism of peptide-induced mast cell degranulation translocation and Patch-Clamp Studies. J Gen Physiol(1998); 112:577–591.

LORENZI, C., C., B. Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias. São José do Rio Preto, 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – IBILCE – Unesp.

MARQUESE, S. & BALDWIN, R. Helix stabilization by $\text{Glu}^-\dots\text{Lys}^+$ salt bridges in short peptides of de novo design. Proc. Natl. Acad. Sci. (1987); 84:8898-8902.

MISHRA, V.K., PALGUNCHARI, M.N., ANANTHARAMAIAH, G.M., JONES, M.K., SEGREST, J.P., KRISHNA, N.R. Solution NMR structure of a model classA (apolipoprotein) amphipathic α helical peptide. Peptides (2001); 22:567-573.

MOUSLI, M., BUEB, J.W., BRONNER, C., ROUOT, B. & LANDRY, Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. TIPS (1990); 11: 358-62.

PEREIRA, A.M. Problemas com Abelhas e Vespas nas Áreas Urbanas. Disponível em < [http:// www.rc.unesp.br/ib/ceis/Andrigo.pdf](http://www.rc.unesp.br/ib/ceis/Andrigo.pdf). Acesso em: 11 fev. 2005.

RANCE, M., SØRENSEN, O. W., BODENHAUSEN, G., WAGNER, G., ERNST, R. R. & WÜTHRICH, K. Improved spectral resolution in cosy ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. Biochem. Biophys. Res. Commun. . (1983); 117(2): 479-485.

REGITZE, R., VOLD, R. SCOTT, P. & DEESE, A.J. Isotropic solutions of phospholipid bicelles: A new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. J Bio NMR (1997); 9:329-335.

RIBEIRO, S. P., MENDES, M. A., SANTOS, L. D., SOUZA, B. M. & et al. Structural and functional characterization of N-terminally blocked peptides isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Peptides (2004); 25: 2069-2078.

SHOEMAKER, K.R., KIM, P.S, BREMS, D.N, MARQUSEE, S, YORK, E.J. & et al. Nature of the charged-group effect on the stability of the C-peptide helix. Biochemistry (1985); 82:2349-2353.

SOLOMONS, T.W. Química Orgânica: tradução: Horacio Macedo. 2v. Rio de Janeiro. LTC.1996.

SOUZA, B., M. Peptídeos policationicos do veneno de *Polubia paulista*(Hymenoptera, Polistinae): estrutura e função. Rio Claro, 2002.120p. .
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Unesp.

VEN, F. J. M. V. D. Multidimensional NMR in liquids : basic principles and experimental methods. New York: Wiley-VCH, 1995.

VOET, D., VOET, J.G. & PRATT, C.W. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artmed,2000.

VOLD, R.R., PROSSER, R.S. & DEESE, A.J. Isotropic solutions of phospholipid bicelles: A new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. J-Bio NMR (1997); 9:329-335.

WALLJE, E.B., ANDERSSON, A., GRÄSLUND, A. & MÄLER, L. NMR solution structure and position of transportan in neutral phospholipid bicelles. FEBS Letters (2004); 567: 265-269.

WIDER, G., MACURA, S., KUMAR, A., ERNST, R.R. & WÜTHRICH, K. Homonuclear Two-Dimensional ^1H NMR of Proteins. Experimental Procedures. J. Magn. Reson. (1984); 56: 207-234.

WISHART, D. S., SYKES, B. D. & RICHARDS, M. F. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy. Biochemistry. (1992); 31: 1647-51.

WÜTHRICH, K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York: Wiley, 1986.

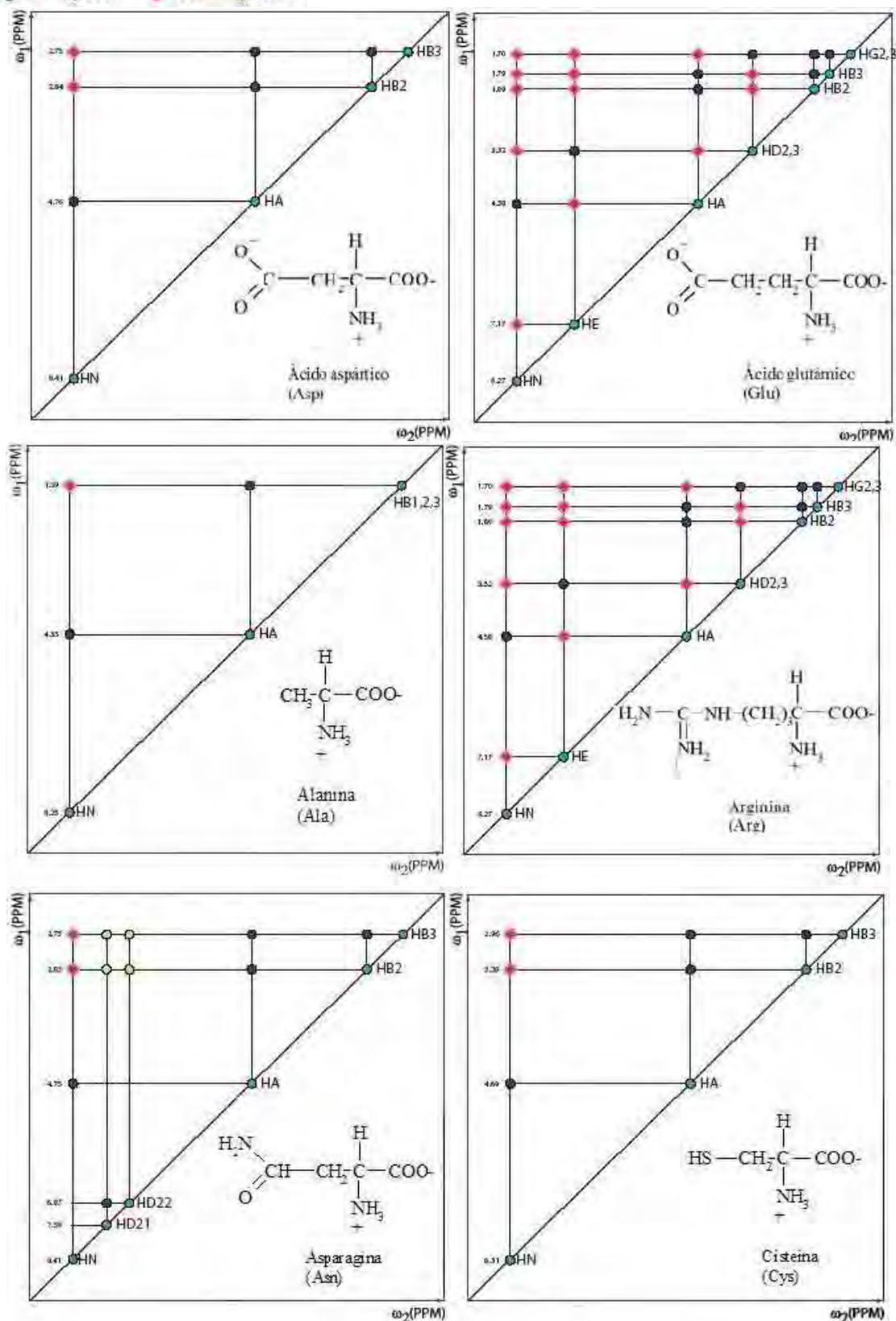
YU, K., KANG, S., PARK, N., SHIN, J. & KIM, Y. Relationship between the tertiary structures of mastoparan B and its analogs and their lytic activities studied by NMR spectroscopy. J. Peptide Res. (2000); 55:51-62.

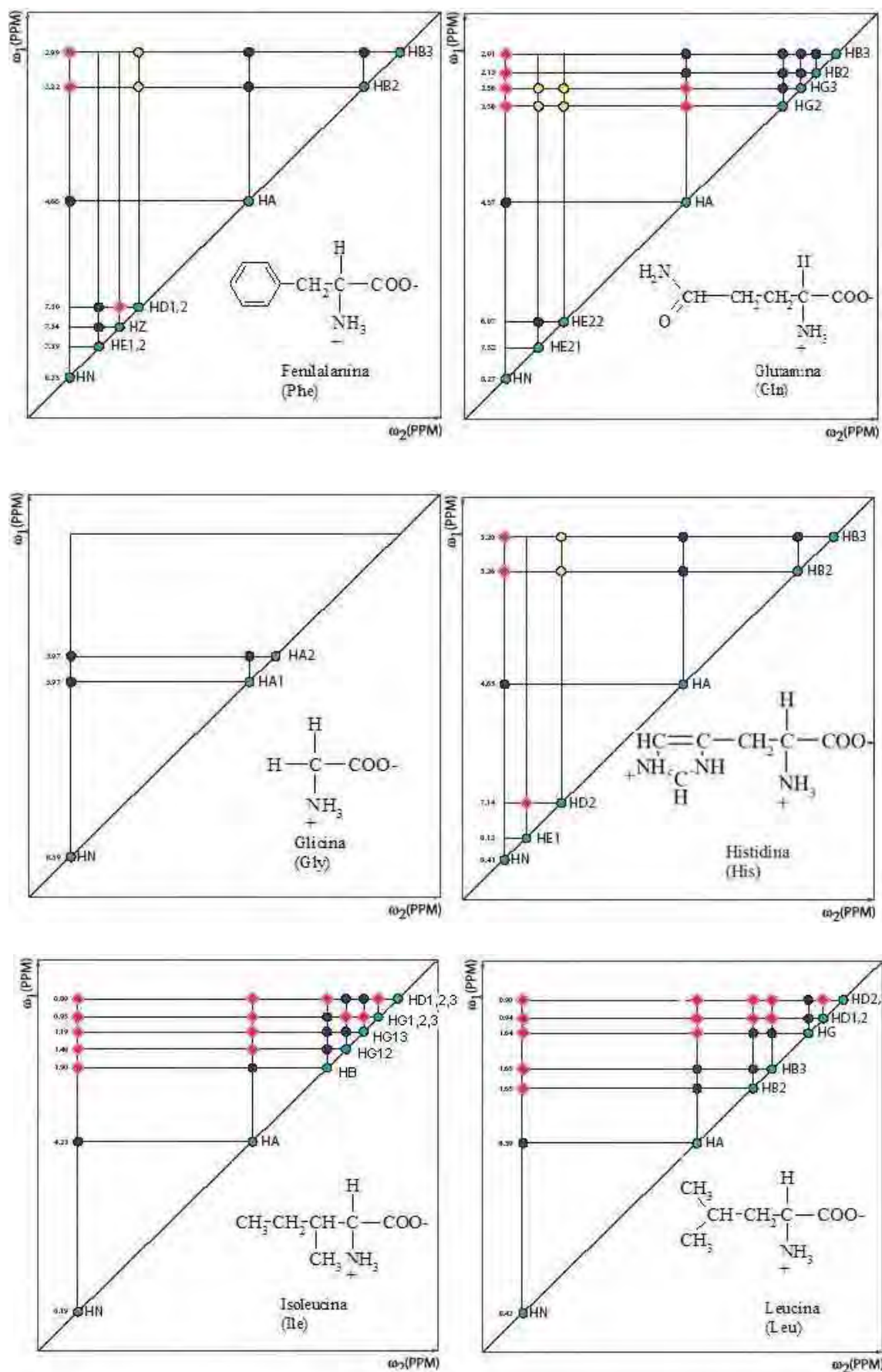
ZERBE, O. Basics of NMR. Disponível em <
<http://pout.phol.cwru.edu/~frank/courses/course.html>>. Acesso em 15 de fevereiro de 2005.

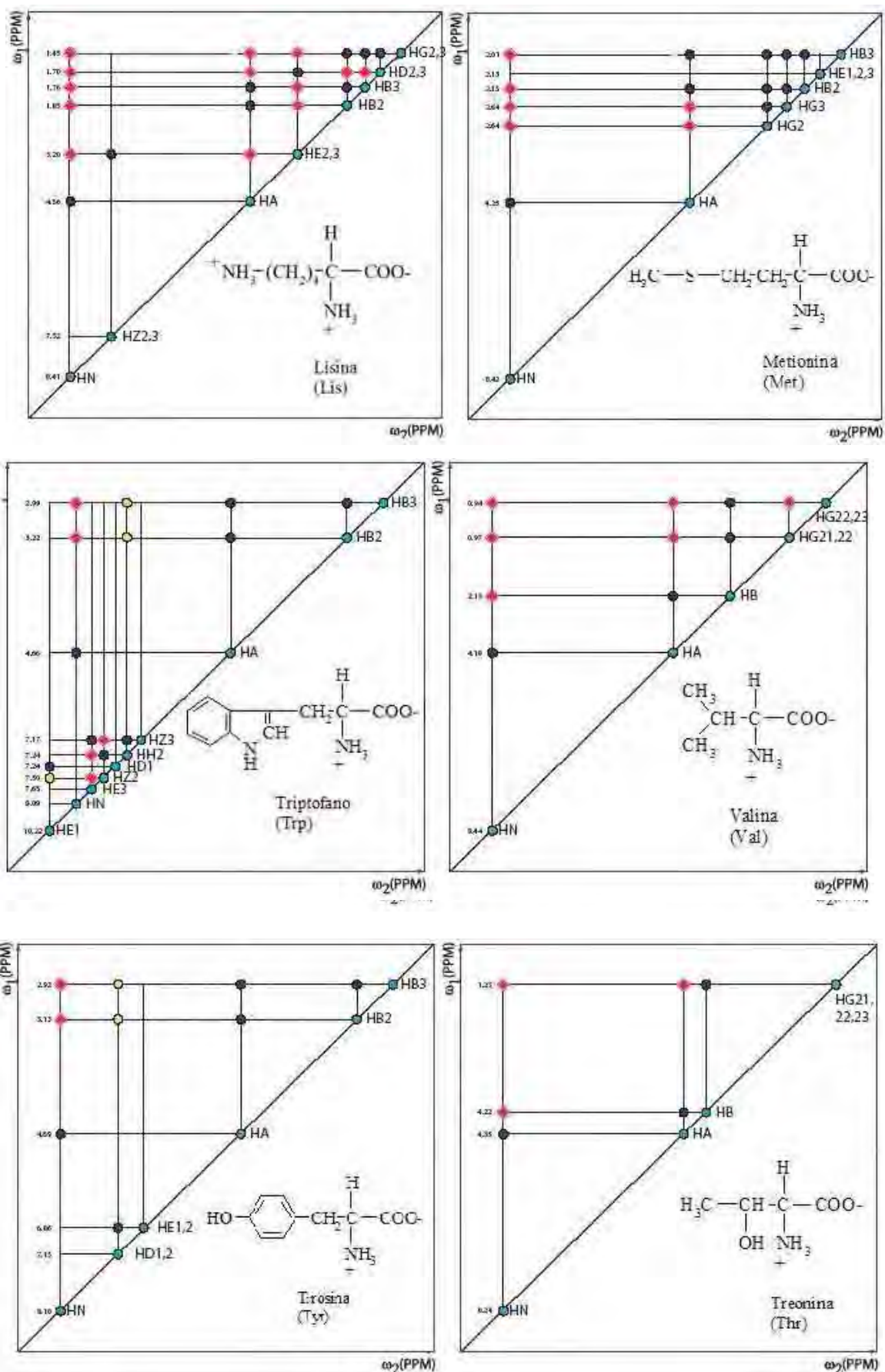
APÊNDICE A

Padrões de Espectros Tocsy para os 20 aminoácidos

diagonal COSY TOCSY NOESY







APÊNDICE B

Transformada de Fourier (Zerbe, 2005)

A intensidade do sinal captado pelo receptor está representada por números em relação ao tempo, mas são convertidos para um espectro que possui a intensidade do sinal no domínio da frequência e para isso é preciso usar a transformada de Fourier.

A teoria da Transformada de Fourier determina que cada função periódica pode ser decomposta numa série de funções seno e co-seno de frequências diferentes:

$$f(x) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} b_n \operatorname{senn} x + \sum_{n=1}^{\infty} a_n \cos nx$$

A decomposição de Fourier demonstra que frequências estão presentes com uma certa intensidade. Usando a integral da equação abaixo:

$$f(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} [a(t) \cos(\omega t) + b(t) \operatorname{sen}(\omega t)] dt$$

$$a(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \cos(tx) dx$$

$$b(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \operatorname{sen}(tx) dx$$

e utilizando a relação de Euler pode-se reescrever como:

$$f(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt$$

Esta é a forma para transformar a função do sinal $f(t)$ de uma ressonância num espectro $f(\omega)$. A transformada de Fourier é indicada por duas funções de

entrada ortogonal chamada de componente real e imaginária. A detecção de ambas as magnetizações é chamada de detecção de quadratura.

$$\begin{aligned}\int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{i\omega t} dt &= \text{Re}[f(\omega)] + i\text{Im}[f(\omega)] \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} f(t)\cos \omega t dt + i \int_{-\infty}^{\infty} f(t)\sin \omega t dt\end{aligned}$$

O sinal de FT-RMN é amostrado como pontos discretos agora podendo ser utilizado num espectro.

$$f_n = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{K=0}^{N-1} d_k e^{\frac{-2\pi i k n}{N}}$$

APÊNDICE C

NMRView para Espectroscopia Homonuclear

(Assinalamento das ressonâncias)

NMRView é um programa com plataforma UNIX e linux para visualizar e analisar os dados obtidos através de medidas de RMN. Foi escrito pelo Dr. Bruce Johnson nos Laboratórios de pesquisa da MERCK.

O objetivo maior desse programa é auxiliar nos processamentos dos dados coletados para se ter arquivos de entrada para programas de cálculos estruturais. Para se obter o programa é necessário entrar no endereço: www.NMRView.com e baixá-lo.

Como visualizar os espectros no programa NMRView

O primeiro passo é converter os dados coletados do aparelho de RMN num arquivo que possa ser lido pelo programa. Para isso, utilizaremos dois scripts do programa NMRView que serão criados e gerados dentro do diretório contendo os arquivos de coleta: **fid** e o **procpar**. O primeiro script (var_conv.com) contém as linhas de comando para converter os dados coletados para uma forma que é utilizado pelo NMRView e o segundo script (x.y.com) processa os dados para obter o espectro que será visualizado e utilizado pelo NMRView.

O var_conv.com é um script que deve ser criado e editado dentro do diretório dos espectros coletados (diretório de trabalho) com as linhas de comando no formato da figura 1B. O significado dessas linhas estão expostas no tópico no anexo “Scripts do NMRView”. Dentro do arquivo criado; verifique os parâmetros: ni, np, sw e reffrq, no arquivo **procpa**r, dentro do diretório dos espectros coletados e efetue a mudança como mostra a Figura 1B. Depois de realizado as mudanças e executado o script, ao final desta operação, o arquivo de saída servirá como entrada para o processamento dos dados.

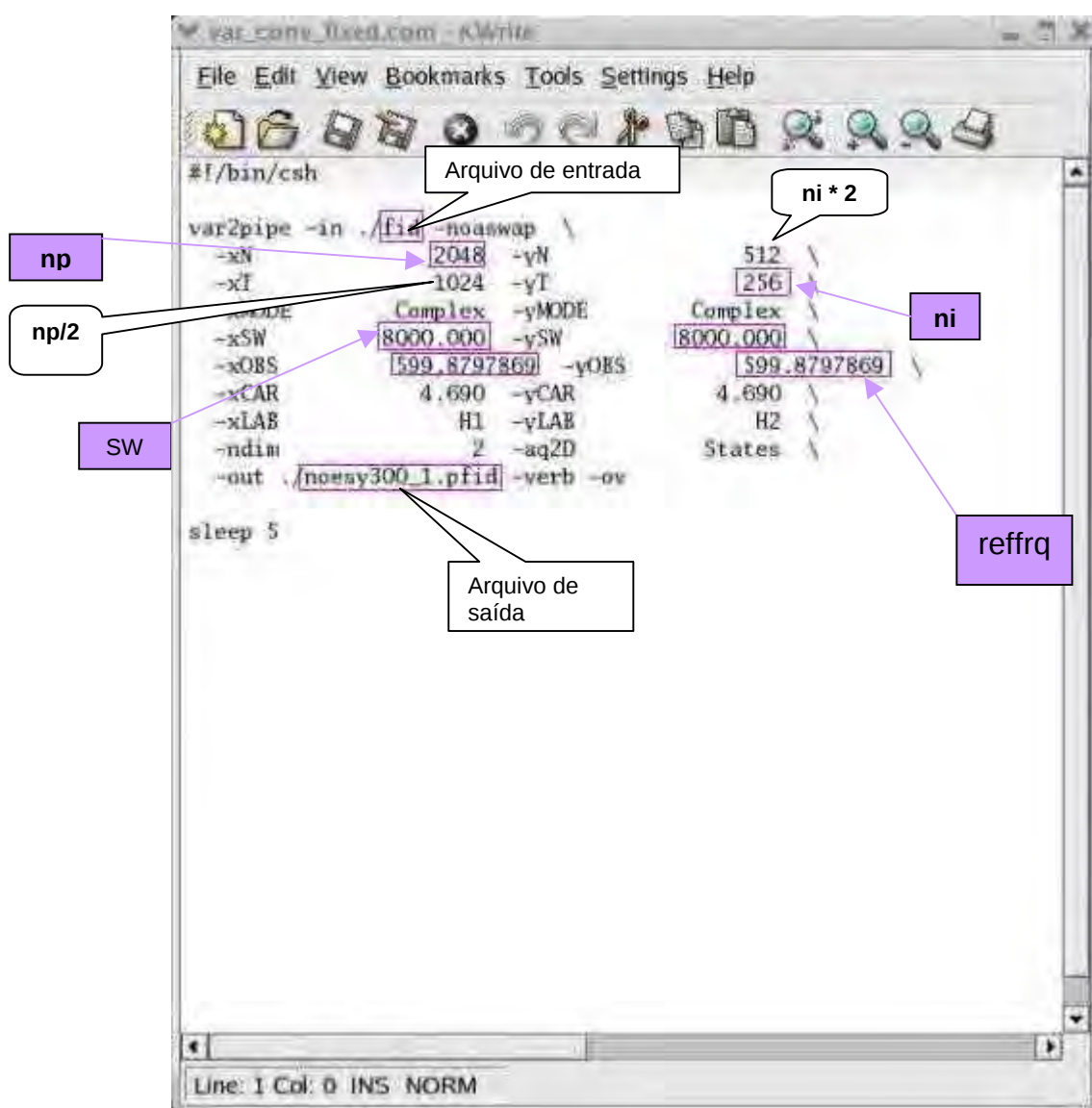


Figura 1B: Linhas de comando do script var_conv.com.

No mesmo diretório criaremos e editaremos um script para processarmos os dados através do script xy.com com as linhas de comando mostrado na figura 2B. Antes de executarmos este script é necessário colocar o nome do seu arquivo de entrada e saída e zerar a fase em x (Figura 2). Terminado esta etapa poderemos, então, abrir o espectro no programa NMRView. Retornaremos a executar esse script quando estivermos fazendo a correção de fase e linha de base do espectro.

```
#!/bin/csh
#
# 2D States-Mode HN-Detected Processing.

nmrPipe -in tocsy.pfid
#| nmrPipe -fn SOL
| nmrPipe -fn GMB -lb -4.0 -gb 0.08
| nmrPipe -fn ZF -size 2048
| nmrPipe -fn FT
| nmrPipe -fn PS -p0 56.81 -p1 261.4 -di
#| nmrPipe -fn EXT -left -sw
| nmrPipe -fn TP
#| nmrPipe -fn LP -fb -ord 10 -pred 64
| nmrPipe -fn SP -off 0.38 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5
| nmrPipe -fn ZE -size 512
| nmrPipe -fn FT
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di
#| nmrPipe -fn REV
#| nmrPipe -fn POLY -auto
| nmrPipe -fn TP
#| nmrPipe -fn POLY -auto
| nmrPipe -fn POLY -auto -xn 12.0ppm -xl 5.5ppm
| pipe2xyz -nv -out polysa_tocsy_300_25_E.nv
```

Entrar com o nome do arquivo de entrada, gerado no script anterior.

Gerar este script com a fase zerada, pra depois corrige-la adequadamente utilizando o NMRView.

Entrar com o nome de saída do arquivo que abrirá o espectro no NMRView.

Figura 2B: Linhas de comando do script x.y.com

Abrindo o NMRView:

Abra um terminal entre com os comandos NMRView ou nv5. Na tela do computador aparecerão os menus principais do NMRView como na Figura 3B.

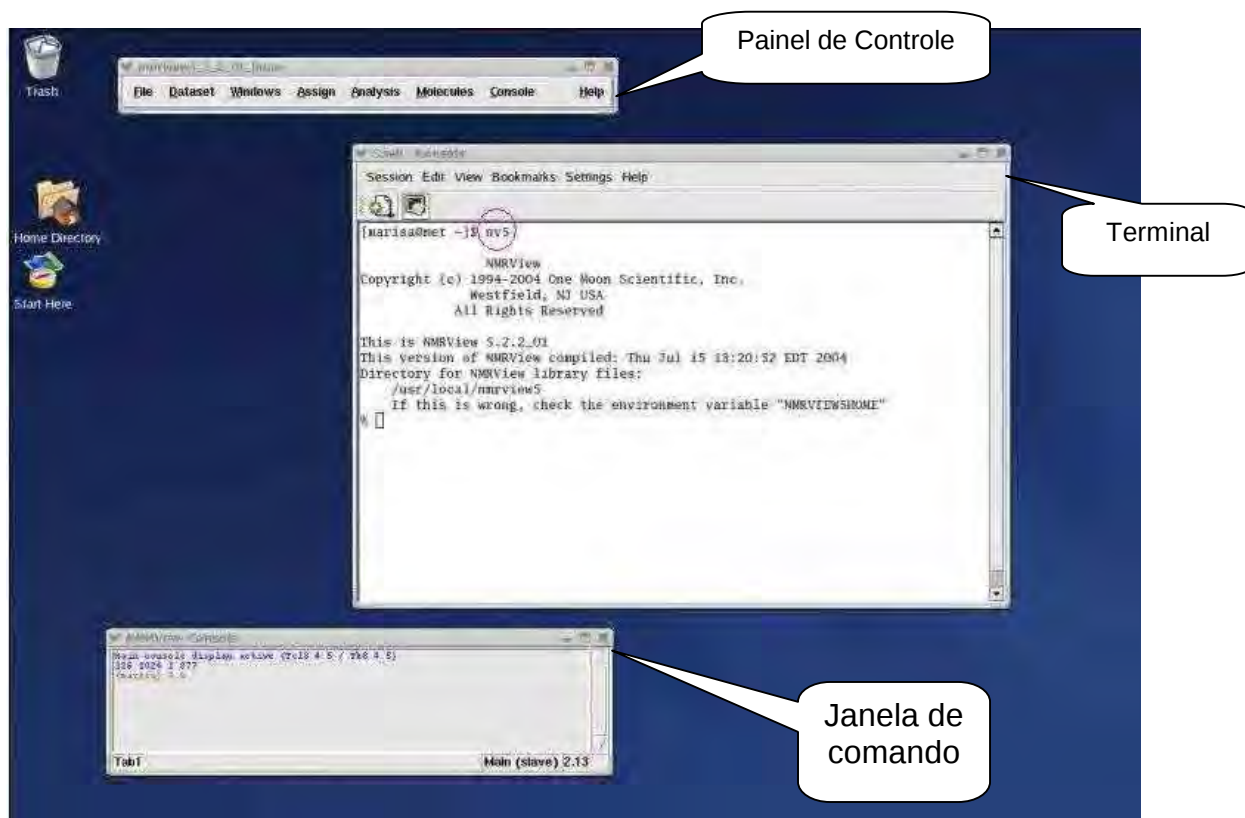
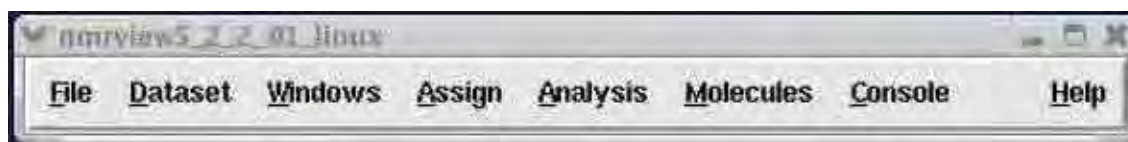


Figura 3B: Interface gráfica dos menus principais do NMRView

Inserindo o espectro no NMRView



No painel de controle, como está sendo mostrado na Figura acima, clique em Dataset; dentro desse ícone, entre em “**Open and Draw Dataset**” (esse recurso carrega e abre, ao mesmo tempo, o espectro numa janela dentro do programa). Logo em seguida, aparecerá uma nova janela, onde selecionaremos o diretório; neste se encontram os dados e abriremos o espectro (Figura 4B).

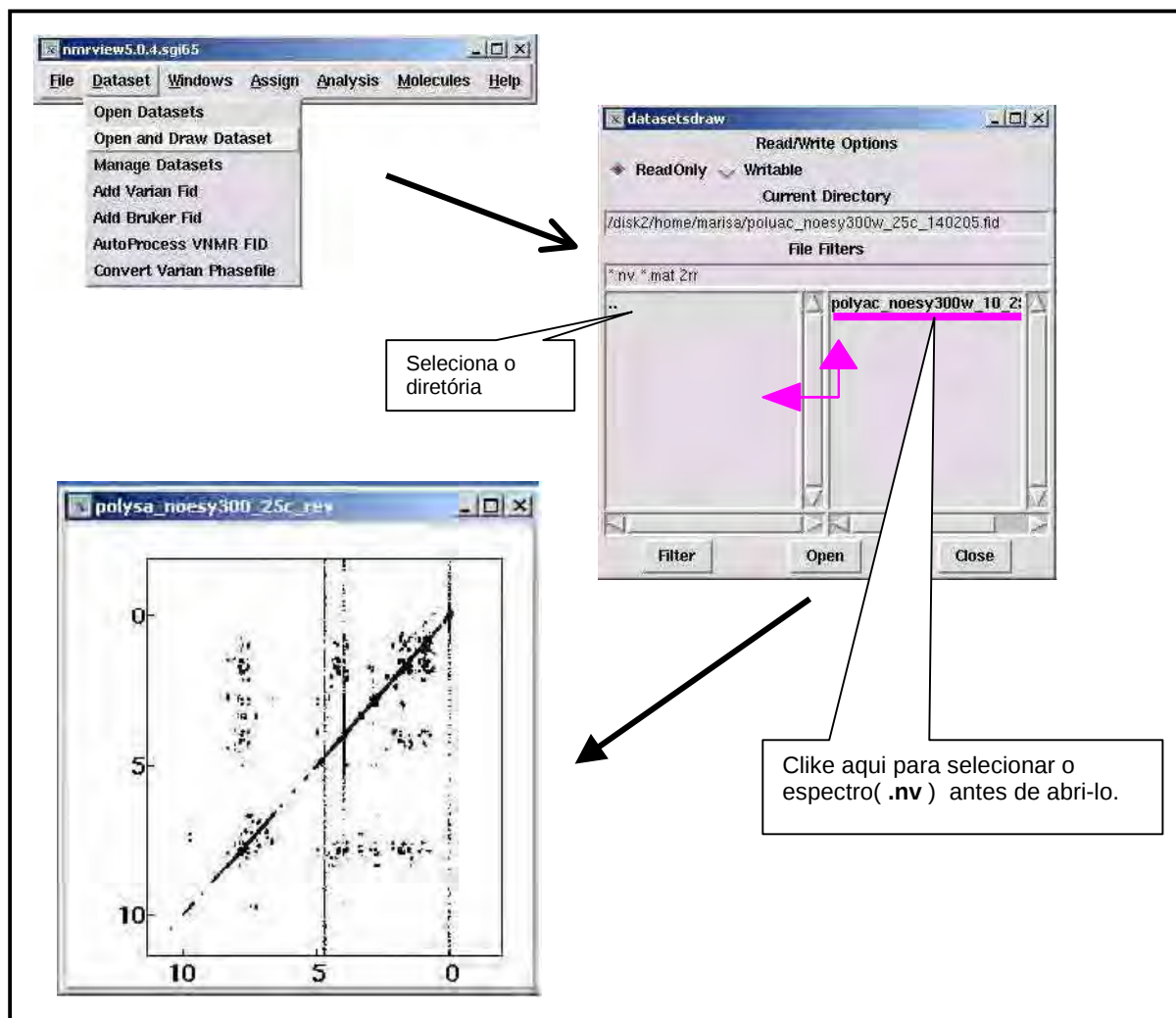


Figura 4B: Passos para a abertura de um espectro no programa NMRView.

Maximizando a janela espectral, com o mouse, aparecerão dois cursores. O botão esquerdo do mouse movimenta o cursor preto, o botão do meio o cursor vermelho e o esquerdo os menus secundários.

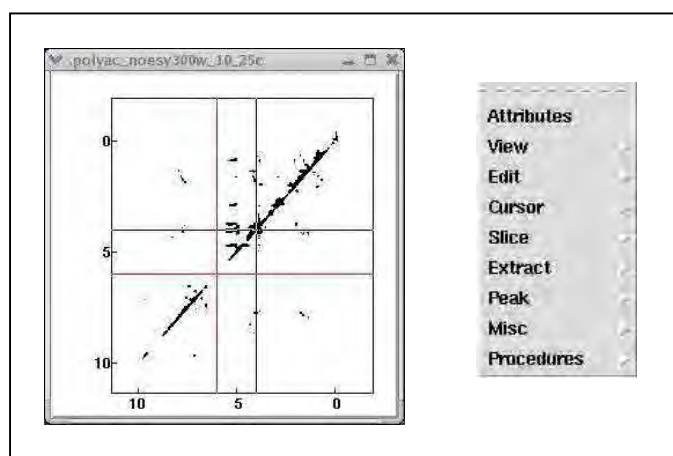


Figura 5B: Cursores e menu secundário.

Arrumando o espectro para análise

No menu secundário “**Attributes**”(Figura 6B) abriremos uma janela onde poderemos definir a cor dos picos, dimensão e o nível do espectro (Figuras 7B). Depois de ter selecionado as características do seu espectro clique em “**DRAW** “ e o espectro aparecerá como na Figura 8B.

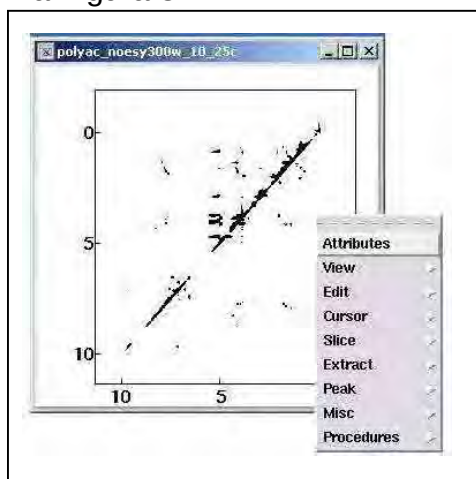


Figura 6B: Espectro 2D com o menu secundário ativo.

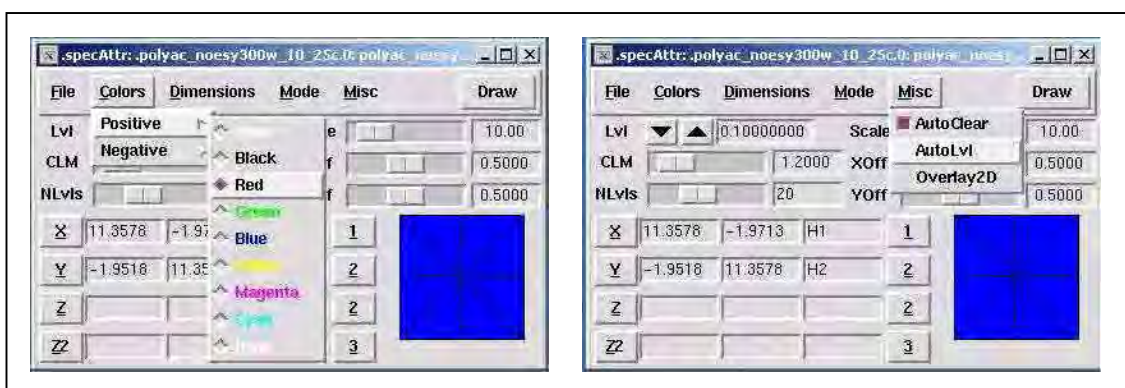


Figura 7B: Mostrando como definir as características do espectro como: cor dos picos e nível

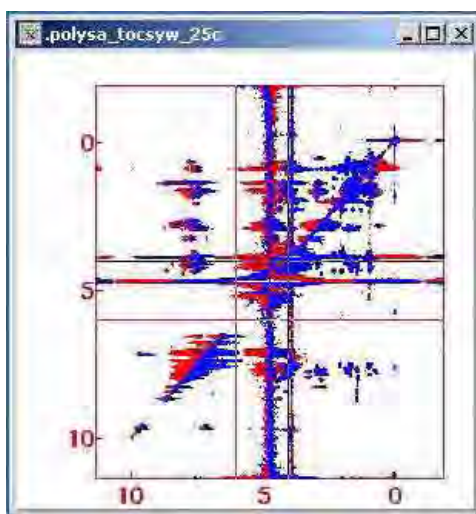


Figura 8B: Espectro 2D sem a correção de fase.

Correção de fase através do NMRView

A correção de fase começa pela seleção de picos da diagonal com os cursores preto e vermelho da janela espectral, cada um num extremo. Arraste primeiramente o cursor preto até um pico da diagonal na região HN e selecione no menu secundário o ícone “**Extract**” como mostra a Figura 10 B.

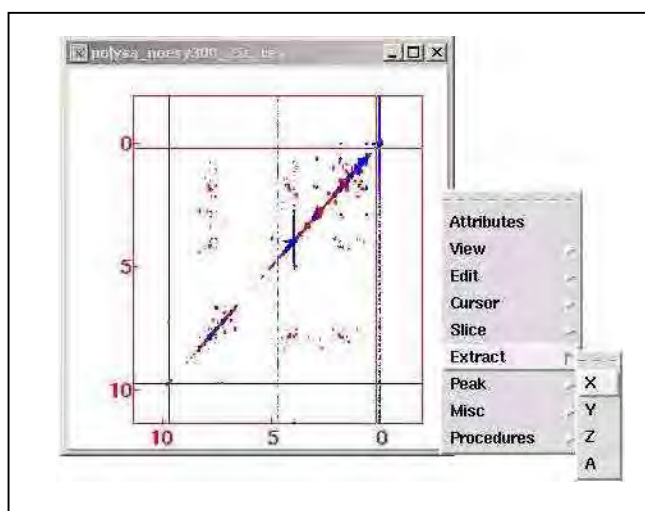


Figura 9B: Espectro 2D com o posicionamento dos cursores para a correção de fase e com o menu secundário ativo na função **Extract**.

Se a correção que o espectro precisa é no eixo **X** (Figura 10B), selecione-o, e em seguida, aparecerá uma janela com um gráfico da região onde posicionamos o cursor clique no ícone **Phaser**. Nesta interface existe um ícone chamado **Piv** (a marcação do Pivô é necessária somente para a correção de fase em P0), que aparece na cor verde, clique nele e depois vá com o mouse, em cima do pico que pegaremos como referência como descrito na Figura 10B.

Selecione o botão P0 e movimente com o cursor os picos, até que eles fiquem posicionados como demonstrado no gráfico da Figura 12B. Ao corrigir P0 anote o valor, zere P0 e feche a janela, voltando assim, para a janela espectral. Faça o mesmo procedimento para a correção de fase em P1 agora relacionando o pico no outro extremo do espectro com o cursor vermelho; só que antes de corrigi-lo, coloque o valor encontrado de P0. Ao final, anote os valores de P0 e P1 e zere esses valores na janela onde se encontram, feche o programa e volte ao seu diretório de trabalho. Coloque os valores encontrados de P0 e P1 na linha de comando do script **xy.com** como indicado na Figura 2B e execute novamente o

script para obtermos um novo espectro pois, o NMRView não aplica as correções de fase .

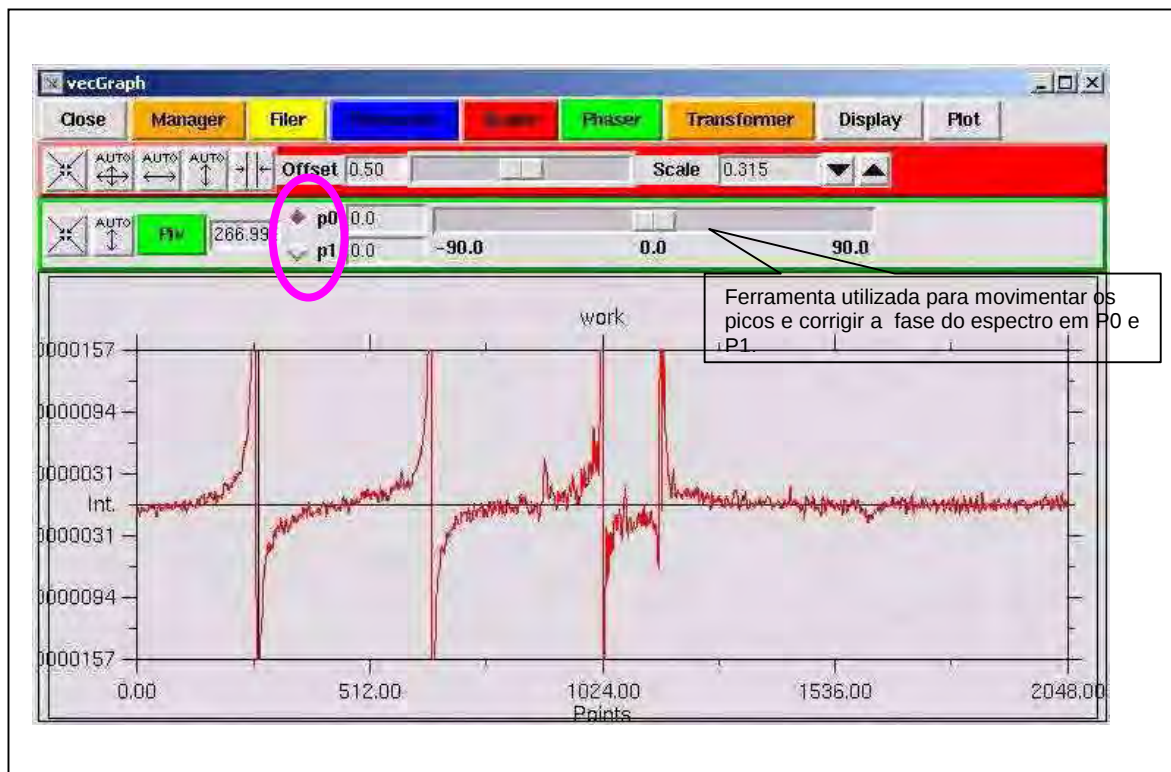


Figura 10B: Janela que realiza a correção de fase: gráfico sem correção.

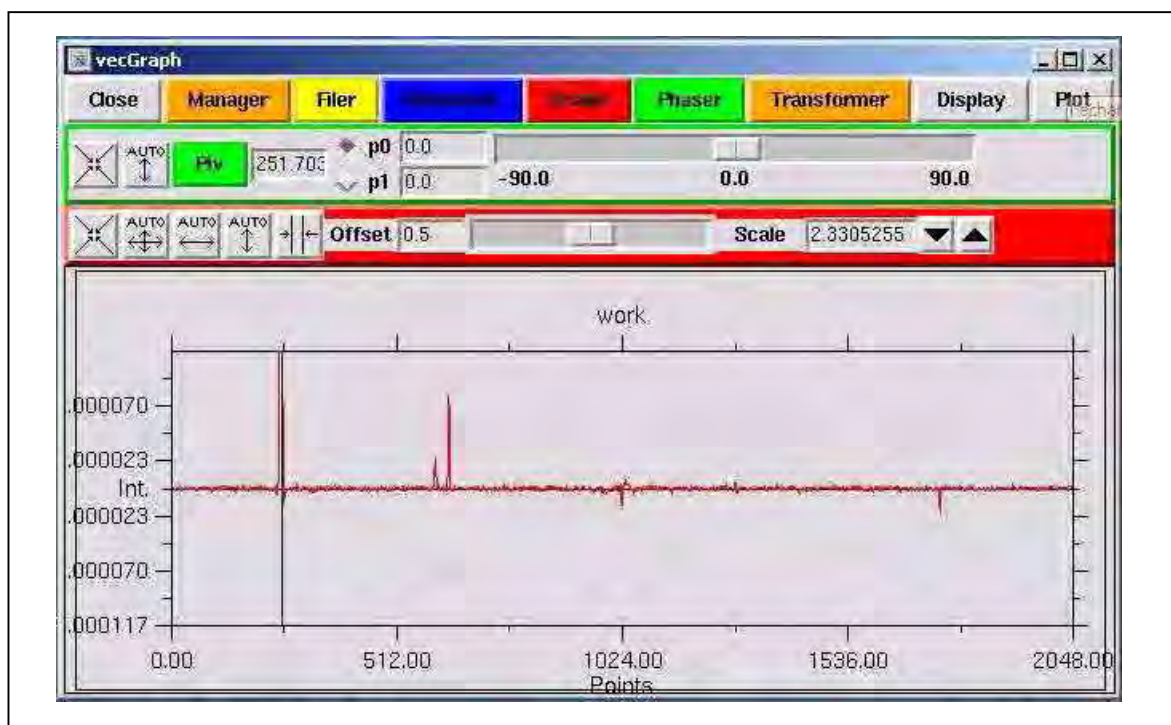


Figura 11B: Janela que realiza a correção de fase: gráfico com correção.

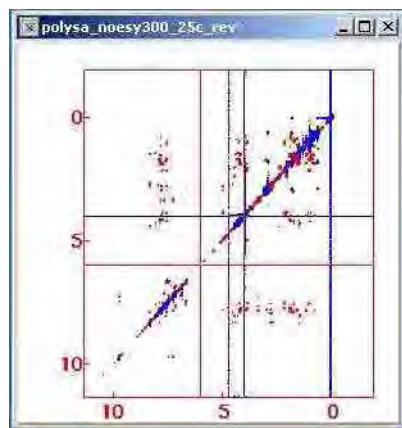


Figura 12B: Espectro 2D com a fase acertada

Trabalhando com o espectro

Escolhendo uma região do espectro

Para selecionar uma região na janela espectral, posicione os cursores na área que queremos visualizar ampliadamente. No menu secundário, vá ao ícone **“view”** e escolha a função **“Expand”**; se quiser retornar à posição inicial clique em **“Full”** (Figura 14B).

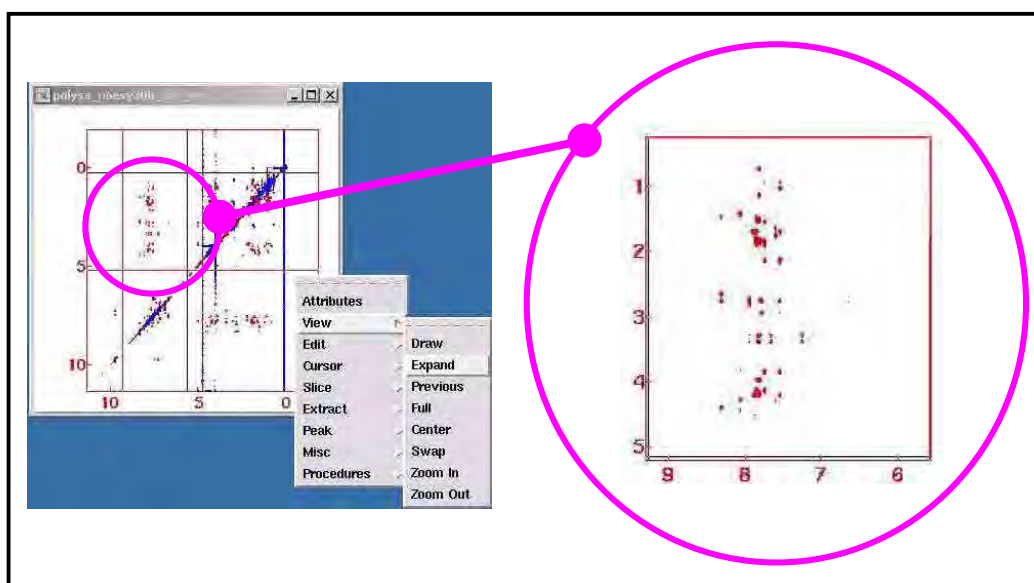


Figura 13B: Mostra o esquema para ampliar o espectro 2D numa dada região, através do ícone **“View”**. Esta ferramenta permite observar o espectro de diversas formas.

Os botões do teclado que utilizamos p movimentar o espectro

- 1** – move para baixo e para a esquerda;
- 2** – move para baixo;
- 3** – move para baixo e para a direita;

- 4 – move para a esquerda;
- 5 – desloca-se para o centro do ultimo pico marcado;
- 6 – move para a direita;
- 7 – move para cima e para a esquerda;
- 8 – move para cima;
- 9 – move para cima e para a direita;
- Zoom out (aumenta o campo de visão);
- + Zoom in (aumenta o campo de visão).

Assinalamento dos Átomos

O assinalamento dos átomos se inicia pela detecção automática dos picos no espectro. Esse procedimento é realizado indo no menu secundário, selecionando o ícone **“Peak”** e depois a função **“Pick”**; aparecerá uma janela, na qual poderemos escolher a forma como os picos serão picados automaticamente. Salve essa lista de picos no menu principal, no ícone **“Assign”** → **“Peak”** (Figura 15B).

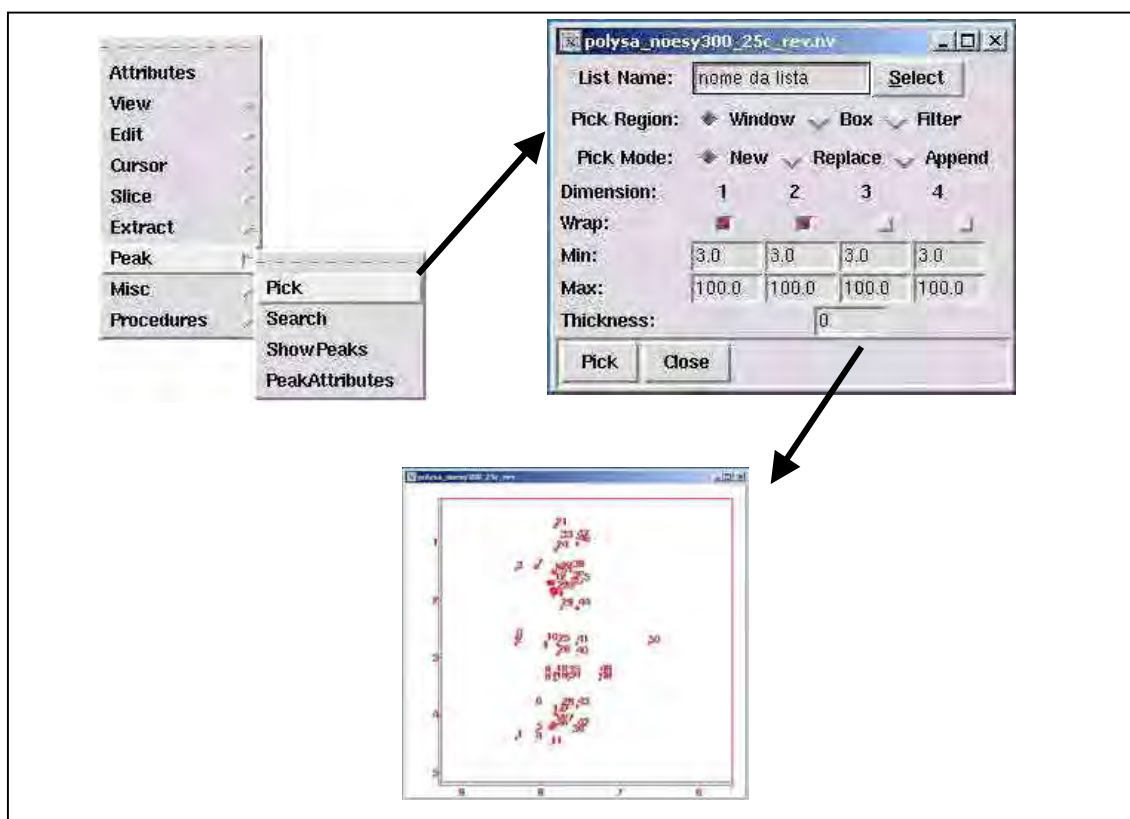


Figura 14B: Esquema para a detecção automática dos picos.

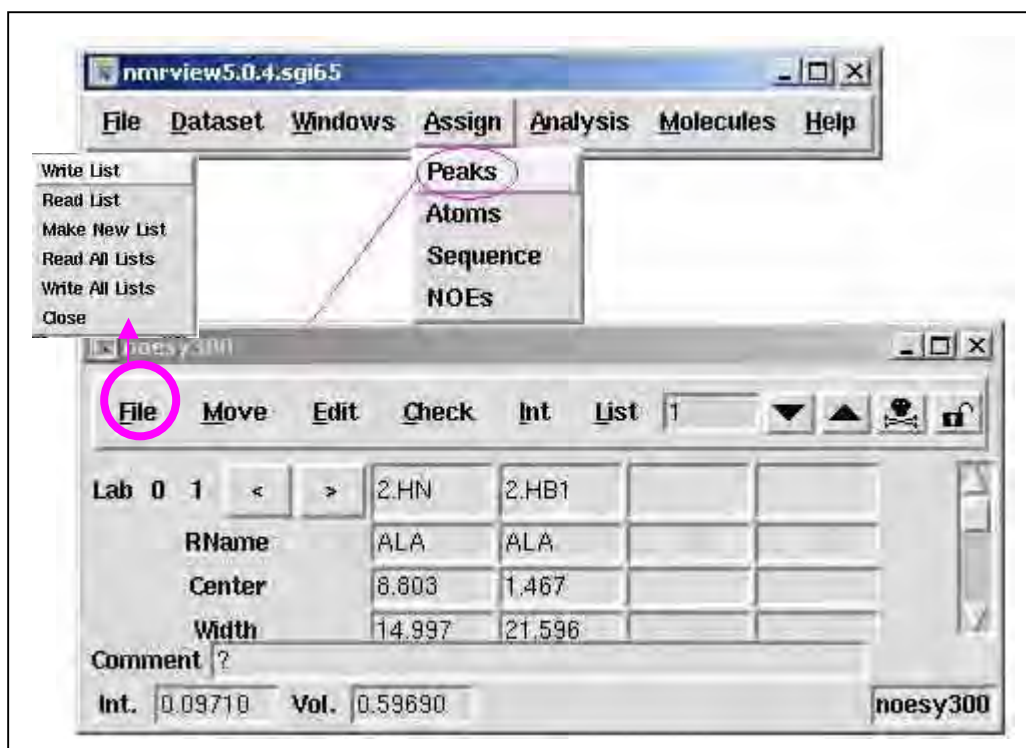


Figura 15B: Janela onde salvamos e abrimos as listas de picos (File) e definimos os picos. No ícone “int” você pode integrar os picos e obter os volumes.

O segundo passo para o assinalamento é carregar a sequência no programa. Abra um novo terminal e entre no seu diretório de trabalho. Dentro deste diretório crie um arquivo com extensão nome.seq com o formato apresentado na Figura 16B. Depois volte ao programa NMRView e no menu principal, entre em “Molecules”(Figura 17B).

Figura 16B: Formato do arquivo nome.seq

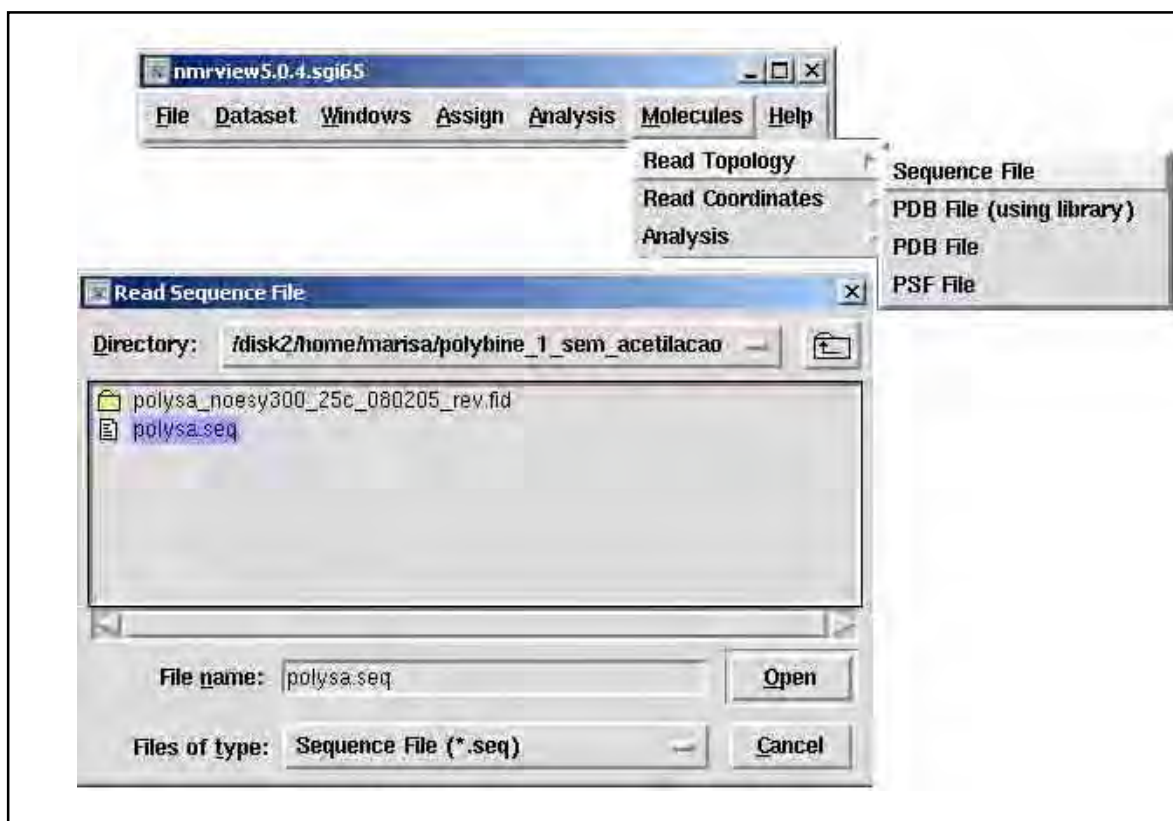


Figura 17B: Mostra como carregar a sequência do peptídeo ou proteína no NMRView .

Com a lista carregada começaremos a identificar o sistema de spin e os picos NOE. Para registrar os picos identificados é preciso entrar novamente na janela descrita na Figura 15B onde salvamos a lista de pico. Os passos para registrar e assinalar os picos estão descritos na Figura 18B. Terminada essa etapa, o ultimo passo é obter os volumes (Figura 18B) e calibrar o espectro (Figura 19B). O cálculo estrutural e a análise da estrutura deverão ser realizados em outros programas como: DYANA, CNS e MOLMOL.

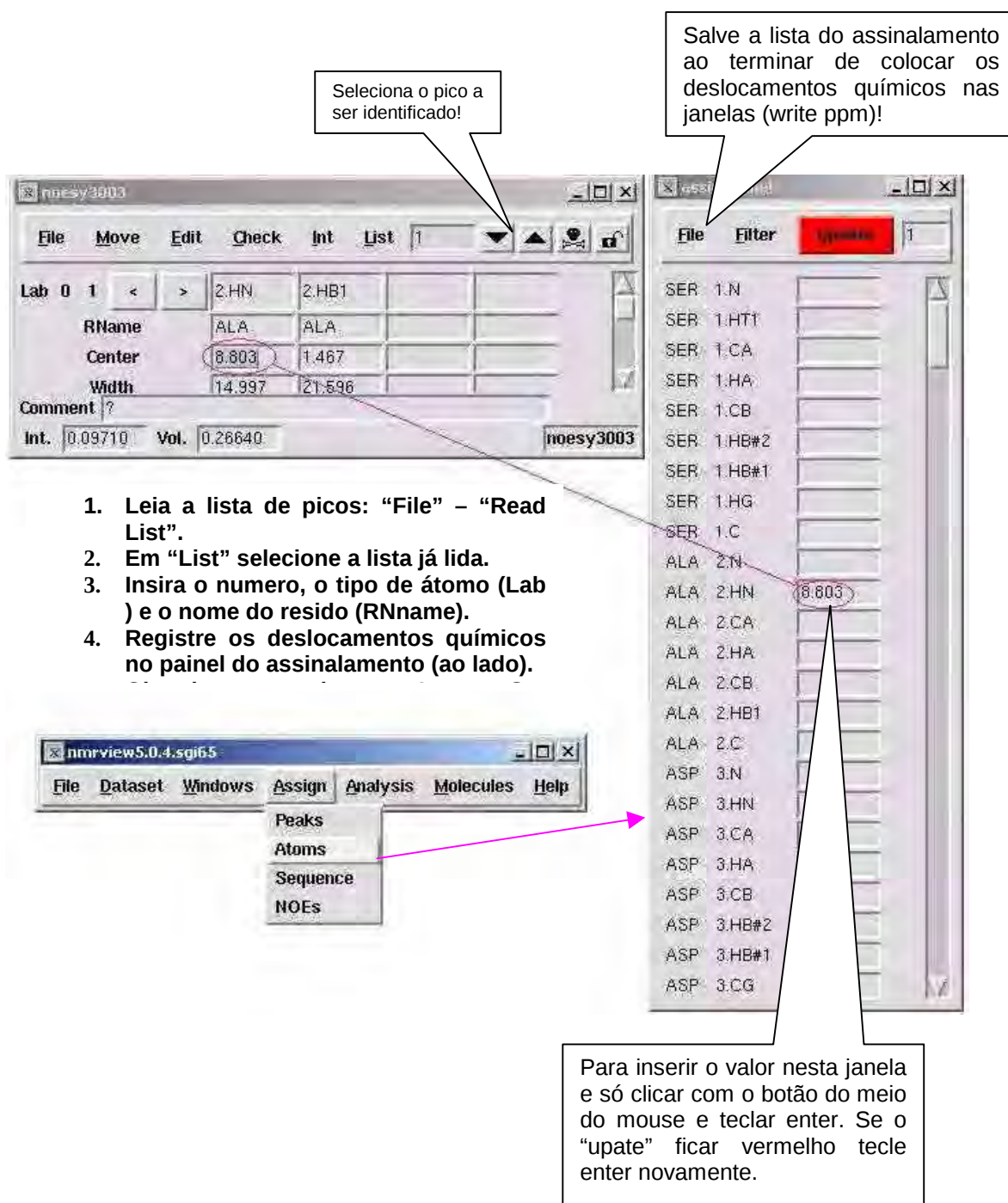
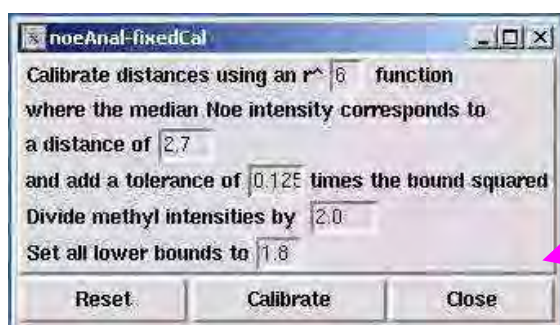


Figura 18B: Mostra os passos para fazer o assinalamento dos resíduos.



1. Selecione a lista de picos(Peaklist) de picos que já deverá ter sido lido como mostrado anteriormente.
2. Clique em Extract all .
3. Escolha se você quer se seu espectro seja calculado pelo volume ou intensidade.
4. Entre em "Calibrate".Escolha o método que irá calibrá-lo.
5. Escolha o formato do arquivo

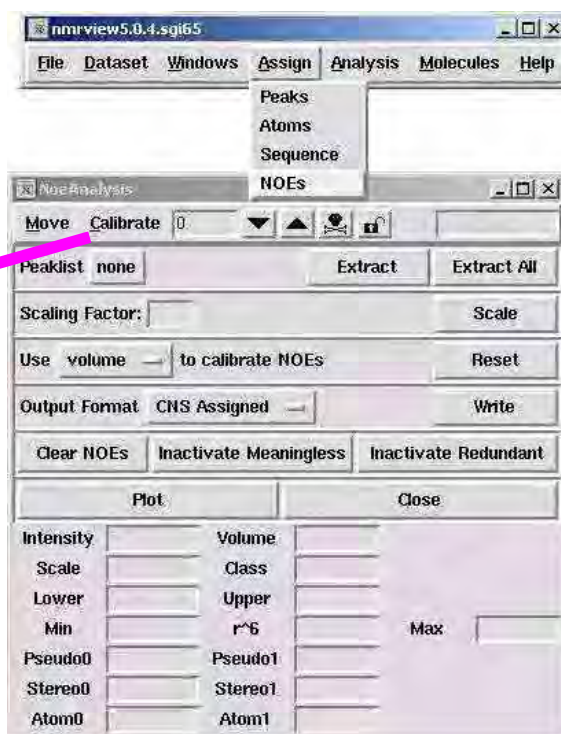


Figura 19B: Mostra os passos para obter as distâncias através de picos NOE.

Anexo

(Scripts do NMRView)

Var conv.com

#!/bin/csh

Var2pipe -in fid

Indica que este é um macro que pode ser executado sobre UNIX

Chama o executável “ var2pipe” (NMRpipe format conversion) com o arquivo “fid” como entrada.

Noswap

Flag para ativar ou não byte-swapping. É uma variável dependente da plataforma operacional.

-xN	2048	-yN	512
-xT	1024	-yT	256

Número de pontos totais (xN e Yn) e pontos válidos (xT e yT). Para estes valores e os abaixo, cada coluna corresponde a uma dimensão. Para dados 2D temos então duas colunas. Os valores iniciados por “x” correspondem à primeira dimensão e os “y” à segunda dimensão.

Os valores xN e xT são obtidos da variável “ np” definida na coleta de dados, correspondendo ao número de pontos coletados em cada FID, “np” corresponde ao número total de pontos coletados (reais + imaginários). Cada FID possui np/2 pontos reais e np/2 pontos imaginários. Portanto xT = np/2 e xN = np. Os valores yN e yT são obtidos da variável de coleta “ni” que é relativo à quantidade de FIDs adquiridos. A variável ni indica o número de pontos imaginários na segunda dimensão, portanto, yT = ni e yN = ni*2.

xMODE Complex -yMODE Complex

Indica o modo de coleta, “Complex” se foram adquiridos pontos reais e complexos ou “ Real “ se somente pontos reais foram adquiridos.

xSW 8000.00 -ySW 8000.00

É obtido da variável de coleta “sw”

xOBS 599.894030 -yOBS 599.894030

Indica a frequência de ressonância do núcleo excitado. É obtido da variável de coleta “reffrq”

xCAR 4.690 -yCAR 4.690

Corresponde à frequência central do espectro. Usualmente é a frequência de ressonância da água e é obtido de valores tabelados, para cada temperatura. Deveser corrigido os dados coletados após o espectro ter sido referenciado.

xLAB H1 -yLAB H2

Corresponde aos núcleos excitados em cada dimensão (H1 : Hidrogênio na dimensão 1 e H2 na dimensão 2).

ndim 2 -aq2D States

Número de dimensão e modo de filtragem de coerência por excitação em e detecção em diferentes fases (states ou TPPI, p. ex).

out tocsy,pfid -verb -ov

Indica o arquivo de saída dos dados convertidos. A opção “-verb” faz com que seja impressa na tela linhas indicativas das operações executadas e “ov “ força um novo arquivo a sobrescrever o antigo existente.

Obs: o símbolo # no inicio da linha impede a execução daquela linha de comando

xy.com

#|nmrpipe -fn SOL \ ou POLYtime

|nmrpipe -fn GMB -lb -4.0 -gb 0.08

|nmrpipe -fn ZF -size 2048

|nmrpipe -fn FT

|nmrpipe -fn PS -p0 88.7 -p1 16.0 -di

#|nmrpipe -fn EXT -left -sw

|nmrpipe -fn TP

#|nmrpipe -fn LP -lb -ord 10 -pred 64

|nmrpipe -fn SP -off 0.38 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5

#|nmrpipe -fn REV -auto

#|nmrpipe -fn POLY -auto 1

#|nmrpipe -fn POLY -auto 2

|nmrpipe -fn POLY -auto -xn 12.0ppm -x1 5.5ppm

|pipe2xyz -nv -out polysa_tocsy_presat_300_25.nv

Invoca uma função de processamento interna pré-definida (-fn). SOL: filtra o solvente. Aplica um função de convolução no domínio do tempo para subtração do solvente.

GM: Gauss-to-lorentz. Apodiza os dados com uma função mista Gauss-exponencial. "lb" especifica o decaimento da exponencial, geralmente usa-se o negativo da largura de linha em Hz e "gb" um fator gaussiano, geralmente uma fração de 1.

ZF: Zero Fill. Completa os dados com zeros. O ponto inicial da introdução de zeros pode ser introduzido manualmente (-size) ou automaticamente (-auto).

FT: Fourier Transform. Aplica uma transformada de Fourier direta ou inversa em vetores complexos ou reais de qualquer tamanho.

PS: Phase Correct. Corrige os valores de fase em primeira (p0) e em segunda ordem (p1). Os valores a serem introduzidos aqui devem ser obtidos corrigindo a fase do espectro do primeiro FID, via NMRView. "di" remove os dados imaginários após o processamento.

EXT extrai uma dada região dos dados espectrais. Usando para descartar regiões vazias do espectro durante o processamento. A região pode ser especificada em termos gerais como à direita (-right), à esquerda (-left) ou central (-mind) ou por pontos específicos. "-sw" ajusta os dados de frequência, como tamanho de janelas, para se ajustarem à nova região.

TP inverte linhas (eixo X_ por colunas (eixo Y) e vice versa de dados complexos ou reais . A partir deste ponto as funções aplicadas agem na Segunda dimensão.

LP: Linear Prediction. Prevê ou corrige dados no começo, meio ou fim do vetor de dados. "-fb" define forward-backward predição que prediz pontos antes e depois da região usada para o cálculo. "-ord" define o número de coeficiente usado na predição e "-pred" define o número de pontos a ser predito.

SP: Sine Bell. Apodiza os dados com uma função seno ajustável. "-off" ajusta o ponto inicial (sin(off*pi)), "end" o ponto final (sin(end*pi)), "pow" é a potencia do seno e "-c" é a escala.

REV: Reverse. Reverse a ordem dos dados em cada vetor

POLY: Polynomial Subtract. Subtrai dos dados uma função polinomial. No domínio da tempo é usada para subtração de solvente.

POLY: Polynomial Subtract. Subtrai dos dados uma função polinomial. No domínio da frequência é usada para correção de linha de base. "-auto" corrige automaticamente a linha de base.

"-x1" indica o ponto inicial e "-xn" indica o ponto final da região onde a função será aplicada.

Executa o aplicativo "pipe2xyz" e grava a matriz de dados "file.nv"

