Universidade de São Paulo
Instituto de Física

DINÂMICA CONFORMACIONAL DE PEPTÍDEOS: UM ESTUDO POR FLUORESCÊNCIA

Eduardo Sérgio de Souza

INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 4128 Ex. 1

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Física
para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito - IF-USP

Prof. Dr. Hidetake Imasato - IQSC - USP

Prof. Dr. Iouri Borissevitch - DFM-FFCLRP-USP

Prof. Dr. Sylvio Roberto Accioly Canuto - IF-USP

Profa. Dra. Vera Bohomoletz Henriques - IF-USP

São Paulo
2004

SBI-IFUSP

305M810T4128

Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação

del 05/01/2006

535.35
5229 d
T
Ex. 1

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo**

Souza, Eduardo Sérgio de

Dinâmica conformacional de peptídeos: um estudo por fluorescência. São Paulo - 2004.

Tese (Doutoramento) – Universidade de São Paulo
Instituto de Física - Depto. de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Área de Concentração: Física

Unitermos

1. Biofísica Molecular;
2. Espectroscopia Molecular;
3. Peptídeos;
4. Polissacarídeos
5. Energia - transferência;
6. Luminescência

USP/IF/SBI-0652004

AGRADECIMENTOS

Ao Amando pela orientação.

À Cássia pelas leituras e sugestões na redação da tese.

Ao Marcelo pelo apoio em Ribeirão Preto.

Ao pessoal do Grupo de Biofísica e Física Médica pelo bom convívio.

Ao Prof. Cláudio Nakaie pelos peptídeos.

Ao Prof. Luiz Juliano e à Izaura pelos peptídeos.

Ao pessoal da Shirley pelo uso do espectropolarímetro.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

À Nadir, ao Vinícius e à Laura.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 Introdução

1.1	Peptídeos bioativos	1
1.2	Técnicas espectroscópicas	3
1.3	FRET	5
1.4	Peptídeos	7
1.4.1	7B2CT	7
1.4.2	α -MSH	7
1.4.3	Cardin	9
1.5	Objetivos	11

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1	Fluorescência	13
2.1.1	Supressão da fluorescência	15
2.1.2	Anisotropia e polarização	16
2.1.3	FRET	17
2.1.4	Um Tratamento clássico	20
2.1.5	Um tratamento quântico	26
2.1.6	FRET e distância única entre doador e aceitador	29
2.1.7	Distribuição de distâncias entre doador e aceitador	30
2.2	Dicroísmo circular	33

3 METODOLOGIA

3.1	Materiais	36
3.1.1	7B2CT	36
3.1.2	α -MSH	36
3.1.3	Cardin	37
3.1.4	Experimento de FRET	37
3.1.5	Mistura tampão/TFE	38
3.1.6	Titulação	38
3.1.7	SDS	39
3.2	Equipamentos	40
3.2.1	Absorção óptica	40
3.2.2	Fluorescência de estado estacionário	41
3.2.3	Fluorescência resolvida no tempo	42
3.2.4	Dicroísmo circular	44

4 PROGRAMAS DE AJUSTES

4.1	Formação das equações lineares	46
2.2	Vínculos	46
4.3	Regularização	47
4.4	Região de confiança	48
4.5	Testes de implementação do programa	48
4.6	Aplicação do programa	49

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1	7B2CT	51
5.1.1	Absorção	51
5.1.2	Fluorescência estática	52
5.1.3	Fluorescência resolvida no tempo	54
5.1.4	Titulação	55
5.1.5	Supressão por iodeto de potássio	57
5.1.6	Análogos A12 e A18	60
5.2	α -MSH	64
5.2.1	Absorção	64
5.2.2	Fluorescência estática	66
5.2.3	Fluorescência resolvida no tempo	68
5.2.4	FRET	71
5.2.4.1	Tempos de correlação rotacional	73
5.2.4.2	Distribuição de distâncias em tampão HEPES	74
5.2.4.3	Distribuição de distâncias em TFE	75
5.3	Cardin	80
5.3.1	KK4 e RKK4	80
5.3.2	RKK3	85
5.3.2.1	Heparina	85
5.3.2.2	Titulação com heparina	87
5.3.2.3	Mistura tampão/TFE	91
5.2.3.4	SDS	93
5.3.2.5	Dicroísmo Circular	95

6 CONCLUSÕES

6.1	7B2CT	98
6.2	α -MSH	98
6.3	Cardin	100

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RESUMO

Realizamos estudos, por espectroscopia de fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo, de dinâmica conformacional de três famílias de peptídeos: o terminal carboxílico do peptídeo neuroendócrino (7B2CT); o peptídeo estimulador do melanócito (α -MSH); e os peptídeos derivados da sequência consensual de peptídeos que se ligam a heparina (peptídeo Cardin). Utilizamos os métodos de fluorescência baseados na supressão da emissão do fluoróforo presente no peptídeo, tanto por interação colisional com um supressor como por transferência de energia para um grupo aceitador presente no peptídeo. No segundo caso, dentro da hipótese de que diferentes conformações do peptídeo estão presentes durante o decaimento da fluorescência, supusemos que o decaimento da intensidade era modulado por uma função de distribuição de distâncias doador-aceitador, $f(r)$. Foi desenvolvido um procedimento computacional usando o programa CONTIN, para recuperar, a partir dos dados de fluorescência resolvida no tempo, a distribuição de distância entre o doador e o aceitador presentes nos peptídeos. A metodologia se mostrou útil para obter informações quantitativas sobre a dinâmica conformacional dos peptídeos, sua dependência com o solvente e sua interação com outras moléculas presentes no meio.

O peptídeo 7B2CT e seus análogos A12 e A18 foram estudados pela fluorescência da tirosina, presente na posição cinco na sequência de aminoácidos. Não houve diferenças significativas no decaimento da intensidade, no decaimento da anisotropia e na supressão por iodeto entre os três peptídeos, que pudessem ser correlacionados com as diferenças observadas na inibição da *pro-hormone convertase 2* (PC2).

O peptídeo α -MSH e seu análogo mais potente [Nle(4),D-Phe(7)] α -MSH (NDP- α -MSH), que contém o resíduo fluorescente triptofano, foram modificados no seu terminal amino com o grupo ácido amino benzóico (Abz), e foram estudados por métodos de fluorescência. Observamos transferência de energia entre o resíduo triptofano, atuando como doador, e o aceitador o-Abz. Verificamos a uma ampla distribuição de distâncias Trp-o-Abz para o α -MSH em água, enquanto três populações de distâncias foram observadas para o análogo modificado NDP- α -MSH em água, indicando estados com conformações distintas para o peptídeo sintético, comparado com o hormônio nativo. Medidas em trifluoroetanol resultaram em duas populações de distâncias, tanto para o hormônio nativo como para o hormônio análogo, refletindo a diminuição, induzida pelo solvente, das conformações disponíveis para os peptídeos.

Os peptídeos Cardin foram estudados na presença de heparina, de micelas de SDS e na mistura TFE/água. O grupo fluorescente Abz foi incorporado no terminal amino e o grupo aceitador etilenodiamina-N-[2,4-dinitrofenil] (Eddnp) foi incorporado ao terminal carboxílico dos peptídeos. A distribuição de distâncias entre as extremidades, recuperadas dos dados de fluorescência resolvida no tempo, indicaram a presença de conformações estendidas em solução aquosa e a ocorrência de conformações compactas na interação com heparina e SDS ou em soluções com TFE. As distâncias entre as extremidades recuperadas foram maiores que aquelas esperadas para os

peptídeos na conformação hélice alfa, sugerindo a ocorrência de estruturas dobradas além da hélice alfa.

A metodologia da transferência de energia se mostrou útil para os estudos de dinâmica de peptídeos em solução.

ABSTRACT

Steady state and time-resolved fluorescence spectroscopy were used to study the conformational dynamics of three families of peptides: the carboxyl terminal of the neuroendocrine peptide (7B2CT), the alpha melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) and heparin-binding consensus sequence peptides (Cardin motif peptides). The fluorescence methods were based on quenching of the emission of a fluorophore present in the peptide, either by collisional interaction with a quencher, as by energy transfer to an acceptor group. In the second case, within the hypothesis that different peptide conformations are in equilibrium during the fluorescence decay, we supposed that the intensity decay was modulated by an acceptor-donor distance distribution function, $f(r)$. A computational procedure was developed using the CONTIN program, to recover, from the time-resolved fluorescence data, the distance distribution between donor and acceptor groups attached to the peptides. The methodology proved to be useful to provide quantitative information about conformational dynamics of peptides, its dependency on the solvent and its interaction with other molecules present in the medium.

The peptide 7B2CT and its analogs A12 and A18 were studied by examination of fluorescence from the tyrosine residue present in the position five of the amino acid sequence. There were no appreciable differences in the intensity decay, anisotropy decay and iodide quenching between the three peptides, that could be correlated to observed differences in the inhibition of the pro-hormone convertase 2 (PC2).

The peptide hormone alpha-MSH and its more potent analog [Nle(4),D-Phe(7)]alpha-MSH (NDP-alpha-MSH), containing the fluorescent residue tryptophan, were labeled at the amino terminal with the amino benzoic acid (Abz) group, and were also examined by fluorescence methods. We observed energy transfer between the tryptophan residue acting as donor and Abz as acceptor, and verified a broad Trp-o-Abz distance distribution for alpha-MSH in aqueous medium, while three different distance populations could be identified for the labeled analog NDP-alpha-MSH in water, indicating distinct conformational states for the synthetic peptide, compared with the native hormone. Measurements in trifluoroethanol resulted in the recovery of two Abz-Trp distance populations, both for the native and the analog hormones, reflecting the decrease, induced by the solvent, of the conformational states available to the peptides.

The Cardin motif peptides were examined in the presence of heparin, SDS micelles and in TFE/water mixtures. The fluorescent group Abz was attached to the amino terminal and the acceptor group N-(2,4-dinitrophenyl)ethylenediamine (Eddnp) was bound to the carboxyl terminal of the peptides. The end-to-end distance distribution recovered from time-resolved fluorescence data indicated extend conformation in aqueous medium and the occurrence of compact conformations under interaction with heparin and SDS or in the medium containing TFE. The end-to-end distances recovered were lower than those expected for the peptides in alpha helix conformation, suggesting the occurrence of turned structures beyond the alpha helix. The energy transfer methodology shows to be useful to study conformational dynamics of peptides in solution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos bioativos.

Proteínas são macromoléculas que desempenham um papel muito importante nos processos biológicos. Elas existem em abundância nas células dos organismos vivos. Quase todos os catalisadores em sistemas biológicos são proteínas. Estas proteínas são chamadas enzimas. As proteínas mediam uma série de funções como o transporte e o armazenamento, o movimento coordenado, o suporte mecânico, a proteção imunológica, etc. A proteína pode ser descrita como uma cadeia de aminoácidos, que são moléculas compostas por um grupo amino, um grupo carboxila e uma cadeia lateral, unidos por ligações peptídicas em uma sequência específica. Todas as proteínas são construídas a partir de um mesmo conjunto de vinte aminoácidos (Tabela 1.1) que diferem entre si pelas cadeias laterais. O número de aminoácidos que compõem uma proteína varia de dezenas a mais de mil. Peptídeos são cadeias compostas por poucos aminoácidos. Os peptídeos têm funções biológicas específicas como os hormônios, os antibióticos e outros. Inúmeros textos podem ser consultados sobre o tema, como por exemplo, Horton *et al* (1996), Lehninger (1984) e Stryer (1995).

As estruturas espaciais adquiridas pelas proteínas são classificadas em diferentes níveis: primária (sequência de aminoácidos), secundária (estruturas regulares e localizadas que são estabilizadas por pontes de hidrogênio), terciária (forma compacta de toda a cadeia) e quaternária (arranjo de proteínas formadas por duas ou mais cadeias polipeptídicas). Existem algumas estruturas secundárias que se repetem regularmente em cadeias polipeptídicas e são bem determinadas: a hélice α (Figura 1.1) e a folha β . Um fator determinante para o desempenho da função de um peptídeo é a sua conformação. Uma cadeia polipeptídica pode assumir um número muito grande de diferentes conformações.

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	ALA	A
Arginina	ARG	R
Ácido Aspártico	ASP	D
Asparagina	ASN	N
Cisteína	CYS	C
Ácido Glutâmico	GLU	E
Glutamina	GLN	Q
Glicina	GLY	G
Histidina	HIS	H
Isoleucina	ILE	I
Leucina	LEU	L
Lisina	LYS	K
Metionina	MET	M
Fenilalanina	PHE	F
Prolina	PRO	P
Serina	SER	S
Treonina	THR	T
Triptofano	TRP	W
Tirosina	TYR	Y
Valina	VAL	V

Tabela 1.1 Aminoácidos e seus códigos de uma e três letras.

Porém, em condições fisiológicas cada proteína geralmente assume uma conformação estável para o desempenho de uma determinada função, esta conformação é a chamada conformação nativa. Para entender a relação entre a conformação nativa e a função desempenhada por um dado peptídeo é necessário descobrir ou obter o máximo de informações sobre a conformação nativa deste peptídeo. Algumas técnicas físicas, que discutiremos a seguir, têm sido empregadas para obter informações sobre a estrutura de macromoléculas biológicas. Este trabalho é mais um esforço na tentativa de obter informações sobre a estrutura de peptídeos e de entender a relação estrutura-função destas macromoléculas.

Figura 1.1 Hélice α de poli (10)-alanina (Construído no programa HyperChem 5.1 e visualizado no programa RasMol 2.6)

1.2 Técnicas espectroscópicas.

Diversas técnicas físicas têm sido empregadas no intuito de se obter informações sobre as estruturas e conformações dos peptídeos (veja, por exemplo, Horton et al (1996), Lehninger (1984) e Stryer (1995)).

A técnica que revela mais informações é a técnica de raio-X da molécula cristalizada. Os elétrons no cristal difratam os raios-x. Da análise matemática do padrão de difração é gerada uma imagem das nuvens eletrônicas ao redor dos átomos no cristal. Combinando o mapa da densidade eletrônica com o conhecimento da seqüência de aminoácidos é possível construir o arranjo espacial de todos os átomos na molécula. Uma dificuldade desta técnica é a necessidade de cristalizar a proteína.

A técnica de ressonância magnética nuclear (nmr) permite o estudo de proteínas em solução. Nesta técnica a amostra é colocada em um campo magnético. Certos núcleos absorvem radiação eletromagnética conforme o campo magnético aplicado varia. Esta absorção depende do núcleo dos átomos vizinhos e, portanto, as interações entre núcleos que estão próximos podem ser estudadas revelando assim a estrutura tridimensional da molécula. A dificuldade desta técnica é a quantidade de material necessário e a restrição quanto ao tamanho dos peptídeos, pois peptídeos muito grandes geram um número muito grande de informações a serem tratadas e peptídeos pequenos assumem muitas conformações.

A ligação peptídica absorve radiação na região entre 170 e 240nm. Radiação circularmente polarizada à direita é absorvida diferentemente da circularmente polarizada à esquerda. O dicroísmo circular (cd - circular dichroism) é a medida da diferença de absorção em cada direção de polarização em função do comprimento de onda. Peptídeos com estruturas conhecidas, como hélice α , possuem um espectro de cd bem definido. Portanto, conhecendo-se o espectro de cd de estruturas já determinadas por outras técnicas, é possível verificar se estas estruturas estão presentes e em que proporção em um peptídeo qualquer.

Certas moléculas, como alguns aminoácidos, absorvem radiação na região do ultravioleta (uv) (150 a 300nm). Com esta absorção as moléculas sofrem transições do estado fundamental para o estado excitado. A espectroscopia de absorção ótica compara a intensidade de um feixe de luz transmitido através de uma amostra com a intensidade incidente e os dados experimentais são expressos em termos da intensidade absorvida em função do comprimento de onda. Dentre os aminoácidos apenas o triptofano, a tirosina e a fenilalanina absorvem radiação nesta região. Estes aminoácidos são chamados de sondas intrínsecas. Para estudarmos peptídeos que não contêm estes aminoácidos temos que incorporar outras sondas a eles. Estas sondas são chamadas extrínsecas. Na técnica de absorção ótica estamos estudando sempre uma parte do peptídeo onde está localizada a sonda. Portanto, com esta técnica temos apenas informações sobre a estrutura eletrônica da sonda, seja intrínseca ou extrínseca. A absorção ótica é sensível

às propriedades da vizinhança da sonda, como a constante dielétrica, o pH, etc. Com isso podemos verificar onde a sonda se encontra e fazer algumas deduções sobre a conformação do peptídeo.

Estas mesmas moléculas que absorvem energia tendem a voltar para o estado fundamental liberando energia para o meio. A fluorescência é um dos processos no qual esta energia é liberada através da emissão de fótons. A técnica de fluorescência se divide em duas categorias: a estática e a resolvida no tempo. A estática nos revela o espectro de fluorescência que é a intensidade de emissão em função do comprimento de onda. Através da fluorescência resolvida no tempo podemos obter o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Os mesmos aminoácidos, que absorvem radiação na região do uv, citados anteriormente são os fluorescentes. A fluorescência também é sensível às características físicas da vizinhança e, portanto esta técnica atua como a absorção ótica no estudo de peptídeos. Todavia, enquanto a absorção se processa em tempos muito curtos (10^{-15} s) a molécula permanece em seu estado excitado por tempos suficientemente longos (10^{-9} s) para que a interação com o meio circundante se torne importante e desse modo mais informações podem ser obtidas com a fluorescência. Um outro processo de desexcitação é a transferência de energia por ressonância do estado excitado de um fluoróforo com o estado fundamental de um cromóforo (fret - fluorescence resonance energy transfer). Este processo também permite a obtenção de informações sobre a conformação dos peptídeos. Discutiremos este processo em mais detalhes a seguir. Neste trabalho vamos utilizar a técnica de fluorescência, principalmente a fret e como técnica auxiliar o cd.

1.3 FRET.

A energia eletrônica absorvida por um cromóforo (doador) pode ser transferida não radiativamente para um outro cromóforo (aceitador) situado a uma distância longa ($\sim 50\text{\AA}$). Este processo é chamado de fret. Esta transferência é o resultado da interação entre os dipolos de transição dos cromóforos (Lakowicz, 1983). Förster (1965) tratou este processo e mostrou que a taxa para a transferência de energia depende principalmente da

superposição entre os espectros de emissão do doador e absorção do aceitador, da orientação relativa dos dipolos de transição do doador e do aceitador e da distância entre as duas sondas. A taxa para o decaimento por transferência de energia é da ordem da taxa para o decaimento por fluorescência, portanto a transferência de energia pode suprimir a fluorescência. A dependência com a distância fez com que a transferência de energia fosse utilizada para medir a distância entre doador e aceitador, seja através do estudo da supressão da fluorescência do doador ou através da sensibilização da fluorescência do aceitador. Estas medidas requerem que o par doador-aceitador esteja separado por uma única distância e que esta distância não varie durante o tempo de decaimento do doador. Com isso é possível obter distâncias entre determinados sítios em peptídeos medindo distâncias entre sondas intrínsecas ou através da incorporação de sondas. Como os peptídeos possuem uma certa flexibilidade e podem assumir diversas conformações, a distância de separação entre as sondas não deve ser única. Através da análise do decaimento do doador é possível obter as distâncias no caso em que os pares doador-aceitadores não estão separados por uma única distância. Neste caso assume-se que há uma distribuição de distâncias e pressupõe-se uma forma analítica, com parâmetros ajustáveis, para esta distribuição.

O emprego de uma forma analítica pode forçar a solução a um tipo de distribuição pré-determinada, o que não é desejável. Neste trabalho procuramos obter a distribuição de distâncias sem o uso de uma forma analítica para a função distribuição de distâncias (Kulinski et al, 1997). As distâncias foram obtidas entre sondas que foram incorporadas as extremidades dos peptídeos baseados na seqüência consensual de peptídeos que interagem com a heparina, que chamaremos, neste trabalho, de Cardin (Fragmentos peptídicos de Cardin) (Cardin e Weintraub, 1989), e entre o Trp⁹ e o o-Abz incorporado ao terminal amino do peptídeo estimulador do melanócito, α -MSH, que serão discutidos a seguir. Estas distâncias podem revelar informações importantes sobre a conformação do peptídeo como, por exemplo, se há somente uma conformação do peptídeo na solução.

1.4 Peptídeos.

Neste projeto empregamos a técnica fret para estudar a estrutura dos peptídeos α -MSH e Cardin e empregamos a fluorescência para estudar o terminal carboxílico da proteína neuroendocrina 7B2, 7B2CT.

1.4.1 7B2CT.

Acredita-se que a *pro-hormone convertase 2* (PC2) media a clivagem de pro-hormônios, tais como, a proinsulina, a proopiomelanocortina e a proencefalina, em peptídeos hormônios bioativos. A maturação da PC2 e a regulação de sua atividade requer a proteína neuroendocrina 7B2. A 7B2 é uma molécula com dupla função: o domínio do terminal amino (resíduos 1 a 151) é capaz de facilitar a maturação da proPC2, e o peptídeo do terminal carboxílico (resíduos 156 a 186) (7B2CT) é um potente inibidor da PC2 (Zhu *et al*, 1996). Foi realizado um estudo da contribuição de cada resíduo do peptídeo 7B2CT na inibição da PC2, fazendo uma varredura por alanina, isto é, trocando cada resíduo por uma alanina (Apletalina *et al*, 2000). Realizamos medidas de fluorescência e de dicroísmo circular no peptídeo 7B2CT e nos peptídeos modificados no intuito de entender a relação entre as mudanças estruturais causadas pela mutação e a atividade inibitória do peptídeo.

1.4.2 α -MSH.

O sistema pigmentar é constituído, principalmente, pelos melanócitos, que são células especializadas na produção de melanina. A melanina é um hetero polímero responsável pela pigmentação preta. Os peptídeos melanotrópicos são hormônios que estimulam o melanócito. Em muitos vertebrados o α -MSH é fisiologicamente relevante na regulação da pigmentação da pele. O α -MSH é um tridecapeptídeo cuja seqüência de aminoácidos é: Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂. Ele é derivado da proteína precursora proopiomelanocortina e é produzido e

secretado pelo lóbulo intermediário da glândula pituitária (hipófise) (Sawyer *et al*, 1980; Al-Obeidi *et al*, 1989; Castrucci *et al*, 1990).

Dos estudos que relacionam a estrutura química e a atividade biológica do α -MSH como um agente de pigmentação, foi estabelecido que o tetrapeptídeo central His-Phe-Arg-Trp é essencial na sua ação (Hruby *et al*, 1984). A exploração das características desta seqüência central conduziu para o desenvolvimento do hormônio análogo, o agonista [Nle4, D-Phe7] α -MSH (NDP- α -MSH). Em bioensaios com pele de sapo o hormônio análogo apresentou um aumento da potência e uma atividade mais prolongada quando comparado com o hormônio nativo α -MSH (Sawyer *et al*, 1980; Al-Obeidi *et al*, 1989a). Esta superpotência do NDP- α -MSH foi atribuída a presença de uma dobra β estabilizada pelo resíduo D-Phe7 e por uma possível ponte salina entre Glu5 – Arg8 ou Glu5 – Lys11 (Sugg *et al*, 1988; Hruby *et al*, 1988; Al-Obeidi *et al*, 1989b).

O peptídeo α -MSH e seu análogo NDP-MSH, contêm os aminoácidos tirosina e triptofano (trp) que são sondas fluorescentes intrínsecas. O estudo da fluorescência do trp permite obter informações nas proximidades do trp no peptídeo, isto é, observações da vizinhança do trp no peptídeo. Uma série de estudos, por fluorescência, do α -MSH e seus análogos, têm sido realizados pelo nosso grupo (Fernandes *et al*, 2003; Ito *et al*, 2001; Souto *et al*, 2000; Nakaie *et al*, 2001; Pascutti PG *et al*, 2001; Macedo *et al*, 1996; Jacchieri *et al*, 1995; Ito *et al*, 1993).

O ácido *orto*-aminobenzóico (*o*-Abz) é uma molécula fluorescente com alto rendimento quântico (0,6 em benzeno) (Melhuish, 1961) e de tamanho pequeno quando comparado com os aminoácidos e com outras sondas fluorescentes; a presença do grupo carboxílico permite que ele seja incorporado ao terminal amino na síntese de peptídeos (Chagas *et al*, 1991). Estas características a tornam uma excelente sonda para estudos de moléculas biológicas usando a técnica de fluorescência, principalmente peptídeos e proteínas (Ito *et al*, 1998; Turchiello *et al*, 1998). O processo de transferência de energia entre um grupo doador (fluorescente) e um aceitador ocorre quando há uma superposição entre o espectro de emissão fluorescente do doador e o espectro de absorção ótica do aceitador. Há uma superposição

entre o espectro de emissão fluorescente do trp e o espectro de absorção ótica do *o*-Abz. Portanto, o *o*-Abz incorporado no terminal amino do peptídeo atua como um supressor de fluorescência do trp por transferência de energia. A taxa para transferência de energia entre o doador e o aceitador depende da distância de separação entre os dois grupos. O estudo da transferência permite a determinação de distâncias entre o trp e o *o*-Abz. O peptídeo α -MSH e seu análogo NDP-MSH foi sintetizado com o *o*-Abz incorporado ao terminal amino.

1.4.3 Cardin.

Os glicosaminoglicanos (GAGs) ligam-se com um grande número de proteínas, fazendo parte de inúmeras funções biológicas, tais como a modulação de enzimas proteolíticas e seus inibidores, a regulação do crescimento celular e a formação da matriz extracelular (Jackson *et al*, 1991). A heparina, que é um glicosaminoglicano, está envolvida no processo de coagulação através de sua interação com a antitrombina. A antitrombina é ativada pela heparina para inibir a trombina e o fator X_a . A protamina é um peptídeo usado para neutralizar a heparina. Este peptídeo causa efeitos colaterais por ser rico em arginina. A procura por peptídeos alternativos a protamina tem sido feita devido aos efeitos colaterais causados pela protamina (Pimenta *et al*, 2002). Os peptídeos Cardin são modelos baseados na seqüência consensual de peptídeos que se ligam a heparina, XBBXBX e XBBBXXBX onde X são aminoácidos hidrofóbicos e B são aminoácidos básicos. A ligação destes peptídeos à heparina pode impedir a ligação dela com a antitrombina, tornando-os assim potenciais neutralizadores da heparina. A heparina é um glicosaminoglicano sulfatado que consiste predominantemente de resíduos $\alpha(1-4)$ de D-iduronato-2-sulfato e N-sulfo-D-glucosamino-6-sulfato alternadamente ligados. Os peptídeos baseados nos fragmentos peptídicos de Cardin foram sintetizados com o *o*-Abz incorporado ao seu terminal amino. O *o*-Abz atua como doador para o etilenodiamina-N-[2,4-dinitrofenil] (Eddnp) que é um cromóforo não fluorescente incorporado ao terminal carboxílico (Souza *et al*, 2000). A transferência de energia entre o *o*-

Abz e o Eddnp incorporados aos terminais dos peptídeos permite o estudo das alterações das conformações destes peptídeos quando na presença de heparina.

Por mais de três décadas o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) tem sido usado como um cossolvente no estudo de peptídeos em solução. Em meu trabalho de mestrado obtivemos resultados de *fret* e de *cd* que mostraram a formação de estruturas mais compactas nos peptídeos bradiginina em de TFE (Souza *et al*, 2000). Resultados de estudos por *nmr* e *cd* mostram que a presença de TFE aumenta a população de hélice- α na formação de estruturas secundárias em misturas TFE/água (Buck, 1998; Hong *et al*, 1999; Jasanoff *et al*, 1994). O mecanismo pelo qual o TFE estabiliza estruturas secundárias nos peptídeos ainda não está bem determinado. Uma possível explicação seria que o TFE reforça as pontes de hidrogênio entre os grupos carbonila e NH amida pela remoção das moléculas de água da proximidade das moléculas do soluto (Luo *et al*, 1997) e/ou pela diminuição da constante dielétrica (Buck, 1998). Além disso, estudos por espalhamento de raio-x em baixo ângulo (Hong *et al*, 1999) mostram que o TFE forma agrupamentos em água conforme a concentração do TFE aumenta até 30% (vol./vol.) de TFE. Reiersen e Rees (2000) propuseram que estes agrupamentos de TFE auxiliam a formação de estrutura secundária gerando uma matriz de solvente que proporciona as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos amino ácidos.

Muitos peptídeos interagem com agregados anfífilicos (Turchiello *et al*, 2000; Souto *et al*, 2000; Macedo *et al*, 1996; Ito *et al*, 1993). As possíveis alterações das conformações, resultantes desta interação podem ser estudadas por fluorescência. Os peptídeos Cardin são ricos em argininas e lisinas e portanto, são carregados positivamente. O dodecil sulfato de sódio (Sodium Dodecyl Sulfate - SDS) é um surfactante aniônico que forma agregados micelares a partir de uma certa concentração (concentração micelar crítica - CMC). Estes agregados, assim como a heparina, são carregados negativamente em sua superfície. Como há uma grande interação entre os peptídeos e a heparina, é de se esperar que também haja interação destes peptídeos com os agregados de SDS.

1.5 Objetivos.

A transferência de energia tem sido usada para acompanhar ensaios sobre a atividade de enzimas proteolíticas (Yaron *et al*, 1979). Essas enzimas têm a importante função de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas permitindo a separação em fragmentos peptídicos. Os grupos doadores e aceptadores ficam muito próximos quando estão incorporados aos terminais dos peptídeos. Isto proporciona uma grande supressão da fluorescência do doador devido a fret. Se houver a hidrólise neste peptídeo, a distância de separação doador-aceitador aumenta, o que resulta num aumento da fluorescência do doador. Portanto, a análise da fluorescência do doador, ligado a um peptídeo que contém um aceitador, na presença e na ausência da enzima proteolítica, permite medir tanto a atividade hidrolítica desta enzima como a sua afinidade com o substrato. O par doador-aceitador *o*-Abz-Eddnp tem sido utilizado para medir a atividade de enzimas proteolíticas (Chagas *et al*, 1991; Juliano *et al*, 1990).

A proposta deste trabalho consiste em explorar as alterações estruturais em peptídeos usando fluorescência estática e resolvida no tempo. Os peptídeos estudados neste trabalho foram o 7B2CT e seus análogos, o α -MSH e os peptídeos Cardin. Fizemos medidas de fluorescência nos peptídeos contendo o par doador-aceitador *o*-Abz-Eddnp incorporado aos seus terminais, isto é, *o*-Abz-peptídeo-Eddnp e contendo o par *trp*-*o*-Abz. Efetuamos medidas experimentais para a obtenção do perfil temporal do decaimento fluorescente da sonda *o*-Abz incorporada aos peptídeos e procuramos obter as distâncias entre doador e aceitador sem impor uma forma definida *a priori* para uma distribuição de distâncias. Determinamos essa distribuição utilizando um programa computacional que modificamos para o ajuste do perfil de decaimento experimental a uma expressão que permitisse descrever a ocorrência simultânea do processo de fret entre *o*-Abz e Eddnp separados por distâncias quaisquer. Como técnica complementar a este estudo utilizamos o dicroísmo circular. Fizemos o estudo em dois solventes: tampão fosfato pH 7.4 e TFE. Com isso, pudemos analisar a mudança nas conformações induzida

pelo solvente, através do exame das distribuições das distâncias entre os terminais dos peptídeos colocados em diferentes solventes.

No capítulo 2 apresentamos uma descrição das técnicas utilizadas neste trabalho. Nele está apresentado uma breve descrição sobre fluorescência e o dicroísmo circular e uma discussão mais detalhada sobre fret que inclui uma dedução clássica e uma quântica para a taxa de fret e sua relação com os dados experimentais. Os materiais e equipamentos utilizados estão apresentados no capítulo 3. No capítulo 4 está apresentada uma descrição do programa utilizado para fazer os ajustes, um teste do programa e a sua aplicação. No capítulo 5 estão apresentados os resultados e as discussões e no capítulo 6 está apresentado a conclusão.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Neste capítulo apresentamos um pouco da teoria e dos fundamentos das técnicas utilizadas neste trabalho. O transferência de energia, por ser a principal técnica utilizada, está descrita com mais detalhes, incluindo uma demonstração semi-clássica e um quântica para a taxa de transferência de energia.

2.1 Fluorescência.

Os estados eletrônicos moleculares têm diferentes estados rotacional-vibracionais. A diferença de energia entre os estados eletrônicos está na região espectral do uv-visível (150 a 700nm). Radiação eletromagnética, nesta região do espectro, é absorvida pelo sistema resultando na sua transição do estado fundamental para os estados excitados. O sistema no estado excitado tende a voltar para o estado fundamental liberando energia. Existem diversos processos de desexcitação. Estes processos estão separados em radiativos e não-radiativos. Os processos não radiativos são aqueles em que a desativação se dá através de processos de liberação de calor para o ambiente, como por exemplo, a relaxação vibracional, que ocorre dentro da curva de energia potencial de um mesmo estado eletrônico e envolve a desativação por liberação de calor através dos modos normais de vibração. Os processos não radiativos, isoenergéticos, envolvendo estados de multiplicidades de spin diferentes são chamados de cruzamento inter-sistemas (do inglês, *intersystem crossing* - ISC). Os processos não radiativos, isoenergéticos, envolvendo estados de mesma multiplicidade de spin são chamados de conversão interna (do inglês, *internal conversion* - IC). Os processos radiativos, isto é, quando há emissão de fótons, são: a fosforescência, quando a multiplicidade de spins dos estados envolvidos é diferente e a fluorescência, quando a multiplicidade de spins dos estados envolvidos é igual. Dentre os processos não radiativos está a FRET que é a principal técnica utilizada neste trabalho; neste processo a energia absorvida por um grupo é transferida não radiativamente e a longa

distância ($\sim 70\text{\AA}$) para um outro grupo. Todos estes processos ocorrem a uma certa taxa k_i ; vamos chamar de k_f a taxa para fluorescência e de k_T a taxa para FRET considerando pares doador-aceitador. A fluorescência pode ser quantificada pela relação entre a taxa de fluorescência e a soma das taxas de todos os processos de desexcitação, esta relação é chamada de rendimento quântico, Φ .

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_T + \sum_{i \neq f, T} k_i} \quad (2.1)$$

A medida do tempo médio em que os elétrons da molécula ficam no estado excitado é dada pelo recíproco da soma de todos os processos de desexcitação, esta quantidade é chamada de tempo de vida τ .

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_T + \sum_{i \neq f, T} k_i} \quad (2.2)$$

O tempo de vida radiativo é o tempo de vida do estado excitado quando só há o decaimento radiativo τ_R . Isto é,

$$\tau_R = \frac{1}{k_f} \quad (2.3)$$

Das equações 2.1, 2.2 e 2.3 resulta

$$\Phi = \frac{\tau}{\tau_R} \quad (2.4)$$

A transição entre os níveis eletrônicos envolve diferentes níveis rotacional-vibracionais conforme ilustra figura 2.1 e cada nível é populado diferentemente. Isto implica em diferentes intensidades de absorção e, portanto de emissão

fluorescente para diferentes comprimentos de onda. Os espectros de absorção e de emissão nos dão a intensidade absorvida e emitida, respectivamente, em função do comprimento de onda.

Figura 2.1 Diagrama de Jablonski

2.1.1 Supressão de fluorescência.

A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

Nesta equação τ_0 e τ são os tempos de vida na ausência e na presença do supressor respectivamente, k_q é a constante de supressão bimolecular, $[Q]$ é a concentração do supressor e $K_D = k_q \tau_0$ é a constante de Stern-Volmer. Fazendo

um gráfico de τ_0/τ pela concentração (Gráfico de Stern-Volmer) podemos a obter a constante de Stern-Volmer.

2.1.2 Anisotropia e Polarização.

O momento de transição dos fluoróforos tem uma orientação definida. Os fótons cujo campo elétrico esteja alinhado paralelamente com momento de transição do fluoróforo serão absorvidos preferencialmente. Em uma solução isotrópica os fluoróforos estão orientados aleatoriamente. Se excitarmos estes fluoróforos com uma luz polarizada, aqueles fluoróforos com momento de transição paralelo ao campo elétrico do feixe de excitação serão seletivamente excitados, o que resultará em uma emissão de fluorescência parcialmente polarizada. A anisotropia de fluorescência (A) e a polarização (p), nas medidas de fluorescência estática, são definidas por

$$A = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (2.5)$$

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad (2.6)$$

em que $I_{||}$ e $I_{\perp}$ são as intensidades de fluorescência verticalmente ($||$) e horizontalmente ($\perp$) polarizada quando a amostra é excitada com uma luz verticalmente polarizada. No caso da fluorescência resolvida no tempo podemos obter o decaimento da anisotropia. A anisotropia resolvida no tempo é dada por

$$A(t) = \frac{I_{||}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (2.7)$$

Podemos descrever o decaimento da anisotropia por uma soma de exponenciais. Isto é

$$A(t) = A_0 \sum_i b_i e^{-\frac{t}{\phi_i}} \quad (2.8)$$

em que ϕ_i é o tempo de correlação rotacional e b_i a anisotropia parcial e A_0 é a anisotropia na ausência de difusão rotacional.

2.1.3 FRET.

Nas moléculas fluorescentes parte da energia luminosa absorvida é liberada pela emissão de fótons. Alguns processos, que ocorrem no intervalo de tempo entre a absorção e a emissão, podem alterar o espectro de fluorescência. Um destes processos é o de transferência de energia. Neste processo a energia absorvida por um dado cromóforo que chamaremos de doador (d) é transferida, sem a emissão de fótons, para um cromóforo que chamaremos de aceitador (a). Este processo pode ser intramolecular, quando há um grupo separador (s) entre o grupo doador e o grupo aceitador, e pode ser intermolecular, quando o doador e o aceitador são independentes. A figura abaixo ilustra os processos intermolecular e intramolecular na transferência de energia.

Esta transferência de energia ocorre devido à interação eletromagnética entre as nuvens eletrônicas dos dois grupos. Considerando esta interação na aproximação de dipolo, conforme será descrito adiante, Förster (1965; um dos primeiros artigos de Förster sobre o tema foi publicado, em alemão, em 1948: *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann Phys, série 6, 2, 55-75, 1948) obteve, para uma dada distância r fixa entre as moléculas, a seguinte taxa para a transferência de energia:

$$k_T = \frac{1}{\tau_d r^6} \frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \Phi_d}{128 \pi^5 n^4 N_0} \int F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (2.11)$$

Φ_d e τ_d são, respectivamente, o rendimento quântico e o tempo de vida do doador na ausência do aceitador, isto é sem a taxa para transferência de energia nas expressões 2.1 e 2.2. n é o índice de refração do meio e N_0 o número de Avogadro. $F_d(\lambda)$ é o espectro normalizado de emissão do doador e $\varepsilon_a(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador. A dependência com as orientações dos momentos de dipolo das duas moléculas é dada por κ^2 , esta quantidade é chamada de fator orientacional e é dada por

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{da} - 3 \cos \theta_d \cos \theta_a)^2 \quad (2.12)$$

em que θ_{da} é o ângulo entre os dipolos de emissão do doador e de absorção do aceitador, θ_d e θ_a são os ângulos entre o vetor $\vec{r}$, que une esses dipolos, e os respectivos dipolos (figura 2.2).

Na expressão 2.11 vemos a integral de superposição espectral, que definiremos como J , conforme expressão 2.13 abaixo. Este integral de superposição representa a intensidade da ressonância entre o estado excitado do grupo doador e o estado fundamental do grupo aceitador.

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (2.13)$$

Figura-2.2. Orientação dos momentos de dipolo do doador e do aceitador.

Podemos notar na taxa para o processo de fret, que é dada em s^{-1} , apresentada na expressão 2.11, a dependência com a distância, (r), de separação entre o grupo doador e o grupo aceitador. É esta dependência que permite obter informações da estrutura das moléculas de interesse. Além desta dependência podemos notar também a dependência com o tempo de vida do doador. O tempo de vida fornece a unidade correta para a taxa de transferência de energia. Portanto, separando a dependência de τ_d e de r^6 , os termos restantes presentes na expressão 2.11 têm unidade de distância a sexta potência. Vamos definir esta distância como R_0 , conforme apresentado na expressão 2.14, onde as constantes foram substituídas por seus valores numéricos.

$$R_0 = 8.8 \times 10^{-25} (\kappa^2 n^{-4} \phi_d J). \quad (2.14)$$

Com estas definições a expressão 2.11 fica

$$k_T = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (2.15)$$

Analisando esta expressão podemos ver que quando a distância, r , de separação entre o grupo doador e o grupo aceitador for igual a R_0 a taxa para o decaimento por fret se iguala a taxa para o decaimento por fluorescência do doador. Quando a distância r for muito maior que R_0 a taxa para fret será muito menor que a de fluorescência e, portanto, a maioria dos doadores decairá por fluorescência. No caso contrário, por um lado a maioria dos doadores decairá por fret e o estudo por medida da fluorescência ficará comprometido e por outro lado, a proximidade entre o grupo doador e aceitador comprometerá o modelo de Förster, que está baseado na interação dipolar entre os grupos. A distância R_0 é chamada de distância crítica de Förster.

A seguir apresentaremos uma dedução clássica (Hoch; Knox, 1968) e uma quântica (Speiser, 1996) da expressão 2.11.

2.1.4 Um tratamento clássico.

Vamos tratar as duas moléculas como duas distribuições de cargas em movimento. Dando energia para o doador vamos estudar a perda desta energia para o aceitador. Primeiramente vamos considerar o campo eletromagnético produzido pelo doador em todos os pontos do espaço e então permitir ao aceitador responder a este campo. Vamos considerar que o comprimento de onda λ é muito maior que as dimensões da molécula, nesta condição podemos obter o campo eletromagnético na aproximação de dipolo. Os campos elétrico (E) e magnético (H) devido ao dipolo elétrico $\vec{P}$ a distâncias da ordem do comprimento de onda são dados (Landau e Lifshitz, 1983) por

$$\vec{E} = \frac{-\mu}{c^2 r} \ddot{\vec{p}} + \frac{1}{\epsilon} \vec{\nabla} \left[\vec{\nabla} \cdot \left(\frac{\vec{p}}{r} \right) \right] \quad (2.16)$$

$$\vec{H} = \frac{1}{c} \vec{\nabla} \times \left(\frac{\dot{\vec{p}}}{r} \right) \quad (2.17)$$

Considere o doador como um dipolo pontual $\underline{d}$ na origem do sistema de coordenadas com um momento $M_d \cos \omega t$ oscilando no eixo-z. Considere um meio, com constante dielétrica $\epsilon(\omega)$, que não absorve energia do campo eletromagnético produzido pelo dipolo $\underline{d}$. As componentes do campo elétrico em um ponto do espaço a uma distância r e um ângulo azimutal θ são:

$$E_r = \frac{2 \cos \theta}{\epsilon(\omega) r^3} M_d \left(\cos \omega t' - \frac{r}{\lambda} \sin \omega t' \right) \quad (2.18)$$

$$E_\theta = \frac{\sin \theta}{\epsilon(\omega) r^3} M_d \left[\left(1 - \frac{r^2}{\lambda^2} \right) \cos \omega t' - \frac{r}{\lambda} \sin \omega t' \right] \quad (2.19)$$

em que $t' = t - \frac{nr}{c}$, $n = \sqrt{\epsilon\mu}$ é o índice de refração do meio e $\lambda = \frac{c}{\omega} = \frac{c}{n\omega}$, λ é o comprimento de onda e ω a velocidade angular da radiação.

Vamos agora tratar o aceitador como um dipolo $\underline{a}$ oscilante e tratar este dipolo com um oscilador amortecido e forçado. Seja então este oscilador composto por uma carga positiva $\underline{e}$ que oscila, no eixo z, em torno de uma carga negativa $\underline{e}$ fixa. Estas cargas de massa m estão ligadas por uma mola de constante k . A carga positiva experimenta uma força de amortecimento $m\gamma \dot{z}$ e uma força externa $F_0 \cos \omega t$. A equação de movimento para a carga positiva fica

$$m\ddot{z} + m\gamma \dot{z} + kz = F_0 \cos \omega t \quad (2.20)$$

A solução estacionária desta equação é dada por

$$z = \frac{F_0}{m} \frac{(\omega_d^2 - \omega^2) \cos \omega t + \omega \gamma \sin \omega t}{(\omega_d^2 - \omega^2)^2 + (\omega \gamma)^2} \quad (2.21)$$

em que $\omega_d = \sqrt{\frac{k}{m}}$ é a freqüência natural do oscilador. A potência dissipada devido a força de amortecimento é $m\gamma \dot{z}^2$. Sua média temporal fica

$$P(\omega) = \frac{F_0^2}{2m} \frac{\gamma \omega^2}{(\omega_d^2 - \omega^2)^2 + (\omega \gamma)^2} \quad (2.22)$$

Vamos considerar o dipolo $\underline{a}$ no eixo z ($\theta = 0$) e calcular a força que o campo eletromagnético produzido por $\underline{d}$ exerce sobre ele. Considerando que a velocidade dos elétrons na molécula é muito menor que a velocidade da luz podemos desprezar a força magnética e considerar somente a força elétrica. Vamos considerar que a distância r de separação entre os dipolos é muito menor que o comprimento de onda do campo produzido por $\underline{d}$, isto é $\frac{r}{\lambda} \ll 1$, de tal modo que o segundo termo na expressão 2.18 possa ser desprezado. Logo a força sobre o dipolo fica

$$F = eE_r = \frac{2M_d e}{\epsilon(\omega)r^3} \cos \omega t' \quad (2.23)$$

Comparando esta expressão com a expressão 2.20 resulta que

$$F_0 = \frac{2M_d e}{\epsilon(\omega)r^3}. \quad (2.24)$$

Assim a potência dissipada fica

$$P(\omega) = \frac{2e^2 M_d^2}{m\epsilon(\omega)^2 r^6} \frac{\gamma \omega^2}{(\omega_d^2 - \omega^2)^2 + (\omega \gamma)^2} \quad (2.25)$$

Nesta última equação já aparece a dependência com r^{-6} . Esta dependência é um resultado importante que aparece na expressão 2.11. Chegamos a este resultado considerando que o doador emite em apenas uma frequência, o que não é verdade. Portanto, vamos somar sobre toda a distribuição de dipolos de frequência ω_i . Então, a potência total fica

$$P(\omega) = \sum_i \frac{2e^2 M_d^2(\omega_i)}{m\epsilon(\omega_i)^2 r^6} \frac{\gamma \omega_i^2}{(\omega_d^2 - \omega_i^2)^2 + (\omega_i \gamma)^2} \quad (2.26)$$

Contudo, o que é observado é uma distribuição contínua de frequências. Então vamos definir uma distribuição de quadrados de momentos de dipolo tal que entre ω e $\omega + d\omega$ o quadrado de momento de dipolo seja $M_d(\omega)^2 d\omega$. Assim

$$P(\omega) = \frac{2e^2}{mr^6} \int \frac{M_d(\omega)^2}{\epsilon(\omega)^2} \frac{\gamma \omega^2}{(\omega_d^2 - \omega^2)^2 + (\omega \gamma)^2} d\omega \quad (2.27)$$

Vamos reescrever esta expressão em termos de quantidades mensuráveis. A secção de choque de absorção que nossa distribuição de dipolos apresenta num campo eletromagnético é dada por

$$\sigma_a(\omega) = \frac{4\pi e^2}{n(\omega)mc} \frac{\gamma \omega^2}{(\omega_d^2 - \omega^2)^2 + (\omega \gamma)^2} \quad (2.28)$$

A potência total irradiada pela distribuição de dipolos $\underline{d}$ na ausência de $\underline{a}$ é

$$P_0 = \int \frac{n(\omega) \omega^4 M_d(\omega)^2}{3c^3} d\omega = \int I_d(\omega) d\omega \quad (2.29)$$

onde $I_d(\omega)$ é definido como a distribuição de intensidades de $\underline{d}$. Assim, a potência dissipada em $\underline{a}$, ou seja, a taxa ($P_{d \rightarrow a}$) de transferência de energia de $\underline{d}$ para $\underline{a}$ fica

$$P_{d \rightarrow a} = \frac{3c^4}{2\pi r^6} \int \frac{I_d(\omega) \sigma_a(\omega)}{\epsilon(\omega)^2 \omega^4} d\omega \quad (2.30)$$

Esta integral de superposição é a mesma que aparece no tratamento quântico de Förster.

Nós consideramos que os dipolos $\underline{d}$ e $\underline{a}$ estavam alinhados na direção $\underline{z}$. Devemos então incluir uma dependência angular na nossa expressão tal que se os dipolos estão orientados nas direções definidas pelos versores $\hat{\epsilon}_A$ e $\hat{\epsilon}_d$ então a transferência de energia dependerá de um fator κ dado por

$$\kappa = \hat{\epsilon}_d \cdot \hat{\epsilon}_a - \frac{3}{r^2} (\hat{\epsilon}_d \cdot \vec{r})(\hat{\epsilon}_a \cdot \vec{r}) \quad (2.31)$$

onde $\vec{r}$ é o vetor posição de $\underline{a}$ com relação a $\underline{d}$. No nosso caso, como os dipolos estão orientados no eixo $\underline{z}$, temos $\hat{\epsilon}_d = \hat{z}$, $\hat{\epsilon}_a = \hat{z}$ e, como tanto o doador como o aceitador estão posicionados no eixo $\underline{z}$, temos $\frac{\vec{r}}{r} = \hat{z}$, então $\kappa = -2$. Assim,

$$P_{d \rightarrow a} = \frac{3c^4 \kappa^2}{8\pi r^6} \int \frac{I_d(\omega) \sigma_a(\omega)}{\epsilon(\omega)^2 \omega^4} d\omega \quad (2.32)$$

Usando a relação entre a seção de choque de absorção e o coeficiente de absorção molar e fazendo uma mudança de variável de frequência angular para número de onda ($\tilde{\nu}$) obtemos

$$P_{d \rightarrow a} = \frac{(2\pi)^4 n^3 c}{3} \frac{9000 \ln(10) \kappa^2}{128 \pi^5 n^4 N_0 r^6} \int \frac{I_d(\tilde{\nu}) \epsilon_a(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (2.33)$$

Vamos fazer a correspondência entre os resultados clássico e quântico. Seja τ_J^{-1} a probabilidade por unidade de tempo para a transferência de energia (k_T) e τ_0^{-1} a probabilidade de d emitir radiação. Vamos igualar a relação entre estas duas probabilidades com a relação entre $P_{d \rightarrow a}$ e P_0 . Assim

$$\frac{k_T}{\tau_0^{-1}} = \frac{P_{d \rightarrow a}}{P_0} \quad (2.34)$$

Então a igualdade acima fica

$$k_T = \frac{1}{\tau_0} \frac{9000 \ln(10) \kappa^2}{128 \pi^5 n^4 N_0 r^6} \int \frac{F_d(\tilde{\nu}) \epsilon_a(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (2.35)$$

onde F é a intensidade de fluorescência normalizada, τ_0 é o tempo de vida do emissor, n o índice de refração e $\epsilon = n^2$ a constante dielétrica.

Lembrando que

$$\frac{1}{\tau_0} = \frac{\Phi_d}{\tau_d} \quad (2.36)$$

A equação 2.35 fica

$$k_T = \frac{1}{\tau_d} \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \Phi_d}{128 \pi^5 n^4 N_0 r^6} \int \frac{F_d(\tilde{\nu}) \epsilon_a(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (2.37)$$

que é o resultado obtido por Förster e é equivalente ao mostrado na expressão 2.11.

2.1.5 Um tratamento quântico.

A taxa de transferência de energia para o processo intramolecular descrito na equação 2.9 é a taxa para a transição do estado $d^* - s - a$ para o estado $d - s - a^*$ deste sistema. A taxa de transição é dada pela regra de ouro de Fermi

$$k_T = \frac{2\pi}{\hbar^2} \sum_i \sum_f P_i V_T^2 \delta(E_i - E_f) \quad (2.38)$$

em que P_i é a distribuição de estados iniciais com energia E_i , E_f são as energias dos estados finais, V_T é o elemento de matriz que descreve o acoplamento entre os estados e $\delta(E_i - E_f)$ é a função delta de Dirac. Vamos considerar apenas a interação Coulombiana entre os estados. Vamos considerar a transição do estado inicial $d^* - s - a$ descrito pela função de onda

$$\Psi_i^s = [\Psi_{d^*}(1)\Psi_a(2)] \quad (2.39)$$

para o estado $d - s - a^*$ descrito por

$$\Psi_f^s = [\Psi_d(1)\Psi_{a^*}(2)]. \quad (2.40)$$

Ψ é a função de onda total incluindo spin. Na aproximação de Born-Oppenheimer podemos separar o movimento dos elétrons do movimento dos núcleos. Desta maneira podemos definir uma função de onda, Φ , para os elétrons em função da posição dos elétrons, $\vec{r}_i$, e da posição dos núcleos, $\vec{R}_i$, e uma função de onda, χ , para os núcleos em função da posição dos núcleos $\vec{R}_i$.

$$\Psi = \Phi(\vec{r}_i, \vec{R}_i) \chi(\vec{R}_i) \quad (2.41)$$

O elemento de matriz que descreve o acoplamento entre os estados inicial e final é

$$V_T = \langle \Psi_i^s | V | \Psi_f^s \rangle = \langle \Psi_d^*(1) \Psi_a(2) | V | \Psi_d(1) \Psi_a^*(2) \rangle \quad (2.42)$$

em que V é a parte da perturbação do Hamiltoniano total, dada por

$$V = \frac{e^2}{\epsilon r_{12}}, \quad (2.43)$$

r_{12} é a distância entre os elétrons e ϵ é a constante dielétrica do meio. Nas condições discutidas no tratamento clássico podemos manter somente o termo de interação dipolo-dipolo da expansão da interação Coulombiana. Logo, o elemento de matriz fica

$$V_T = \frac{1}{\epsilon r^3} \left[\bar{M}_d \cdot \bar{M}_a - \frac{3}{r^2} (\bar{r} \cdot \bar{M}_d)(\bar{r} \cdot \bar{M}_a) \right] \prod_j \langle \chi_i^j | \chi_f^j \rangle \quad (2.44)$$

em que

$$\bar{M}_d = \langle \Phi_d | e \bar{r}_d | \Phi_d^* \rangle \quad (2.45)$$

$$\bar{M}_a = \langle \Phi_a | e \bar{r}_a | \Phi_a^* \rangle \quad (2.46)$$

r_a e r_d são as coordenadas dos elétrons. Substituindo a 2.44 na 2.38 resulta

$$k_T = \frac{2\pi}{\hbar^2} \left[\frac{M_d M_a \kappa}{\epsilon r^3} \right]^2 \sum_{v', v''} P_{iv'} \left\{ \prod_j \left| \langle \chi_{iv'}^j | \chi_{fv''}^j \rangle \right| \right\}^2 \delta(E_i - E_f) \quad (2.47)$$

em que v' e v'' são os números quânticos vibracionais e $P_{iv'}$ é a distribuição de estados iniciais no nível vibracional v' . A expressão para o coeficiente de absorção do aceitador é dada por

$$\varepsilon_a(\omega) = \frac{4\pi^2\omega}{3a''\hbar c} \sum_{v'} \sum_{v''} P_{iv'}^a \left| \left\langle \chi_{fv''}^a \left| M_a \right| \chi_{iv'}^a \right\rangle \right|^2 \delta(\omega_{fv'',iv'}^a - \omega), \quad (2.48)$$

e a expressão para o espectro de emissão fluorescente normalizado do doador é dada por

$$F_d(\omega) = \frac{4\pi^3 a' \tau_d}{3c^3} \sum_{v'} \sum_{v''} P_{iv'}^d \left| \left\langle \chi_{fv''}^d \left| M_d \right| \chi_{iv'}^d \right\rangle \right|^2 \delta(\omega - \omega_{iv',fv''}^d), \quad (2.49)$$

em que a' e a'' são introduzidos devido às propriedades dispersivas do meio e $\omega_{fv'',iv'}$ é a frequência angular correspondente a transição entre o estado final no nível vibracional v'' e o estado inicial no nível vibracional v' .

Usando as expressões 2.48 e 2.49 e a representação integral da função delta de Dirac

$$\delta(\omega_{fv'',iv'}) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(iz\omega_{fv'',iv'}) dz \quad (2.50)$$

e integrando em z , obtemos

$$K_T = \frac{1}{\tau_d} \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \Phi_d}{128 \pi^5 n^4 N_0 r^6} \int \frac{F_d(\tilde{\nu}) \varepsilon_a(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}^4} d\tilde{\nu} \quad (2.51)$$

que é o mesmo resultado obtido classicamente mostrado na equação 2.37

2.1.6 FRET e distância única entre doador e aceitador.

Assim como definimos o rendimento quântico para a fluorescência, vamos definir a eficiência de transferência de energia E como sendo

$$E = \frac{k_T}{k_f + k_T + \sum_{i \neq T, f} k_i} \quad (2.52)$$

Vamos relacionar a eficiência de transferência tanto com o rendimento quântico como com o tempo de vida que são quantidades mensuráveis. Seja Φ_{da} e τ_{da} o rendimento quântico e o tempo de vida do doador na presença do aceitador dados pelas expressões 2.1 e 2.2 respectivamente. Destas expressões obtemos

$$\frac{\tau_{da}}{\tau_d} = \frac{\Phi_{da}}{\Phi_d} = \frac{k_f + \sum_{i \neq T, f} k_i}{k_f + k_T + \sum_{i \neq T, f} k_i} \quad (2.53)$$

Somando e subtraindo $k_f + \sum_{i \neq T, f} k_i$ na expressão 2.52 resulta

$$E = 1 - \frac{k_f + \sum_{i \neq T, f} k_i}{k_f + k_T + \sum_{i \neq T, f} k_i} \quad (2.54)$$

Combinando as expressões 2.53 e 2.54 resulta

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (2.55)$$

$$E = 1 - \frac{\Phi_{da}}{\Phi_d} \quad (2.56)$$

Podemos então obter a eficiência de transferência experimentalmente usando a expressão 2.55 ou a 2.56. Vamos agora relacionar eficiência de transferência com a distância r . Multiplicando e dividindo o lado direito da equação 2.52 por τ_d resulta

$$E = \frac{\tau_d k_T}{\tau_d k_T + 1} \quad (2.57)$$

Substituindo $\tau_d k_T$ da expressão 2.15 nesta última expressão resulta

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.58)$$

Para obtermos r temos que conhecer E e R_0 . R_0 é dado pela expressão 2.14. Nesta expressão só não podemos obter κ^2 experimentalmente. O valor de κ^2 é usado como 2/3, que é o valor médio, para os casos em que o doador e o aceitador estão livres para assumir todas as orientações possíveis durante o processo de transferência. Portanto, usando este valor podemos obter R_0 e o valor de E pode ser obtido experimentalmente. Com isso usando a equação 2.58 pode-se determinar o valor da distância r entre doador e aceitador.

2.1.7 Distribuição de distâncias entre doador e aceitador.

Devemos lembrar que a taxa k_T dada na expressão 2.15 foi obtida considerando-se um único par doador-aceitador cuja distância de separação fosse fixa. Em solução teremos muitos pares doador-aceitadores e cada par está separado por uma certa distância que não é fixa. Portanto, o valor de r obtido por este método não reflete a realidade. Vamos tratar este problema considerando a curva de decaimento da intensidade de fluorescência (Haas et

al, 1975; Steinberg *et al*, 1983). Para simplificar o tratamento vamos considerar que o doador possui um único tempo de vida e que o aceitador não é fluorescente. Portanto, o decaimento da fluorescência do doador na ausência do aceitador é dado por

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_d}\right) \quad (2.59)$$

e na presença é

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_{da}}\right) \quad (2.60)$$

Combinando as expressões para o tempo de vida do doador na presença e na ausência do aceitador resulta

$$\frac{1}{\tau_{da}} = k_T + \frac{1}{\tau_d} \quad (2.61)$$

Substituindo a expressão 2.15 nesta última expressão resulta

$$\frac{1}{\tau_{da}} = \frac{1}{\tau_d} + \frac{R_0^6}{\tau_d r^6}. \quad (2.62)$$

Substituindo a expressão 2.62 na 2.60 resulta

$$I(t) = I_0 \exp\left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r^6}\right)t\right] \quad (2.63)$$

O decaimento da intensidade de fluorescência de cada doador obedecerá a expressão 2.63 e, mesmo na presença do aceitador, continua sendo mono-exponencial.

Considerando que há um aceitador para cada doador e que cada par está separado por uma distância r_i , o decaimento de fluorescência será uma soma sobre todos os pares. Como todos os pares, cuja distância de separação for a mesma, contribuirão com $f(r_i)$ para o decaimento, teremos

$$I(t) = I_0 \sum_i f(r_i) \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r_i^6} \right) t \right] \quad (2.64)$$

Para uma distribuição contínua $f(r)$ de distâncias e para um caso genérico em que o decaimento do doador não é mono-exponencial teremos

$$I(t) = \sum_i a_i I_0 \int_0^{\infty} f(r) \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_{di}} - \frac{R_0^6}{\tau_{di} r^6} \right) t \right] dr \quad (2.65)$$

em que a_i é o fator pré-exponencial do decaimento com o tempo de vida τ_{di} .

Esta expressão nos dá a relação entre o decaimento da intensidade de fluorescência e a distribuição de distâncias existente na solução. Se considerarmos que no intervalo de tempo em que ocorre a transferência de energia as moléculas permanecem fixas, poderemos obter a distribuição de distâncias $f(r)$ comparando o decaimento da intensidade de fluorescência obtido experimentalmente com o dado pela expressão 2.65. Para fazermos esta comparação precisamos determinar qual é a função $f(r)$ que devemos colocar no lado direito da expressão 2.65 de tal modo que este lado da equação se iguale ao lado esquerdo, obtido experimentalmente. Para isto utilizamos um programa desenvolvido por Provencher (1982a, 1982b) para inversão de equações integrais lineares do tipo que aparece na expressão 2.65. Este programa será descrito no capítulo-4.

2.2 Dicroísmo Circular.

Como técnica auxiliar, utilizamos o dicroísmo circular (cd). Faremos a seguir uma descrição resumida desta técnica (Cantor; Schimmel, 1980; Woody, 1996).

A absorção de luz circularmente polarizada por moléculas assimétricas se dá em diferentes intensidades para diferentes direções de polarização. A combinação de uma luz circularmente polarizada à direita com uma luz circularmente polarizada à esquerda resulta em uma luz linearmente polarizada. A luz circularmente polarizada é descrita pelo seguinte campo elétrico

$$E_{\pm} = E_0(\hat{i} \pm i\hat{j}) \exp([2\pi i(vt - \frac{z}{\lambda})]) \quad (2.66)$$

em que $\hat{i}$ e $\hat{j}$ são os vetores unitários nas direções x e y respectivamente, + e - referem-se a luz circularmente polarizada à direita e esquerda respectivamente. O dicroísmo circular é definido como a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada a esquerda e a absorção da luz circularmente polarizada direita, isto é,

$$\Delta A = A_e - A_d = (\epsilon_e - \epsilon_d)C\ell = \Delta\epsilon C\ell \quad (2.67)$$

em que C é a concentração molar, ℓ é o caminho ótico e ϵ_e e ϵ_d são o coeficiente de absorção molar do soluto para a luz circularmente polarizada a esquerda (e) e a direita (d) respectivamente.

Quando uma luz linearmente polarizada passa por um meio assimétrico ela se torna elipticamente polarizada. Uma medida do dicroísmo circular é a elipticidade que é a razão entre os semi-eixos menor e maior da elipse. Esta razão é a tangente do ângulo θ , figura-2.3, que vamos aproximar por θ pois este ângulo é normalmente muito pequeno.

$$\theta(\text{rad}) \approx \tan(\theta) = \frac{(|E_e| - |E_d|)}{(|E_e| + |E_d|)} = \frac{\exp\left(-\frac{A_e}{2}\right) - \exp\left(-\frac{A_d}{2}\right)}{\exp\left(-\frac{A_e}{2}\right) + \exp\left(-\frac{A_d}{2}\right)} \quad (2.68)$$

Figura-2.3

Expandindo em series as exponenciais da expressão 2.68, considerando apenas os termos de ordem um de ΔA e mudando de radianos para graus resulta

$$\theta(\text{grau}) = \Delta A \frac{180}{4\pi} \ln 10 \quad (2.69)$$

Para compararmos espectros diferentes é conveniente definirmos a elipticidade molar $[\theta]$ que é dada em função da concentração molar (C) da amostra e do caminho ótico (ℓ) da cela utilizada.

$$[\theta] = \frac{100\theta}{C\ell} \quad (2.70)$$

Quando queremos comparar espectros de peptídeos é conveniente obter a elipticidade molar em termos do número de resíduos (N_r) e da massa molecular (M) do peptídeo. Portanto, a elipticidade molar residual fica

$$[\theta] = \frac{100\theta}{C\ell} \frac{M}{N_r} \quad (2.71)$$

Os espectros de cd são sensíveis a mudanças na estrutura secundária dos peptídeos. Em nosso trabalho procuramos identificar mudanças na estrutura secundária provocadas pela mudança de tampão fosfato para o (TFE) usando a medida de distâncias entre os terminais dos peptídeos.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais.

Os peptídeos Cardin e 7B2CT foram sintetizados pelo grupo do Prof. Luis Juliano e os peptídeos α -MSH pelo grupo do Prof. Clóvis Ryuichi Nakaie, ambos do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina.

3.1.1 7B2CT.

Os peptídeos 7B2CT e análogos estudados estão na tabela-1. No análogo A18 foi substituída a lys¹⁸ uma alanina e no análogo A12 foi substituído o Asp¹² da posição 12 por uma alanina.

Nome	Peptídeo
7B2CT	S ¹ V ² N ³ P ⁴ Y ⁵ L ⁶ Q ⁷ G ⁸ Q ⁹ R ¹⁰ L ¹¹ D ¹² N ¹³ V ¹⁴ V ¹⁵ A ¹⁶ K ¹⁷ K ¹⁸ -CO-NH ₂
A18	S ¹ V ² N ³ P ⁴ Y ⁵ L ⁶ Q ⁷ G ⁸ Q ⁹ R ¹⁰ L ¹¹ D ¹² N ¹³ V ¹⁴ V ¹⁵ A ¹⁶ K ¹⁷ A ¹⁸ -CO-NH ₂
A12	S ¹ V ² N ³ P ⁴ Y ⁵ L ⁶ Q ⁷ G ⁸ Q ⁹ R ¹⁰ L ¹¹ A ¹² N ¹³ V ¹⁴ V ¹⁵ A ¹⁶ K ¹⁷ K ¹⁸ -CO-NH ₂

Tabela-3.1. Peptídeos 7B2CT e análogos.

Soluções estoque dos peptídeos 7B2CT e análogos foram preparadas na concentração de 1mM em tampão fosfato 0,01M pH 7,4 e diluídos para 50 μ M para medidas de fluorescência e absorção ótica e 100 μ M para medidas de dicroísmo circular. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente (~25°C). Para medidas de dicroísmo circular utilizamos celas de 0,2mm de caminho ótico. Fizemos estudo por supressão de fluorescência utilizando o iodeto de potássio (KI) na presença de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) para evitar a formação de I₂.

3.1.2 α -MSH.

Os peptídeos α -MSH e NDP-MSH estudados estão na tabela-2.

Nome	Peptídeo
α -MSH	$\text{CH}_3\text{-CO-NH-SYSMEHFRWGKPV-CO-NH}_2$
NDP- α -MSH	$\text{CH}_3\text{-CO-NH--SYS(Nle)EH(D-PHE)RWGKPV-CO-NH}_2$

Tabela-3.2. Peptídeo α -MSH e análogo

Soluções estoque dos peptídeos foram preparadas na concentração de 1mM em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 e diluídas para 50 μ M nas medidas de fluorescência e absorção ótica. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$).

3.1.3 Cardin.

A tabela 3.1 apresenta os peptídeos Cardin. A tabela também apresenta a constante de dissociação (K_d) da interação destes peptídeos com a heparina. Estudamos os peptídeos que apresentaram maior constante de associação ($1/K_d$) com a heparina. São eles: o KK4, o RKK4 e o RKK3

Soluções estoque dos peptídeos foram preparadas na concentração de 1mM em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 e diluídas para 50 μ M nas medidas de fluorescência e absorção ótica. As medidas foram realizadas em temperatura de 37°C .

3.1.4 Experimento de FRET.

Para obtermos as distâncias utilizando fret é necessário três amostras: a molécula de interesse modificada somente com o grupo aceitador, a molécula de interesse modificada somente com o grupo doador e a molécula de interesse modificada com os dois grupos. Da molécula que contém somente o grupo doador obtemos o tempo de vida do doador, τ_d , o rendimento quântico do doador, Φ_d , o espectro de emissão fluorescente do doador, $F_d(\lambda)$. Da molécula que contém somente o grupo aceitador obtemos o coeficiente de absorção molar do aceitador, $\epsilon_a(\lambda)$. Com estes dados obtemos o R_0 do par doador aceitador. Da molécula que contém o grupo doador e o grupo aceitador obtemos o decaimento da intensidade de fluorescência do doador na presença

do aceitador. Com este último dado, com τ_d e com R_0 obtemos a distribuição de distâncias entre o grupo doador e o grupo aceitador usando o programa CONTIN modificado.

Nome	Peptídeo	K_d (nM)	n
KK1	Abz-AKKARAQ-Eddnp	N.I.	-
KK2	Abz-AKKARAACKKARAQ-Eddnp	2690 ± 80	0,5
KK3	Abz-AKKARAACKKARAACKKARAQ-Eddnp	153 ± 15	1,0
KK4	Abz-AKKARAACKKARAACKKARAACKKARAQ-Eddnp	82 ± 5	0,9
RKK1	Abz-ARKKAAKAQ-Eddnp	N.I.	-
RKK2	Abz-ARKKAAKAARKKAAKAQ-Eddnp	1103 ± 20	0,7
RKK3	Abz-ARKKAAKAARKKAAKAARKKAAKAQ-Eddnp	21 ± 4	1,1
RKK4	Abz-ARKKAAKAARKKAAKAARKKAAKAARKKAAKA-Eddnp	8 ± 1	0,9
KKA	Abz-AKKARAACKKARAACKKARAQ-NH2	N.D.	-
KKQ	AKKARAACKKARAACKKARAQ-Eddnp	N.D.	-

Tabela 3.1 Peptídeos Cardin e constante de dissociação, K_d , da sua interação com a heparina de baixo peso molecular, corrigido como uma função $(K_d)^n$ da estequiometria n . N.I. não detectado interação com a heparina. N.D. não foi determinado a interação com a heparina. As condições para determinação do K_d foram 50mM de Tris/HCL, pH 7,4, 100nM NaCl, 37°C. (Pimenta *et al*, 2002)

3.1.5 Mistura Tampão/TFE.

Para cada peptídeo preparamos duas soluções estoque, na concentração de 1mM; uma solução em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 e uma solução em TFE. Diluímos os estoques para 50 μ M e fizemos as misturas TFE/tampão a partir destas soluções diluídas.

3.1.6 Titulação.

Para medidas de titulação começamos com uma solução 34 μ M de peptídeo em tampão e acrescentamos alíquotas de heparina 220 μ M em tampão HEPES 10mM pH 7,4. Após cada adição de heparina esperamos dez minutos para fazer as medidas. Fizemos este procedimento para o peptídeo RKK3 e para os peptídeos controle KKA e KKQ. O valor da concentração do

peptídeo foi corrigido devido a adição das alíquotas de heparina. As medidas foram feitas na temperatura de 25°C.

3.1.7 SDS.

As medidas com SDS foram feitas na concentração de 150mM de SDS e 20μM de RKK3.

O rendimento quântico da fluorescência do KKA foi obtido comparando as medidas de fluorescência do KKA com as do *o*-Abz em benzeno que tem um rendimento quântico de 0,6 (Melhuish, 1961)

A heparina usada é a de baixo massa molecular (4500 Da, massa modal) adquirida da Aventis.

As sondas que utilizamos são o *o*-Abz e o Eddnp (figura 3.1).

O *o*-Abz foi incorporado no terminal amino e o Eddnp no terminal carboxila dos peptídeos. Os peptídeos foram sintetizados com a glutamina no terminal carboxílico para que pudesse ser incorporado o Eddnp. As sondas e os peptídeos com as sondas incorporadas foram sintetizados pelo Laboratório de Biofísica da Escola Paulista de Medicina.

Figura 3.1 Estrutura molecular do *o*-Abz e do Eddnp

Como solvente utilizamos o tampão fosfato na concentração de 0,01M e pH=7,4 e o trifluoroetanol (TFE) da Aldrich Chemical Company Inc. Os dados apresentados foram obtidos com as amostras na concentração de 50μM e na temperatura de 22°C.

3.2 Equipamentos.

3.2.1 Absorção Óptica.

Os espectros de absorção ótica foram obtidos usando o espectrofotômetro HP-8452A. A figura 3.2 mostra o esquema ótico do espectrofotômetro que descreveremos a seguir.

Duas lâmpadas são usadas como fonte de luz, uma lâmpada de deutério que emite na região entre 190 e 380nm e uma lâmpada de tungstênio que emite na região entre 380 e 820nm. A luz emitida pela lâmpada passa por uma lente colimadora. O feixe colimado que sai da lente passa pela amostra e depois por outra lente que então o focaliza novamente para passar pela fenda. Após sair da fenda, o feixe atinge uma grade que o separa em todos os comprimentos de onda e esta o reflete para o conjunto de fotodiodos.

Foram utilizadas cubetas de quartzo de 10mm de caminho ótico.

Figura-3.2 Esquema ótico do espectrofotômetro.

3.2.2 Fluorescência de Estado Estacionário.

As medidas de fluorescência de estado estacionário foram feitas no espectrofluorímetro ISA JOBIN YVON - SPEX Instruments S.A., Inc. A figura-3.3 mostra um diagrama esquemático do espectrofluorímetro que descreveremos a seguir.

Uma lâmpada de xenônio é usada como fonte de luz para excitação. Esta lâmpada emite intensidade alta em todos os comprimentos de onda no intervalo entre 250nm e 1000nm. A luz emitida pela lâmpada passa pelo monocromador de excitação e por uma fenda, que tem a abertura variável, antes de atingir a amostra. O monocromador permite a seleção de comprimentos de onda específicos e a fenda o controle da intensidade do feixe e a resolução no comprimentos de onda. A amostra vai então para o estado excitado e decai emitindo luz que passa pelo monocromador de emissão e atinge uma fotomultiplicadora. A luz emitida pela amostra é detectada a 90° da luz que a excita. Os sinais de saída da fotomultiplicadora são processados pelo computador via conversor analógico-digital e transmitidos ao vídeo. Um software controla os monocromadores e a fenda e trata os dados.

Foram utilizadas cubetas de quartzo de 10mm de caminho ótico. Utilizamos a abertura da fenda em 1nm. O *o*-Abz foi excitado em 310nm.

Figura-3.3 Esquema do espectrofluorímetro.

3.2.3 Fluorescência resolvida no tempo.

A técnica utilizada para a obtenção do decaimento da intensidade de fluorescência baseia-se no método de contagem de fóton único. Neste método a amostra é excitada por um pulso de luz e os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra, obtendo-se o perfil de decaimento. A figura 3.4 apresenta um esquema genérico de um espectrofluorímetro com resolução temporal. O esquema está dividido em duas partes: 1ª. *Sistema de detecção e aquisição de dados*, 2ª. *Sistema de excitação*.

Sistema de detecção e aquisição de dados: Uma fotomultiplicadora de partida (R3809U, Hamamatsu) detecta o pulso de excitação e envia o sinal para um conversor tempo-amplitude (TAC) que inicia a subida de uma rampa de tensão. Um pulso de luz emitido pela amostra fluorescente é detectado por uma fotomultiplicadora de parada (R3809U, Hamamatsu) que envia um sinal para o TAC interrompendo a rampa de tensão. O valor da tensão é proporcional ao tempo transcorrido entre a excitação e a emissão e um analisador multicanal (MCA) computa a ocorrência desse evento e o seu tempo correspondente. O processo repete-se a cada pulso de excitação e ao final de um número estatisticamente significativo de eventos (10^5 contagens) obtém-se um histograma descrevendo o decaimento temporal da fluorescência. Os elementos ópticos e eletrônicos do espectrômetro são da Edinburg Instruments (OB900)

Sistema de excitação: A fonte de excitação usada é um sistema que tem como ponto de partida um laser de Argônio (2060-10 SA, Spectra Physics) cujas transições 4p e 4s produzem diversas linhas entre 4545 a 5287 ângstrons (figura-3.5). A luz de saída deste laser, com potência integrada na faixa entre 6,0 e 10,0W, bombeia um laser de Titânio-safira (3950, Spectra Physics) que gera pulsos de laser que podem ser sintonizados na faixa compreendida entre 840 e 1000nm (figura-3.6) e com frequência de repetição dos pulsos de 82MHz. Estes pulsos passam por um selecionador de pulsos (3980-25, Spectra Physics) que permite a operação em frequências, na faixa de 0,08 a 4MHz, mais adequadas ao método de contagem de fótons.

Finalmente o laser passa por um gerador de terceiros harmônicos (GWN-23PL, Spectra Physics), de modo que o feixe emergente tem comprimentos de onda sintonizados na região entre 280 e 333nm. Estes equipamentos estão disponíveis no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo.

Figura-3.4 Diagrama do fluorímetro com resolução temporal

Figura-3.5 Sistema de excitação

Figura-3.6 Sistema de detecção e aquisição de dados

3.2.4 Dicroísmo Circular.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectropolarímetro CD6 JOBIN YVON pertencente ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Utilizamos celas de quartzo de caminho ótico de 1mm e de 0,2mm.

4 PROGRAMA DE AJUSTE

Para obtermos a função distribuição de distâncias $f(r)$, definida na expressão 2.64, utilizamos o programa CONTIN desenvolvido por Provencher (1982a, 1982b). O programa inverte equações integrais lineares do tipo

$$y(t_k) = \int_a^b F(r, t_k) f(r) dr + \sum_{j=1}^{N_L} L_{kj} \beta_j, \quad k = 1, \dots, N_y \quad (4.1)$$

em que a função $F(r, t_k)$ e os pontos experimentais $y(t_k)$ para cada t_k são conhecidos e $f(r)$ é a função a ser obtida. No segundo termo do lado direito da equação 4.1 L_{kj} é conhecido e β_j é determinado pelo programa; este termo permite, por exemplo, que uma constante, β_1 , seja incluída fazendo $N_L=1$ e todos os $L_{k1}=1$.

No nosso estudo, $y(t_k)$ é a intensidade $I(t_k)$ nos pontos t_k que obtivemos experimentalmente conforme descrito no capítulo 2. A função $F(r, t_j)$ é a exponencial que aparece na integral da equação 2.65 e que está reescrita na equação 4.2 a seguir

$$F(r, t_j) = \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_d} - \frac{R_0^6}{\tau_d r^6} \right) t_j \right] \quad (4.2)$$

Finalmente $f(r)$ é a distribuição que queremos obter. Com a somatória podemos corrigir a contribuição para o decaimento de algum fluoróforo presente no sistema que não participe do processo de transferência de energia. Podemos fazer isso escrevendo

$$L_{kj} = e^{-\frac{t_k}{\tau_j}}, \quad (4.3)$$

em que τ_j é o tempo de vida do fluoróforo. Apresentaremos agora o método utilizado no programa para a obtenção da solução.

4.1 Formação das equações lineares.

Inicialmente a equação 4.3 é convertida automaticamente, por integração numérica, no sistema de equações lineares

$$y(t_k) = \sum_{i=1}^{N_r} f(r_i) F(r_i, t_k) + \sum_{j=1}^{N_l} L_{kj} \beta_j, \quad k = 1, \dots, N_y \quad (4.4)$$

A solução é então determinada nos pontos r_i .

4.2 Vínculos.

O programa permite que se imponham os seguintes vínculos à solução, $f(r_j)$:

$$\sum_{j=1}^N D_{ij} f(r_j) \geq d_i, \quad i = 1, \dots, N_{ineq} \quad (4.5)$$

$$\sum_{j=1}^N E_{ij} f(r_j) = e_i, \quad i = 1, \dots, N_{eq} \quad (4.6)$$

em que N_{ineq} , N_{eq} e os vetores E , e , D e d devem ser especificados de acordo com o vínculo que se queira impor à solução. Com estes vínculos podemos, por exemplo, impor que a solução seja estritamente positiva e isto é o que precisamos impor para $f(r)$.

4.3 Regularização.

O método mais usado para resolver um sistema de equações lineares é o método dos mínimos quadrados, isto é, encontrar a solução $\mathbf{f}$ tal que

$$V(0) = \left\| \mathbf{M}^{-\frac{1}{2}}(\mathbf{y} - \mathbf{F}\mathbf{f}) \right\|^2 = \text{mínimo} \quad (4.7)$$

em que $\mathbf{y}$ é o vetor com os N_y elementos $y(t_i)$, $\mathbf{f}$ é o vetor com os N_r elementos $f(r_j)$, $\mathbf{F}$ é a matriz com os $N_r \times N_y$ elementos $F(r_j, t_i)$ e $\mathbf{M}$ é a matriz de covariância. O programa usa este mesmo método com um termo adicional, o regularizador, com o qual podemos impor algum conhecimento estatístico prévio ou que seja encontrada a solução "mais simples" (princípio da parcimônia). O termo "simples" significa uma solução que não contenha descontinuidades ou picos extras. O programa encontra a solução $\mathbf{f}$, sujeita aos vínculos estabelecidos pelas equações 4.5 e 4.6, tal que

$$V(\alpha) = \left\| \mathbf{M}^{-\frac{1}{2}}(\mathbf{y} - \mathbf{F}\mathbf{f}) \right\|^2 + \alpha^2 \|\mathbf{x} - \mathbf{X}\mathbf{f}\|^2 = \text{mínimo} \quad (4.8)$$

em que $\mathbf{x}$ e $\mathbf{X}$ podem ser especificados pelo usuário ou podem ser especificados pelo programa, conforme veremos a seguir e α , a constante de regularização, é determinada automaticamente pelo programa.

Para encontrar a solução "mais simples" o programa estabelece um regularizador da forma

$$\|\mathbf{x} - \mathbf{X}\mathbf{f}\|^2 = \int_a^b [f''(r)]^2 dr \quad (4.9)$$

em que as aspas significam segunda derivada. É feita então uma integração numérica no lado direito da equação 4.9 com os r_i igualmente espaçados para

que se possa estabelecer o vetor $\mathbf{x}$ e a matriz $\mathbf{X}$, o programa faz isto automaticamente.

4.4 Região de confiança.

O programa define uma região de confiança usando a distribuição de Fisher para F que é dada por

$$F = \frac{V(\alpha) - V(\alpha_0)}{V(\alpha_0)} \frac{N_y - N_{DF}}{N_{DF}(\alpha_0)} \quad (4.10)$$

em que α_0 é o α cujo $V(0)$ é mínimo e N_{DF} é o número de graus de liberdade que é determinado pelo programa. A solução é então encontrada variando-se o parâmetro de regularização α de tal forma que a solução esteja dentro da região de confiança.

4.5 Testes de implementação do programa.

O programa CONTIN foi implementado no microcomputador Pentium-II MMX. Para testar o programa geramos a curva de decaimento exponencial dada na equação 2.65 usando como distribuição $f(r)$ uma curva composta por duas gaussianas conhecidas. Os resultados estão apresentados na figura 4.1, onde a linha contínua representa a curva usada para gerar o decaimento, os quadrados, a curva gerada pelo programa e os círculos, a curva obtida pelo programa normalizada pela área da curva dada.

Vemos que o programa gerou a curva dada, a menos de um fator de normalização. Note-se que as posições e as larguras dos picos obtidos pelo programa coincidem com os parâmetros de entrada. Além disso, as razões relativas entre os máximos também são mantidas.

Figura-4.1 - Teste do programa

4.6 Aplicação do Programa.

O programa foi aplicado aos decaimentos de fluorescência dos peptídeos derivados da bradicinina, em tampão fosfato pH 7.4 e em TFE. Na expressão $F(r, t_k)$, apresentada na expressão 4.2 e que está na expressão deduzida no capítulo 2 para a transferência de energia entre pares doador-aceitador separados por distâncias r quaisquer, foi acrescentado o perfil da lâmpada e o fato do doador não ser mono-exponencial, como é o caso do *o*-Abz em TFE que veremos no capítulo 5. Com isso a expressão para $F(r, t)$ fica

$$F(r, t) = \sum_{i=1}^N a_i \int_0^t L(t-t') \exp \left[\left(-\frac{1}{\tau_{di}} - \frac{R_0^6}{\tau_{di} r^6} \right) t' \right] dt' \quad (4.11)$$

em que a_i e τ_{di} são, respectivamente, os fatores pré-exponenciais e os tempos de vida do decaimento do doador na ausência do aceitador e $L(t)$ é o perfil da lâmpada. Modificamos o programa para estabelecer esta expressão para $F(r,t)$. Como vínculo, utilizamos a expressão 4.5 para impor uma solução positiva. Como regularizador utilizamos o princípio da parcimônia que também é estabelecido pelo programa automaticamente. Os dados de entrada foram os valores $I(t)$ correspondentes a $y(t_k)$ na expressão 4.4, o perfil da lâmpada $L(t)$, o valor de R_0 , os tempos de vida e os respectivos fatores pré-exponenciais do doador. O conjunto de valores r_i foi escolhido com base na distância para o peptídeo na conformação estendida. Os dados de saída do programa estão na matriz $f(r)$ da equação 4.4 e que correspondem a função de distribuição desejada $f(r)$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 7B2CT.

5.1.1 Absorção.

Na figura 5.1.1 está apresentado o espectro de absorção ótica da tirosina na concentração de $50\mu\text{M}$ em tampão fosfato $0,01\text{M}$ pH 7,4. A posição do máximo de absorção da tirosina é em 276nm . Na figura 5.1.2 está a absorção, em 276nm , da tirosina em tampão fosfato $0,01\text{M}$ pH 7,4 em diferentes concentrações. Fazendo uma regressão linear neste gráfico podemos obter o coeficiente de absorção molar da tirosina em 276nm que é de $1312,7\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, em concordância com os dados da literatura (Cantor *et al*, 1980).

Figura-5.1.1 Espectro de absorção da tirosina $50\mu\text{M}$ (linha tracejada) e do 7B2CT $50\mu\text{M}$ (linha sólida) em tampão fosfato $0,01\text{M}$ pH 7,4.

Na figura 5.1.1 mostra-se também o espectro de absorção do peptídeo 7B2CT em tampão fosfato $0,01\text{M}$ pH 7,4. O espectro é semelhante ao da

tirosina, com a mesma posição do máximo. A absorbância é um pouco maior, provavelmente, devido a contribuição da absorção das ligações peptídicas.

Figura-5.1.2 Absorbância da tirosina, em tampão fosfato 0,01M pH 7,4, em diferentes concentrações.

5.1.2 Fluorescência Estática.

Na figura 5.1.3 estão os espectros de fluorescência da tirosina e do 7B2CT, ambos na concentração de 50μM em tampão fosfato 0,01M pH 7,4. Tanto a tirosina quanto o 7B2CT foram excitados em 276nm sendo que o máximo de emissão ocorreu em 305nm para a tirosina e em 308nm para o 7B2CT. A tabela 5.1.1 mostra os resultados dos dados espectrais obtidos. Calculamos o rendimento quântico da tirosina e do 7B2CT usando como referência o rendimento quântico do *o*-Abz em benzeno que é de 0,6 (Melhuish, 1961).

Figura-5.1.3 Espectros de fluorescência da tirosina 50 μ M (linha tracejada) e do 7B2CT 50 μ M (linha sólida) em tampão fosfato 0,01M pH 7,4, normalizados pela absorção em 276nm. $\lambda_{exc.} = 276$ nm.

Para o cálculo do rendimento quântico da tirosina (ϕ_{tyr}) utilizamos a integral do espectro de fluorescência da tirosina (F_{tyr}) normalizado pela absorção em 276nm e do *o*-Abz em benzeno (F_{abz}) normalizado pela absorção em 310nm. O rendimento quântico da tirosina com relação ao rendimento quântico do *o*-Abz é dado pela seguinte expressão

$$\phi_{tyr} = \phi_{abz} \frac{F_{tyr}}{F_{abz}} = 0,6 \frac{1,83E8}{7,15E9} = 0,015.$$

Da mesma forma calculamos o rendimento quântico do 7B2CT

$$\phi_{7b2CT} = \phi_{abz} \frac{F_{7b2CT}}{F_{abz}} = 0,6 \frac{6,80E7}{7,15E9} = 0,006.$$

	$\lambda_{\text{máx}}^a$	$\lambda_{\text{máx}}^e$	Φ
Tirosina	276	305	0,015
7B2CT	276	308	0,006

Tabela-5.1.1. Dados espectrais da tirosina livre e no 7B2CT. $\lambda_{\text{máx}}^a$ (nm), $\lambda_{\text{máx}}^e$ (nm) – comprimento de onda no máximo de absorção e de emissão respectivamente, Φ - rendimento quântico.

5.1.3 Fluorescência Resolvida no Tempo.

Na figura 5.1.4 mostramos os decaimentos da intensidade de fluorescência da tirosina e do 7B2CT na concentração de 50 μ M em tampão fosfato 0,01M pH 7,4. Os decaimentos foram mais bem ajustados por funções bi e tri-exponencial. Na tabela 5.1.2 estão apresentados os resultados obtidos dos ajustes pelo decaimento.

	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle\tau\rangle$
Tirosina	3,270	0,423	-	0,093	0,018	-	3,200
7B2CT	4,500	2,075	0,496	0,079	0,103	0,078	3,393

Tabela 5.1.2. Tempos de vida (τ_i (ns)), fatores pré-exponenciais (a_i) e tempo de vida médio $\langle\tau\rangle$ (ns) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência da tirosina e do 7B2CT.

Figura-5.1.4. Decaimentos da intensidade de fluorescência da tirosina livre (a) e da tirosina no 7B2CT (b), ambos em tampão fosfato 0,01M pH 7,4 e concentração de 50 μ M. $\lambda_{\text{exc.}} = 285\text{nm}$ $\lambda_{\text{em.}} = 305\text{nm}$

Os tempos de vida curtos que aparecem tanto para a tirosina livre como para a tirosina no 7B2CT devem-se ao espalhamento da luz de excitação. Este espalhamento pode ser observado na figura 5.1.4, onde aparece como um decaimento rápido próximo ao pico. Desconsiderando os tempos de vida devido ao espalhamento, a tirosina livre é praticamente mono-exponencial enquanto que o 7B2CT é ajustado adequadamente por duas exponenciais. Os dados espectrais obtidos para a tirosina livre estão de acordo com os dados presentes na literatura (Ross *et al*, 1992). Um tempo de vida médio foi calculado a partir da equação 5.1.1 e os valores para a Tyr livre e 7B2CT são comparáveis entre si (Tabela 5.1.2). Dado que os rendimentos quânticos do fluoróforo livre e no peptídeo diferem bastante, as taxas de decaimento intrínseco da fluorescência da Tyr se modificam quando ela faz parte do peptídeo.

$$\tau_m = \frac{\sum_i a_i \tau_i^2}{\sum_i a_i \tau_i} \quad 5.1.1$$

5.1.4 Titulação.

Realizamos uma titulação do 7B2CT em tampão HEPES 5mM pH 5,4 com a adição de NaOH 0,5mM. Na tabela 5.1.3 estão os tempos de vida e as respectivas amplitudes obtidas dos ajustes dos decaimentos para cada pH. Para estas medidas o comprimento de onda de excitação foi de 290nm e a emissão foi em 310nm. Há uma contribuição do espalhamento na emissão devido à proximidade da emissão com a excitação. Portanto, o tempo de vida curto pode ser devido ao espalhamento da luz de excitação. Na figura 5.1.5 apresentamos a contribuição relativa (%) de cada tempo de vida, obtida do ajuste, com a variação do pH. A contribuição relativa é obtida usando-se a seguinte expressão

$$ar_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_i a_i \tau_i} 100$$

5.1.2

pH	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle \tau \rangle$
6,08	6,709	2,031	0,287	0,015	0,085	0,106	3,753
7,07	6,377	1,956	0,247	0,016	0,090	0,126	3,578
7,90	5,840	1,890	0,261	0,019	0,097	0,134	3,379
9,56	5,716	1,848	0,214	0,016	0,070	0,126	3,450
9,95	5,686	1,860	0,241	0,015	0,052	0,095	3,653
10,55	5,691	1,790	0,218	0,014	0,030	0,076	4,120
11,43	5,834	1,288	0,126	0,013	0,009	0,113	5,231
12,45	5,675	1,226	0,190	0,011	0,003	0,052	5,427

Tabela-5.1.3. Tempos de vida (τ -ns) e os respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência do 7B2CT em diferentes valores de pH. O tempo de vida médio, $\langle \tau \rangle$, foi obtido considerando a contribuição dos três tempos de vida.

Figura-5.1.5. Titulação da tirosina no 7B2CT. Amplitude relativa para cada tempo de vida (τ_1 — ■, τ_2 — ●, τ_3 — ▲).

Da figura 5.1.5 podemos observar que o tempo de vida τ_3 , não se altera com a variação do pH. Os tempos de vida τ_1 e τ_2 não variam no intervalo de valores de pH abaixo do pK. O pK para os tempos de vida τ_1 e τ_2 , obtido do ajuste pelos dados apresentados na figura 5.1.5 é de 10,70. O pK do grupo hidroxila da tirosina livre é 10,07. Portanto, em pH 7,4 a tirosina livre está

protonada e o seu decaimento é mono-exponencial apresentando um tempo de vida de 3,2ns. Portanto, o tempo de vida τ_2 , que tem um valor próximo do tempo de vida da tirosina livre, e tem uma contribuição pequena em valores pH altos, provém da forma protonada e o tempo de vida τ_1 , que predomina em valores de pH altos de tem valores acima de 5,5ns, provém da forma desprotonada da tirosina no peptídeo. A contribuição do τ_1 em pH baixo, ou seja abaixo do pK, que é de ~35%, conforme podemos observar no gráfico da figura 5.1.5, deveria ser menor já que nesta condição predomina a tirosina protonada. Esta contribuição relativamente alta de tirosina desprotonada em pH baixo, pode ter origem no fato do pK da tirosina ser menor, 4,76, no estado excitado (Ross *et al*, 1992).

5.1.5 Supressão por iodeto de potássio.

Fizemos medidas de supressão da fluorescência da tirosina livre e da tirosina no 7B2CT usando como supressor o iodeto (I^-). Preparamos o peptídeo e a tirosina na concentração de 50 μ M em tampão fosfato 0,01M pH 7,4 e 10mM de tiosulfito de sódio ($Na_2S_2O_3$), que foi adicionado para evitar a formação de I_2 (Lakowicz, 1983). Preparamos iodeto de potássio na concentração de 1M. Acrescentamos 20 μ l da solução de KI para cada medida de fluorescência. Nas tabelas 5.1.4 e 5.1.5 estão os tempos de vida e as respectivas amplitudes obtidas dos ajustes dos decaimentos para cada concentração de I^- para a tirosina e para o 7B2CT. Nas figuras 5.1.6 e 5.1.7 estão os gráficos e as constantes de Stern-Volmer da tirosina livre e da tirosina no 7B2CT, respectivamente. Para fazermos os gráficos, não levamos em consideração o tempo de vida curto. Este tempo de vida não variou com o aumento da concentração de I^- ; provavelmente este tempo de vida curto é devido ao espalhamento da luz de excitação. Fizemos os gráficos considerando apenas τ_1 para a tirosina livre e a média entre τ_1 e τ_2 e τ_3 para a tirosina no 7B2CT. O tempo de vida médio foi obtido a partir expressão 5.1.1. A constante bi-molecular obtida da expressão $K_D = k_q \tau_0$, a constante de Stern-

Volmer e o tempo de vida na ausência do supressor (τ_0) estão apresentados na tabela 5.1.6.

[I ⁻] (M)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	a_1	a_2
0	3,017	0	0,162	0
0,0099	2,679	0,217	0,121	0,026
0,0196	2,415	0,189	0,104	0,025
0,0291	2,213	0,203	0,099	0,028
0,0385	2,018	0,213	0,084	0,023
0,0476	1,878	0,214	0,080	0,026
0,0654	1,645	0,229	0,052	0,021
0,0825	1,457	0,211	0,038	0,017

Tabela-5.1.4. Tempos de vida (τ) e respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência da tirosina em diferentes concentrações de I⁻.

[I ⁻] (M)	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle\tau\rangle$
0	3,855	2,000	0,440	0,007	0,057	0,043	2,123
0,0099	2,919	1,792	0,406	0,014	0,052	0,044	1,932
0,0196	2,089		0,594	0,060		0,051	1,798
0,0291	1,950		0,510	0,055		0,046	1,692
0,0385	1,860		0,484	0,066		0,057	1,607
0,0566	1,715		0,500	0,072		0,060	1,477
0,0741	1,581		0,466	0,070		0,055	1,371
0,0909	1,486		0,448	0,064		0,053	1,279

Tabela-5.1.5. Tempos de vida (τ (ns)), respectivos fatores pré-exponenciais (a) e tempo de vida médio ($\langle\tau\rangle$ (ns)) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência do 7B2CT em diferentes concentrações de I⁻.

Figura-5.1.6 Gráfico de Stern-Volmer para a tirosina.

Figura-5.1.7 Gráfico de Stern-Volmer para a tirosina no 7B2CT

	$K_D (M^{-1})$	$\tau_0 (ns)$	$k_q (10^{10} M^{-1} s^{-1})$
Tirosina livre	12,92	3,017	0,43
Tirosina no 7B2CT	7,08	2,123	0,33
1° intervalo	8,30	2,123	0,39
2° intervalo	6,51	2,123	0,31

Tabela-5.1.6. Constante de Stern-Volmer (K_D), constante bi-molecular (k_q) e tempo de vida na ausência do supressor.

Na figura-5.1.7 vamos analisar os resultados em dois intervalos lineares com inclinações diferentes. Até a concentração de 0,0385M de I^- , o gráfico é linear e tem uma inclinação que resulta em um K_D de $8,30M^{-1}$. O K_D para os pontos acima desta concentração é de $6,51M^{-1}$. O ajuste da equação de Stern-Volmer por todos os dados resultou em um K_D de $7,08M^{-1}$. Estes valores ficaram abaixo do valor obtido para a tirosina livre. Porém, os valores obtidos de k_q estão próximos do valor obtido para tirosina. A tirosina no peptídeo está menos acessível ao solvente do que a tirosina livre resultando em um k_q menor. Os valores de k_q obtidos são comparáveis aos da literatura (Lakowicz, 1983).

5.1.6 Análogos A12 e A18.

A figura 5.1.8 mostra os decaimentos da intensidade de fluorescência para os três peptídeos. A tabela 5.1.7 mostra os resultados dos ajustes para estes decaimentos.

Peptídeo	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle \tau \rangle$
7B2CT	4,500	2,075	0,4961	0,0079	0,1035	0,0776	2,16
A18	2,331	0,716	0,0856	0,0750	0,0590	0,0490	1,98
A12	2,279	0,565	0,0032	0,0580	0,0490	0,5580	1,96

Tabela-5.1.7. Tempos de vida (τ (ns)), respectivos fatores pré-exponenciais (a) e tempo de vida médio $\langle \tau \rangle$ obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência

Figura-5.1.8. Decaimentos de intensidade para o 7B2CT e análogos em tampão fosfato 0,01M pH 7,4. $\lambda_{exc.} = 285nm$ $\lambda_{em.} = 305nm$

Os decaimentos dos três peptídeos são bastante parecidos. O 7B2CT tem uma pequena contribuição de tempo de vida um pouco mais longo.

A figura 5.1.9 mostra os gráficos de Stern-Volmer para os três peptídeos e a tabela 5.1.8 mostra os resultados obtidos a partir dos gráficos da figura 5.1.10.

Figura-5.1.9. Gráficos de Stern-Volmer para o 7B2CT e análogos

Peptídeo	$K_D(M^{-1})$	$\tau_0(ns)$	$k_q(10^{10}M^{-1}s^{-1})$
7B2CT	7,08	2,16	0,33
A18	5,70	1,96	0,29
A12	6,02	1,94	0,31

Tabela-5.1.8. Constantes de Stern-Volmer (K_D) e bi-molecular (k_q) e tempo de vida na ausência do supressor (τ_0).

Os valores de k_q obtidos para os três peptídeos são bastante parecidos, isto indica que a tirosina está exposta ao solvente, ou está acessível ao iodeto da mesma maneira nos três peptídeos. Os valores obtidos para os peptídeos são menores que os obtidos para a tirosina livre. As conformações do peptídeo tornam a tirosina menos acessível ao iodeto, além disso a constante de difusão do peptídeo é menor que o resíduo livre.

A figura 5.1.10 mostra o decaimento da anisotropia para os três peptídeos e a tabela 5.1.9 mostra os resultados obtidos a partir dos gráficos da figura 5.1.10.

Figura-5.1.10. Decaimentos de anisotropia para o 7B2CT e análogos em Tampão fosfato 0,01M pH 7,4.

Peptídeo	$\Phi_1(ps)$	$\Phi_2(ps)$	a_1	a_2
7B2CT	564,0	23,44	0,125	0,241
A18	737,4	42,26	0,101	0,197
A12	615,0	42,75	0,095	0,155

Tabela-5.1.9 Resultados dos ajustes pelos decaimentos de anisotropia

As curvas de decaimento da anisotropia, assim como as de fluorescência são bastante parecidas. Os três peptídeos apresentaram dois tempos de correlação rotacional. Sendo o menor associado ao movimento local da tirosina e o maior associado ao movimento do peptídeo como um todo. O 7B2CT apresenta os tempos de correlação rotacional menores indicando que tanto a tirosina como o peptídeo como um todo tem uma liberdade de movimento maior. Este resultado está de acordo com os resultados de supressão que mostram uma supressão maior para o 7B2CT.

A figura 5.1.11 mostra os espectros de dicroísmo circular para os três peptídeos.

Figura-5.1.11. Espectros de cd para o 7B2CT e análogos em tampão fosfato 0,01M pH 7,4.

Sintetizando os resultados, verificamos que os decaimentos da intensidade de fluorescência dos três peptídeos foram mais bem ajustados por três exponenciais com base no χ^2 reduzido próximo de 1 e na inspeção visual do gráfico dos resíduos. Os tempos de vida para o A18 e a para o A12 são parecidos; para o 7B2CT aparece um tempo mais longo provavelmente devido a alguma interação local da tirosina que pode fazer pontes de hidrogênio com a carbonila do esqueleto do peptídeo (Ross *et al*, 1992). Os decaimentos da anisotropia dos três peptídeos foram melhores ajustados por duas exponenciais. Sendo o tempo mais longo devido ao tombamento do peptídeo e

o mais curto devido ao movimento da tirosina. O 7B2CT tem tempos de correlação rotacional um pouco menor que os outros peptídeos; o fato do tempo longo ser menor indica que o peptídeo está um pouco mais empacotado e o curto mostra que a tirosina está com a mobilidade menos restrita. Os espectros de dicroísmo circular também mostram uma pequena diferença para o 7B2CT. Os resultados de supressão de fluorescência apresentados na tabela 5.1.5 mostram que a tirosina está acessível ao solvente da mesma maneira nos três peptídeos. Os espectros, de dicroísmo circular, apresentados na figura 5.1.11 mostram que não há grandes diferenças na estrutura secundária dos três peptídeos. Estes resultados indicam que a conformação dos peptídeos não é um fator preponderante na interação do peptídeo com a enzima e no poder de inibição dos peptídeos.

5.2 α -MSH.

5.2.1 Absorção.

A figura 5.2.1 apresenta os espectros de absorção ótica do *o*-Abz e do peptídeo *o*-Abz- α -MSH, ambos na concentração 30 μ M em HEPES 10mM pH 7,4. Está apresentado também nesta figura o espectro do composto acetilado Ac-*p*-Abz- α -MSH.

A fenilalanina presente no α -MSH absorve em 256nm; a tirosina também presente no α -MSH, absorve em 276nm (Lakowicz, 1983). Estes dois aminoácidos não são excitados na excitação do triptofano que foi em 290nm. A banda na região do UV, em torno de 225nm, é devido à absorção das ligações peptídicas. Na região do uv-próximo, o espectro de absorção do *o*-Abz- α -MSH é dominado por duas bandas principais, uma em torno de 315nm e outra em torno de 280nm. A banda característica da transição $^1A-L_b$ no *o*-Abz livre em solução aquosa, centrada em 310nm, esta deslocada para 315nm no *o*-Abz- α -MSH. Este deslocamento para o vermelho foi observado em derivados amidados do *o*-Abz, tais como *o*-Abz-NH₂, *o*-Abz-aminoácidos, e *o*-Abz-peptídeos (Ito *et al*, 1998; Turchiello *et al*, 1998). A acetilação do *o*-Abz ligado ao α -MSH causa uma diminuição na intensidade da banda centrada em

310nm. Obtivemos espectros similares para os compostos com o *o*-Abz ligado ao análogo NDP- α -MSH, indicando que as propriedades de fluorescência da sonda são independentes das modificações na seqüência de aminoácidos do hormônio nativo que produz o análogo mais potente.

Figura-5.2.1 Espectros de absorção ótica do *o*-Abz (a) do *o*-Abz- α -MSH (b) do Ac-*p*-Abz- α -MSH (c) na concentração de 30 μ M em HEPES 10mM, pH 7,4.

	$\epsilon_{310}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) (10^3)$	$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) (10^3)$	Φ
<i>o</i> -Abz	$2,40 \pm 0,10$	$0,70 \pm 0,10$	0,600
<i>o</i> -Abz- α -MSH	$2,30 \pm 0,10$	$5,76 \pm 0,01$	0,350
Ac- <i>o</i> -Abz- α -MSH	$1,00 \pm 0,10$	$5,69 \pm 0,01$	0,076
Ac- <i>m</i> -Abz- α -MSH	$0,44 \pm 0,04$	$5,31 \pm 0,01$	0,004
Ac- <i>p</i> -Abz- α -MSH	$0,41 \pm 0,02$	$15,7 \pm 0,01$	0,003
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH	$2,30 \pm 0,10$	$5,57 \pm 0,02$	0,410
Ac- <i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH	$0,70 \pm 0,30$	$5,70 \pm 0,02$	0,012
α -MSH	$0,10 \pm 0,01$	$5,70 \pm 0,02$	0,09*
NDP- α -MSH	$0,13 \pm 0,02$	$5,90 \pm 0,03$	0,095*

Tabela-5.2.1 Coeficientes de absorção molar (ϵ) em 310nm e 280nm e rendimento quântico (Φ) para os compostos Abz, Abz-melanotropinas e melanotropinas em 10mM de HEPES, pH 7,4.

Os espectros de absorção ótica foram obtidos no intervalo de concentrações entre 10 e 40 μ M, os resultados para os coeficientes de absorção molar estão apresentados na tabela 5.2.1. Podemos ver que, apesar do deslocamento espectral da transição $^1\text{A-L}_b$ do *o*-Abz, o valor do coeficiente

de absorção molar do *o*-Abz- α -MSH é bastante próximo do valor do coeficiente de absorção molar do *o*-Abz livre. A acetilação da sonda alterou sua estrutura eletrônica, como pode ser observado pelo decréscimo significativo do ϵ_{310} nos compostos Ac-Abz- α -MSH. Maiores alterações ocorreram no Ac-*p*-Abz- α -MSH, que apresentou um coeficiente de absorção molar muito baixo em 310nm e que mascarou a banda em 280nm com uma banda mais intensa centrada em 268nm, revelando que a estrutura eletrônica do isômero-*p* é bem diferente dos outros isômeros do Abz.

O coeficiente de absorção molar do *o*-Abz livre em 280nm é significativamente menor que em 310nm. O mesmo ocorre com o *o*-Abz ligado a muitos aminoácidos e peptídeos sem a tirosina e o triptofano (Ito *et al*, 1998). Em *o*-Abz ligado a melanotropinas o ϵ_{280} variou entre 5600 e 5800 M⁻¹cm⁻¹, próximo dos valores obtidos para o α -MSH e NDP- α -MSH sem a sonda *o*-Abz. Desta forma, podemos assumir que o coeficiente de absorção molar em 280nm obtido para *o*-Abz-melanotropinas é devido a absorção da tirosina e do triptofano. Valores similares de ϵ_{280} foram obtidos Abz-melanotropinas acetilados e não acetilados (com exceção do Ac-*p*-Abz-MSH mencionado anteriormente) indicando que a acetilação, que afeta a estrutura eletrônica do Abz, não modifica as propriedades eletrônicas dos resíduos aromáticos no hormônio nativo e no análogo NDP- α -MSH.

5.2.2 Fluorescência Estática.

Os espectros de fluorescência do *o*-Abz, do *o*-Abz- α -MSH, do Ac-*o*-Abz- α -MSH e do Ac-*p*-Abz- α -MSH, na concentração de 30 μ M em tampão HEPES 10mM, pH 7,4 estão apresentados na figura 5.2.2, com excitação em 310nm e na figura 5.2.3, com excitação em 290nm.

Uma banda intensa e larga de emissão fluorescente centrada em 396nm foi obtida, excitando o *o*-Abz, em solução aquosa, em 310nm. O *o*-Abz-melanotropinas não acetilado apresentou uma banda de emissão deslocada para o para o vermelho 420nm, e um rendimento quântico reduzido (tabela 5.2.1) similar a resultados anteriores para Abz-aminoácidos e Abz-bradicininas (Ito *et al*, 1998; Souza *et al*, 2000). Os compostos acetilados do *o*-Abz também

apresentaram um deslocamento para o vermelho no espectro de emissão, e a intensidade ficou bastante reduzida. O Abz acetilado nas formas *m*- e *p*- não são fluorescentes com excitação em 310nm (figura 5.2.2 e tabela 5.2.1).

Figura-5.2.2 Espectros de emissão fluorescente do *o*-Abz- α -MSH (a) do *o*-Abz- α -MSH (b), do Ac-*p*-Abz- α -MSH (c) e do Ac-*o*-Abz- α -MSH (d) na concentração de 30 μ M em HEPES 10mM, pH 7,4, $\lambda_{exc.} = 310$ nm.

Figura-5.2.3 Espectros de emissão fluorescente do *o*-Abz- α -MSH (a) do *o*-Abz-NDP- α -MSH (b), do α -MSH (c) e do NDP- α -MSH (d) na concentração de 30 μ M em HEPES 10mM, pH 7,4, $\lambda_{exc.} = 290$ nm.

Na figura 5.2.3 podemos comparar os espectros de emissão fluorescente das melanotropinas com os espectros do *o*-Abz-melanotropinas. As melanotropinas em solução aquosa, sem o *o*-Abz, apresentaram um máximo de emissão em torno de 355nm, com um rendimento quântico em torno de 0,10, determinado usando o rendimento quântico do NATA como referência. As melanotropinas ligadas ao *o*-Abz, excitadas em 290nm, apresentaram uma banda de emissão centrada em 355nm e também uma banda mais intensa centrada em 420nm. Nesta banda de 420nm não há emissão das melanotropinas sem o marcador fluorescente. Espectro de excitação do *o*-Abz livre em solução aquosa indicam que não há emissão na região em torno de 355nm que possa ser atribuído a este fluoróforo. Assim podemos assumir que em *o*-Abz-melanotropinas, a fluorescência centrada em 355nm é devido a excitação do resíduo triptofano presente no peptídeo, que está exposta ao ambiente aquoso. A figura 5.2.3 também ilustra os resultados mais relevantes da ligação do *o*-Abz ao α -MSH e ao NDP- α -MSH: um decréscimo significativo na emissão fluorescente do triptofano com um concomitante aumento da fluorescência na banda de centrada em 420nm. Parte da emissão em 420nm é devido a excitação direta do *o*-Abz, porém, a intensidade desta banda de emissão no *o*-Abz- α -MSH e no *o*-Abz-NDP- α -MSH é muito maior da que seria obtida se a fluorescência fosse a única origem da emissão. O simultâneo decréscimo da fluorescência em 355nm com o aumento da fluorescência em 420nm podem ser atribuídos a transferência de energia entre o triptofano, atuando como doador, e o *o*-Abz atuando como aceitador.

5.2.3 Fluorescência Resolvida no Tempo.

O decaimento do trp no α -MSH e do trp no *o*-Abz- α -MSH em HEPES está apresentado na figura 5.2.4.

O decaimento da intensidade de fluorescência do *o*-Abz em tampão HEPES, pH 7,4, examinado em 400nm com excitação em 310nm, foi adequadamente descrito por uma função mono-exponencial, e o tempo de vida obtido foi de 8,58ns (Tabela 5.2.2), muito próximo do valor de 8,54ns obtido

para *o*-Abz em tampão fosfato (Souza *et al*, 2000). O decaimento da intensidade de fluorescência em 420nm do *o*-Abz- α -MSH e do *o*-Abz-NDP- α -MSH excitados em 310nm apresentaram um componente com tempo de vida mais curto além do componente longo presente no *o*-Abz livre. Ainda que alguma contribuição do triptofano possa estar presente em 420nm, a ocorrência de um decaimento multi-exponencial do *o*-Abz-peptídeos já havia sido obtida para o *o*-Abz-bradiginina, um peptídeo ligado ao *o*-Abz sem o triptofano (Souza *et al*, 2000). A acetilação do *o*-Abz- α -MSH diminuiu o tempo de vida médio, porém, esta diminuição não foi tão pronunciada como a diminuição do rendimento quântico.

Figura-5.2.4 Decaimento da intensidade de fluorescência do α -MSH (a) e do *o*-Abz- α -MSH (b) em HEPES pH 7,4. (c) perfil da lâmpada. $\lambda_{exc.} = 296\text{nm}$ $\lambda_{em.} = 350\text{nm}$

	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle\tau\rangle$
<i>o</i> -Abz	8,58			1,000			8,58
<i>o</i> -Abz- α -MSH	8,32	3,58		0,684	0,316		6,81
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH	8,97	4,95	0,54	0,415	0,397	0,188	5,78
Ac- <i>o</i> -Abz- α -MSH	7,26	1,88	0,37	0,148	0,169	0,723	4,69

Tabela-5.2.2 Tempos de vida τ (ns), respectivos fatores pré-exponenciais normalizados e tempo de vida médio $\langle\tau\rangle$ obtidos dos ajustes pelos dados de decaimento de *o*-Abz e *o*-Abz –melanotropinas, com excitação em 310nm e emissão em 420nm. Concentração de 40 μ M em tampão HEPES 10mM pH 7,4.

Como é usualmente encontrado em peptídeos que contêm o triptofano, as melanotropinas α -MSH e NDP- α -MSH em tampão HEPES, pH 7,4, apresentaram um decaimento heterogêneo com excitação em 296nm. Este decaimento foi ajustado adequadamente por uma função tri-exponencial. Excitação do triptofano em *o*-Abz-peptídeos também resulta em um decaimento heterogêneo com um ajuste por uma função tri-exponencial para emissão em 350nm. Porém, a dispersão dos tempos de vida foi maior que a obtida para os peptídeos nativos. Tempos de vida médio $\langle\tau\rangle$ foram calculados como uma média ponderada simples a partir dos tempos de vida individuais e correspondentes fatores pré-exponenciais normalizados. Podemos ver claramente na tabela 5.2.3 que o tempo de vida médio para os peptídeos ligados ao *o*-Abz diminuiu; um resultado que pode ser observado na figura 5.2.4, que ilustra o decaimento rápido do *o*-Abz- α -MSH comparado com o do hormônio nativo. Estes resultados também indicam a ocorrência da transferência de energia entre o triptofano e o *o*-Abz nos peptídeos modificados.

	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3	$\langle\tau\rangle$
α -MSH	3,41	2,02	0,472	0,307	0,349	0,344	1,91
NDP- α -MSH	3,97	2,33	0,570	0,178	0,538	0,284	2,12
<i>o</i> -Abz- α -MSH	2,62	1,22	0,307	0,074	0,475	0,451	0,91
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH	2,86	1,15	0,300	0,029	0,451	0,520	0,76
Ac- <i>o</i> -Abz- α -MSH	3,63	2,11	0,421	0,165	0,351	0,484	1,54
NDP- α -MSH /TFE	4,51	1,50	0,59	0,033	0,364	0,603	1,05
NDP- α -MSH /TFE	5,8	1,85	0,58	0,045	0,357	0,598	1,27

Tabela-5.2.3 Tempos de vida τ (ns), respectivos fatores pré-exponenciais normalizados e tempo de vida médio $\langle\tau\rangle$ obtidos dos ajustes por multi-exponenciais dos dados de decaimento de Trp⁹ em melanotropinas modificadas e não modificadas, com excitação em 296nm e emissão em 360nm. Concentração 40 μ M em tampão HEPES 10mM pH 7,4. Duas ultimas medidas feitas em TFE.

As curvas de decaimento foram obtidas em diferentes comprimentos de onda de emissão. Com excitação em 310nm, o perfil de decaimento correspondente a emissão do *o*-Abz foi praticamente insensível as mudanças no comprimento de onda de emissão. Por outro lado, a excitação do triptofano resultou perfis de decaimento longos para comprimentos de onda longos. Os

tempos de decaimento ficaram praticamente constante através do espectro de fluorescência do triptofano, e um componente de tempo de vida longo aparece na região espectral correspondente da emissão do *o*-Abz. A contribuição relativa dos três tempos de vida em diferentes comprimentos de onda foram determinados através da análise global do conjunto de dados dos decaimentos medidos em diferentes comprimentos de onda de emissão no intervalo de 340 a 400nm. O espectro associado ao decaimento do α -MSH e alguns análogos tem sido extensivamente examinado em água e em presença de membranas modelo (Ito *et al*, 1993; Souto e Ito, 2000), e as contribuições relativas de cada componente de decaimento foram dependentes do ambiente em torno do resíduo de triptofano. No presente trabalho se torna evidente que no *o*-Abz- α -MSH e no *o*-Abz-NDP- α -MSH há, além dos três tempos de vida do triptofano, uma contribuição de um componente de tempo de vida longo de $\sim 7,5$ ns, que predomina em comprimentos de onda longo e é característico da emissão do *o*-Abz (Tabela 5.2.4). A presença desta componente devido a emissão do *o*-Abz, originada da excitação do triptofano em 296nm, é uma evidencia adicional da transferência de energia entre o triptofano e o *o*-Abz.

λ	<i>o</i> -Abz- α -MSH				<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH			
	$7,17 \pm 0,70$	2,6ns	1,20ns	0,30ns	$7,62 \pm 0,302$	2,86ns	1,15ns	0,30ns
345	0,000(0,3)	0,018(21,5)	0,113(63,4)	0,103(14,4)	0,000(0,2)	0,007(10,9)	0,104(69,0)	0,115(19,9)
350	0,000(0,9)	0,019(22,4)	0,110(62,0)	0,101(14,5)	0,001(4,2)	0,009(13,1)	0,106(65,0)	0,111(14,5)
360	0,001(3,6)	0,019(22,3)	0,113(60,6)	0,101(13,5)	0,045(65,5)	0,026(14,0)	0,073(16,2)	0,076(4,4)
380	0,043(61,5)	0,027(14,0)	0,082(19,8)	0,076(4,6)	0,101(83,3)	0,037(17,4)	0,033(4,1)	0,036(1,2)
400	0,115(87,9)	0,016(12,1)	0,111(88,1)	0,015(11,9)				

Tabela-5.2.4 Resultados da análise global do decaimento da fluorescência medidos em vários comprimentos de onda de emissão, com excitação em 296nm.

5.2.4 FRET.

Como mostrado no item anterior, em melanotropinas modificadas com *o*-Abz há transferência de energia entre o resíduo triptofano e o *o*-Abz. No modelo de Förster, a taxa de transferência de energia depende da integral de superposição J calculada, conforme equação 2.13, no intervalo do espectro

onde a emissão fluorescente do doador sobrepõe a absorção ótica do aceitador (Figura 5.2.5). Valores de J obtidos da fluorescência do triptofano no α -MSH e no NDP- α -MSH e da absorção do *o*-Abz em peptídeos modificados foram usados para o cálculo da distância crítica de Förster R_0 , e os resultados estão apresentados na tabela 5.2.5. Os cálculos foram feitos a partir dos dados obtidos em tampão pH 7,4 e em TFE.

Nos cálculos de R_0 usamos os valores de 1,334 para o índice de refração da água e 1,291 para o índice de refração do TFE (Lide, 1995). Os rendimentos quântico do doador na ausência do aceitador foram obtidos dos experimentos com α -MSH e NDP- α -MSH não modificados, e os valores foram 0,090 e 0,095, respectivamente, em água e 0,060 e 0,057, respectivamente, em TFE. Utilizamos o valor de $2/3$ para o fator orientacional κ^2 , assumindo movimentos rápidos do doador e do aceitador (Dale e Eisinger, 1974) baseado nos dados de decaimento da anisotropia conforme descrito na próxima seção.

Figura-5.2.5. Superposição espectral da absorção ótica do *o*-Abz (a) e da fluorescência do triptofano (b) em HEPES pH 7,4, normalizados pela área.

Peptídeo	n	Φ_d	$J(M^{-1}cm^3)$	$R_0(\text{\AA})$
<i>o</i> -Abz- α -MSH em tampão	1,334	0,090	$1,25 \times 10^{-15}$	16,6
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH em tampão	1,334	0,095	$1,06 \times 10^{-15}$	16,3
<i>o</i> -Abz- α -MSH em TFE	1,291	0,060	$1,80 \times 10^{-15}$	16,8
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH em TFE	1,291	0,057	$1,06 \times 10^{-15}$	17,1

Tabela-5.2.5 Índice de refração (n), Rendimento quântico (Φ_d), integral de superposição espectral (J) e distância crítica de Förster (R_0)

5.2.4.1 Tempos de correlação rotacional.

Decaimentos da anisotropia do triptofano em melanotropinas modificadas e não modificadas foram medidos, como mostra a figura 5.2.6, e dois tempos de correlação rotacional foram necessários para ajustar o dado experimental (Tabela 5.2.6). O componente curto, da ordem de 100ps, pode ser atribuído ao movimento local do triptofano, e o tempo de correlação longo origina do movimento do peptídeo como um todo. A alta viscosidade do TFE comparada com o tampão leva a um aumento do tempo de correlação rotacional longo e um decréscimo do tempo de correlação rotacional curto. Usando os parâmetros do decaimento da anisotropia é possível estimar o parâmetro de ordem (S) e o cone de oscilação (θ_0) (Kulinski *et al*, 1997), e os valores obtidos indicam que a restrição do movimento do triptofano é comparável àquele publicado para o triptofano no peptídeo galanina (Kulinski *et al*, 1997). Na última coluna da tabela 5.2.6 apresentamos os resultados para o decaimento da anisotropia da sonda *o*-Abz no NDP- α -MSH. Um componente muito curto, dentro do limite de detecção do instrumento, pode ser identificado, junto com um tempo de correlação rotacional mais longo. O resultado é comparável com aquele obtido para a bradicinina modificada com o *o*-Abz, indicando um movimento rápido do grupo ligado ao peptídeo. Uma estimativa do erro na taxa de transferência de energia devido ao uso do valor de 2/3 para o fator orientacional foi feita por Kulinski *et al* (1997). Dos dados de decaimento da anisotropia os autores mostraram que no peptídeo galanina modificado com os grupos dansil ou dinitrofenil como aceitadores da energia transferida do resíduo triptofano, o desvio característico nos resultados de R_0 é de ~20%. Baseado nos nossos resultados de anisotropia também estimamos o mesmo

desvio nos valores calculados de R_0 , o que reflete e na incerteza nas distâncias obtidas.

Figura-5.2.6 Decaimento da anisotropia do *o*-Abz- α -MSH em TFE (a) em tampão HEPES 10mM pH 7,4 (b). $\lambda_{exc.}=297\text{nm}$; $\lambda_{em.}=355\text{nm}$.

	ϕ_1 (ps)	ϕ_2 (ns)	b_1	b_2	S	θ_0
α -MSH	69 ± 24	$0,670 \pm 0,030$	0,048	0,101	0,82	28,7
NDP- α -MSH	89 ± 25	$0,780 \pm 0,030$	0,069	0,130	0,81	30,0
<i>o</i> -Abz- α -MSH	120 ± 20	$0,700 \pm 0,050$	0,116	0,127	0,72	36,7
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH	95 ± 18	$0,828 \pm 0,072$	0,089	0,107	0,74	35,5
α -MSH/TFE	110 ± 30	$1,75 \pm 0,18$	0,122	0,078	0,62	43,6
<i>o</i> -Abz- α -MSH/TFE	38 ± 12	$1,13 \pm 0,09$	0,124	0,165	0,76	34,2
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH/TFE	47 ± 17	$1,12 \pm 0,10$	0,085	0,154	0,80	30,5
<i>o</i> -Abz-NDP- α -MSH*	10 ± 12	$0,51 \pm 0,20$	0,2	0,01	0,22	70,8

Tabela-5.2.6 Tempos de correlação rotacional (ϕ), anisotropia parcial (b), parâmetro de ordem (S) e ângulos do cone de oscilação (θ_0) para o Trp⁹ em melanotropinas modificadas e não modificadas em tampão HEPES 10mM pH 7,4 e em TFE. Excitação: 297nm; Emissão: 355nm. Última coluna: dados para o *o*-Abz com excitação em 305nm e emissão em 400nm.

5.2.4.2 Distribuição de distâncias em tampão HEPES.

Nos experimentos com fluorescência resolvida no tempo observamos que o decaimento da fluorescência dos peptídeos que contém o par trp⁹-*o*-Abz

foram mais rápidos que os apresentados para os peptídeos não modificados, conforme ilustra a figura 5.2.4, e o tempo de vida médio diminui de nano segundos para sub-nanosegundos. Não tentamos encontrar a distância doador-aceitador a partir das medidas de fluorescência estática, por que os resultados resolvidos no tempo evidenciaram a inadequação de assumir uma única distância entre o par doador-aceitador.

Fizemos um ajuste do modelo de distribuição de distâncias pelas curvas de decaimento para podermos obter a função distribuição de distâncias $f(r)$ sem suposição, *a priori*, com relação as distâncias r ou a forma da curva de distribuição. A qualidade do ajuste foi julgada pelo parâmetro estatístico χ^2 e pelo gráfico dos resíduos. A função $f(r)$ resultante do ajuste está apresentada na figura 5.2.7a, mostrando que as distâncias entre o-Abz e o trp⁹ no peptídeo modificado estão distribuídas ao longo de um grande intervalo com máximo em 15,8Å e largura total a meia altura (full width at half maximum – fwhm) de 5,7Å. O mesmo procedimento foi repetido para o análogo mais potente NDP- α -MSH modificado com o o-Abz. Neste análogo, a distribuição distância apresentou três populações em tampão, com pico centrado nas posições 8,0, 13,0 e 16Å e a fwhm para cada pico de ~1,5Å.

5.2.4.3 Distribuição de distâncias em TFE.

Examinamos também os peptídeos em TFE, observando a mesma tendência: Forte supressão da fluorescência do doador devido a presença do grupo aceitador o-Abz ligado ao terminal amino do peptídeo, com o correspondente decaimento rápido do decaimento da emissão fluorescente. O resultado de distribuição de distância está ilustrado na figura 5.2.7b. Podemos observar que em TFE o peptídeo nativo modificado apresentou duas populações de distância entre o doador e o aceitador, centrados em 11 e 17Å indicando equilíbrio entre somente duas conformações principais. No análogo o-Abz-NDP- α -MSH, os três picos da distribuição de distâncias em tampão se tornaram dois picos em TFE, centrados em 13 e em 15,5Å.

Figura-5.2.7 Distribuição de distâncias para o $o\text{-Abz-}\alpha\text{-MSH}$ (●) e $o\text{-Abz-NDP-}\alpha\text{-MSH}$ (□) em (a) HEPES pH 7,4 e em (b) TFE

O $o\text{-Abz}$ ligado a melanotropinas mantém suas principais propriedades eletrônicas, particularmente um rendimento quântico alto. Excitação pode ser feita acima de 320nm sem excitar os resíduos Trp^9 ou Tyr^2 , com forte emissão na região espectral do azul. Este resultado levanta a possibilidade de que derivatizando o peptídeo com $o\text{-Abz}$ pode ser útil para visualizar interações entre o hormônio e os componentes celulares, porque poucos cromóforos naturais absorvem nesta região espectral. Por exemplo, interação entre melanotropina modificada e receptores de membrana em células podem ser diretamente observados pela excitação seletiva do $o\text{-Abz}$ e usando métodos de microscopia de fluorescência para detectar a emissão acima de 420nm na região azul do espectro. Também verificamos que o $o\text{-Abz}$, o $m\text{-Abz}$ e o $p\text{-Abz}$ acetilados apresentam baixa fluorescência e não são adequados para estes propósitos.

Em resumo, verificamos que existe superposição espectral entre a absorção do *o*-Abz e a emissão fluorescente do Trp⁹ o que leva a transferência ressonante de energia de Förster. Em melanotropinas modificadas com ácido aminibenzóico a emissão do Trp⁹ é significativamente reduzida comparada com melanotropinas não modificadas, evidenciando a ocorrência da transferência de energia. Pudemos então examinar as alterações nas conformações das melanotropinas através dos dados de fluorescência e de anisotropia resolvidos no tempo. Usando o programa CONTIN obtivemos a distribuição de distâncias entre o *o*-Abz e o Trp⁹, supondo a validade do modelo de Förster para uma dada distância fixa e estimando as distâncias doador-aceitador dentro de 20% de incerteza para a distância crítica de Förster R_0 . O número de picos nas distribuições de distâncias obtidas é o mínimo possível para um bom ajuste pelos dados, avaliado pelo χ^2 e pela distribuição de resíduos. As distâncias curtas obtidas para o *o*-Abz-NDP- α -MSH estão próximas da menor distância possível de ser obtida por *fret* neste caso, onde R_0 é próximo de 16Å.

Resultados de simulações por dinâmica molecular do α -MSH em um meio de constante dielétrica alta (Pascutti *et al* 1999) mostram que, durante mais de 10ns de simulação, o hormônio apresentou uma estrutura flexível, sem estabilização de qualquer conformação. É possível que haja interconversão entre vários estados conformacionais disponíveis com separação de energia muito pequena, conforme sugerido pelos cálculos de minimização de energia feitos na fase gasosa (Jacchieri e Ito, 1995). Uma busca de conformações do α -MSH usando um potencial de força média para modelar os efeitos da solvatação foi publicado por Prabhu *et al* (1999a). Eles verificaram que as estruturas de menor energia apresentam uma dobra reversa na região do peptídeo contendo a seqüência mínima mensageira His⁶, Phe⁷, Arg⁸ e Trp⁹. Nesta família de conformação, vários graus de interação entre as cadeias laterais estão presentes, resultando em diferentes distâncias de separação entre os resíduos.

A função distribuição de distância que obtivemos dos dados de fluorescência resolvida no tempo do *o*-Abz- α -MSH em meio aquoso revelou uma ampla distribuição de distâncias entre o *o*-Abz e o Trp⁹, que pode refeltir

tanto a flexibilidade estrutural do peptídeo como as distintas distâncias inter-residuais correspondente as diferentes conformações. Prabhu *et al* (1999b) fizeram também simulações sobre a dinâmica molecular do α -MSH em uma escala de tempo de 100ns em um ambiente aquoso a temperatura ambiente, usando dinâmica de Langevin e um potencial de força média, tratado com a teoria das equações integrais. Os resultados mostraram que uma distância inicial entre as extremidades de 41Å correspondendo a estrutura estendida diminuiu e se manteve entre 19 e 33Å. A região da mensagem apresentou uma dobra reversa que era mais rígida que a região mais próxima do terminal amino. A maior flexibilidade da região do terminal amino resultou em distâncias relativamente grandes, entre 15 e 20Å, para a separação dos resíduos Tyr² e Trp⁹. Verificamos assim que os resultados que obtivemos para a separação entre o o-Abz e o Trp⁹ no α -MSH são consistentes com os da simulação estrutural do peptídeo em solução aquosa.

O análogo modificado NDP- α -MSH tem maior atividade biológica, e resultados de nmr sugerem que a substituição D-Phe⁷ pode estabilizar algum tipo de estrutura β (Hruby *et al*, 1988), ainda que nenhuma estrutura β pudesse ser observada claramente em experimentos de cd. A estrutura de menor energia dos resultados de simulação publicados por Prabhu *et al* (1999b) é bem enovelado, com o empilhamento do anel fenil da Phe⁷ e o anel indol do Trp⁹, e a estrutura enovelada é refletida nas distâncias curtas entre a Tyr² e o Trp⁹. Nossos resultados de distribuição de distâncias entre o o-Abz e o Trp⁹ no o-Abz-NDP- α -MSH indicam a ocorrência de conformações relativamente compactas no hormônio modificado, comparado com hormônio nativo. Em vez da distribuição larga obtida para o α -MSH, puderam ser identificadas três distintas populações de distâncias, com distâncias curtas entre o o-Abz e o Trp⁹ (figura 5.2.7a). A conformação proposta com dobra induzida pela Phe⁷ pode explicar a ocorrência de uma distância curta na separação entre o o-Abz e o Trp⁹, em equilíbrio dinâmico com populações com distâncias mais longas.

A estrutura secundária de peptídeos é sensível aos efeitos do solvente. Em TFE, peptídeos tais como a galanina e o α -MSH aumentam o conteúdo de hélice alfa (Kulinski *et al*, 1997; Biaggi *et al*, 1997). Mais ainda, a bradicinina

apresentou uma estabilização das conformações com dobra β , tanto na região do terminal amino como na região do terminal carboxila (Cann *et al*, 1994; Kotovych *et al*, 1998). Mukhopadhyay e Basak (1998) observaram por espectroscopia de cd mudanças na estrutura secundária do α -MSH em várias porcentagens de TFE. As modificações espectrais foram interpretadas com um resultado da diminuição da proporção de peptídeos no estado desordenado e um aumento da proporção de peptídeos estruturados. Nossas medidas feitas no *o*-Abz- α -MSH em TFE resultaram em duas populações de distâncias *o*-Abz-Trp⁹, refletindo as restrições conformacionais impostas pelo solvente: em vez de uma distribuição de distâncias dispersa obtida para o *o*-Abz- α -MSH em solução aquosa, nós obtivemos duas populações em TFE, e o aumento na proporção de estado enovelado é representado pelo surgimento das distâncias curtas. Por outro lado, as três populações de distâncias obtidas para o *o*-Abz-NDP- α -MSH em água se tornaram em duas em TFE, indicando uma diminuição das conformações disponíveis para o peptídeo e a estabilização de duas conformações centradas em distâncias separadas por somente $\sim 3\text{\AA}$. No trabalho com cd em melanotropinas de Biaggi *et al* (1997), foi publicado que mudando o solvente de água para TFE produz modificações tanto no espectro do α -MSH como do NDP- α -MSH, porém a estrutura secundária dos hormônios não eram a mesma. Neste trabalho nós observamos que, ainda que diferente, as distribuições de distâncias obtidas para o *o*-Abz- α -MSH e para o *o*-Abz-NDP- α -MSH em TFE tem características similares.

Resultados anteriores de fluorescência resolvida no tempo (Ito *et al*, 1993; Souto e Ito, 2000) sugeriram alterações conformacionais quando os hormônio nativo e sintético vão do meio aquoso para a fase lipídica de membranas modelo. Tais alterações também foram observadas em simulações por dinâmica molecular do hormônio nativo na presença de um modelo de interface lipídio-água (Pascutti *et al*, 1999). Nossos resultados indicam que o análogo mais potente tem uma conformação dobrada estabilizada em meio aquoso, em vez da flexibilidade característica do hormônio nativo. Além disso, foi observado que no solvente menos polar TFE, os hormônios nativo e análogo apresentaram duas populações de distâncias,

um resultado que dá suporte à indicação qualitativa da similaridade da conformação dos peptídeos em ambiente não polar, conforme mencionado anteriormente. A conformação enovelada induzida por um solvente menos polar, e já presente no análogo NDP- α -MSH, pode ser importante para a atividade biológica regulada pela interação com o receptor de membrana que tem regiões locais com diferentes polaridades.

5.3 Cardin.

Os resultados obtidos para os peptídeos Cardin KK4, RKK4 e RKK3 e o peptídeo KKA que contêm somente o doador e o peptídeo KKQ que contém somente o aceitador. Estes peptídeos foram apresentados na tabela 3.1 e estão apresentados abaixo.

KK4 Abz-AKKARAACKARAACKARAACKARAQ-Eddnp,
 RKK4 Abz-ARKKAACKAARKKAACKAARKKAACKAARKKAACKA-Eddnp,
 RKK3 Abz-ARKKAACKAARKKAACKAARKKAACKAACKA-Q-Eddnp,
 KKA Abz-AKKARAACKARAACKARAQ-NH₂,
 KKQ AKKARAACKARAACKARAQ-Eddnp.

5.3.1 KK4 e RKK4.

Os decaimentos do KKA, peptídeo que não tem o aceitador, e do RKK4 na presença e na ausência de heparina estão apresentados na figura 5.3.1 e para o KK4 na figura 5.3.2.

A tabela 5.3.1 mostra que, em tampão HEPES pH 7,4, o decaimento da fluorescência do peptídeo KKA, que está modificado com somente o *o*-Abz (Figura 5.3.1 - curva a) é dominado por um tempo de vida de 8,2ns, responsável por mais de 76% da emissão total da fluorescência. O decaimento é ajustado adequadamente com a inclusão de um tempo e de vida mais curto de 3,25ns, que contribui com 22% da emissão fluorescente total, e um componente rápido de 0,73ns. O tempo de vida médio, calculado da média ponderada dos tempos de vida individuais e dos correspondentes fatores pré-

exponenciais normalizados, é de 7,7ns, comparável ao obtido para os peptídeos *o*-Abz bradicinina (Souza *et al*, 2000), e ligeiramente abaixo do valor publicado para o *o*-Abz-Arg-NH₂ (Ito *et al*, 1998). Quando a heparina está presente no meio, na concentração equimolar peptídeo:heparina (30 μ M), o decaimento é ajustado adequadamente por uma função tri-exponencial, com tempos de vida de 8,94, 5,03 e 0,75ns e fatores pré-exponenciais normalizados iguais a 0,60, 0,24 e 0,16 respectivamente, resultando em um tempo de vida médio de 6,69ns.

A fluorescência dos peptídeos modificados com o doador (*o*-Abz) e o aceitador (Eddnp) decai mais rápido devido a transferência de energia do *o*-Abz para o Eddnp, como pode ser visto na figura 5.3.1 (curva b) para o peptídeo RKK4. O aumento na taxa de decaimento foi acentuado pela presença de heparina (Figura 5.3.1 – curva c), sugerindo uma diminuição na distância doador-aceitador devido a interação peptídeo heparina.

Figura-5.3.1 Decaimento da intensidade de fluorescência para o KKA (a) e para o RKK4 na ausência (b) e na presença (c) de heparina em HEPES pH 7,4 a 35°C. $\lambda_{exc.}=310\text{nm}$, $\lambda_{em.}=420\text{nm}$.

Figura-5.3.2 Decaimento da intensidade de fluorescência para o KKA (a) e para o KK4 na ausência (b) e na presença (c) de heparina em HEPES pH 7,4 a 35°C. $\lambda_{exc.}=310\text{nm}$, $\lambda_{em.}=420\text{nm}$.

	τ_1	τ_2	τ_3	a_1	a_2	a_3
Tampão	8,24	3,25	0,73	0,76	0,22	0,02
Heparina	8,94	5,03	0,75	0,60	0,24	0,16

Tabela-5.3.1 Tempos de vida (τ -ns) e os respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo dados de decaimento da fluorescência do KKA.

Do espectro de emissão fluorescente do peptídeo modificado somente com o *o*-Abz (KKA) e do espectro de absorção do peptídeo modificado somente com o Eddnp no terminal carboxílico (KKQ), conforme mostrado adiante na figura 5.3.7, a integral de superposição espectral J e a distância crítica de Förster R_0 foram calculadas. O valor calculado de R_0 em meio aquoso é de 24Å, comparável com o valor obtido nos experimentos com bradicininas modificadas (Souza *et al*, 2000). Os valores R_0 e de rendimento quântico para os peptídeos Cardin, obtidos conforme discutido nas técnicas (capítulo 2) e nos resultados sobre α -MSH, estão apresentados na tabela 5.3.1.

Peptídeo	n	Φ_d	$J(M^{-1}cm^3)$	$R_0(\text{\AA})$
RKK4 c/ heparina	1,334	0,22	4,76947E-15	24,1
RKK4 s/ heparina	1,334	0,22	4,76947E-15	24,1
KK4 c/ heparina	1,334	0,22	4,76947E-15	24,1
KK4 s/ heparina	1,334	0,22	4,76947E-15	24,1

Tabela-5.3.1. Índice de refração (n), Rendimento quântico (Φ_d), integral de superposição espectral (J) e distância crítica de Förster (R_0)

Figura-5.3.3 Distribuição de distâncias para o RKK4 na presença (•) e na ausência (□) de heparina em HEPES pH 7,4 a 35°C.

Figura-5.3.4 Distribuição de distâncias para o KK4 na presença (•) e na ausência (□) de heparina em HEPES pH 7,4 a 35°C.

De maneira análoga ao trabalho realizado com peptídeos melanotrópicos, utilizamos o programa CONTIN para a análise dos dados de decaimento. Os resultados dos cálculos de distribuição de distâncias Abz-Eddnp em KK4 e RKK4, tanto na ausência como na presença de heparina estão apresentados nas figuras 5.3.3 e 5.3.4 para o KK4 e para o RKK4, respectivamente.

Dados espectroscópicos medidos na presença de heparina levam a um valor similar de R_0 . Os resultados de distribuição de distância para o peptídeo KK4 (figura 5.3.4) revelam que a maioria das moléculas (83%) tem uma distância entre as extremidades de aproximadamente 28Å, e uma população menor de peptídeos com distâncias menores, próximo de 17Å e abaixo de 10Å. O peptídeo mais longo RKK4 apresenta uma distribuição de distâncias larga centrada em ~36Å, possivelmente refletindo a flexibilidade estrutural do peptídeo (figura 5.3.4). Quando a heparina está presente no meio, as distâncias entre as extremidades diminuem, e a distribuição de distância para o KK4 mostra um máximo de ~19,7Å e uma distribuição larga e assimétrica que se estende acima de 35Å, revelando a presença de uma população centrada em torno de 30Å parcialmente sobreposta a primeira distribuição (Figura 5.3.4). O peptídeo RKK4, na interação com a heparina, mostra um equilíbrio entre duas populações de distância, centrado em 32,9Å e em 21,2Å, com contribuição relativa de 46% e 54% respectivamente (Figura 5.3.3).

Os peptídeos KK4 e RKK4 não possuem uma estrutura definida quando estão na ausência de heparina. Na presença de heparina estes peptídeos passam a conter hélices alfa, conforme os resultados de dicroísmo circular (Pimenta *et al*, 2002). As medidas de decaimento da intensidade de fluorescência mostram que há uma redução significativa no tempo de vida destes peptídeos quando na presença de heparina. Portanto, quando estão na ausência de heparina estão em uma conformação mais estendida e quando na presença de heparina há formação de hélices alfa que diminuem a distância entre os grupos o-Abz e Eddnp que estão nas extremidades dos peptídeos. As distribuições de distâncias para os dois peptídeos na presença e na ausência de heparina mostram esta mudança causada pela heparina. Os valores de distâncias obtidos para os peptídeos na presença de heparina são menores

que os valores esperados se estes peptídeos estivessem totalmente em hélice alfa. Portanto, podemos supor que estes peptídeos não estão totalmente em hélice e que pode estar ocorrendo alguma dobra que leva à diminuição da distância entre os terminais.

5.3.2 RKK3.

5.3.2.1 Heparina.

Estudo semelhante ao KK4 e RKK4 foi feito com o RKK3. O mesmo tratamento aplicado aos peptídeos melanotrópicos, para obtenção da distância crítica de Förster, foi empregado para o peptídeos RKK3 nas diferentes condições.

Fizemos medidas de fluorescência do peptídeo RKK3 em tampão fosfato na presença e na ausência da heparina. A figura 5.3.5 mostra o decaimento da intensidade de fluorescência do KKA e do RKK3 sem heparina e do RKK3 em 30 μ M de heparina, ou seja, quando a proporção heparina: peptídeo é 1:1. Na tabela 5.3.2 estão apresentados os tempos de vida para o doador, na ausência de aceitador, tanto na presença como na ausência de heparina.

Figura-5.3.5. Decaimento da intensidade de fluorescência do o-Abz nos peptídeos (a) KKA sem heparina, (b) RKK3 sem heparina e no (c) RKK3 em 30 μ M de heparina. $\lambda_{exc.}=310nm$, $\lambda_{em.}=420nm$.

Solvente	τ_1	a_1	τ_2	a_2
Tampão Fosfato	8,589	0,83	3,101	0,17
Tp. Fosf. + heparina	9,267	0,76	3,573	0,24

Tabela-5.3.2. Tempos de vida (τ) e os respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência do KKA.

Os tempos de vida obtidos para o KKA em tampão fosfato são semelhantes aos obtidos para o KKA em tampão HEPES nos experimentos com RKK4 e KK4.

Na tabela 5.3.3 estão os valores de índice de refração e rendimento quântico usados para determinar a integral de superposição espectral e R_0 que também estão apresentados nesta tabela.

Peptídeo	n	Φ_d	$J(M^{-1}cm^3)$	$R_0(\text{\AA})$
RKK3	1,334	0,286	4,142E-15	24,5
RKK3+heparina	1,334	0,276	3,189E-15	23,4

Tabela-5.3.3. A superposição espectral J , o rendimento quântico do doador e os valores de R_0 obtidos.

Na figura 5.3.6 estão apresentadas as distribuições de distâncias para o peptídeo RKK3 na presença e na ausência de heparina. Na tabela 5.3.4 estão apresentados os valores das posições, a área normalizada e a largura a meia altura de cada pico para cada distribuição.

Figura-5.3.6 Distribuição de distâncias para o peptídeo RKK3 na presença (○) e na ausência (■) de heparina.

	P1	P2	A1	A2	L1	L2
Tampão Fosfato	16,3	28,0	0,05	0,95	5,3	6,5
Tp. Fosf. + heparina	10,7	23,2	0,46	0,54	5,7	10,3

Tabela-5.3.4. Pico (P), área (A) e Largura a meia altura (L) obtidos da distribuição de distâncias para o RKK3 na presença e na ausência de heparina

5.3.2.2 Titulação com heparina.

Se tivermos mais de um peptídeo ligado na mesma heparina poderemos ter transferência de energia do doador de um peptídeo para o aceitador de outro peptídeo. Esta transferência de energia resultaria em uma distribuição de distâncias não relacionada com a conformação do peptídeo. Fizemos uma titulação do RKK3 com a heparina para verificar se havia alguma mudança de conformação no peptídeo dependendo da proporção de peptídeo/heparina e para estudar se havia ligação de mais de um peptídeo por heparina.

Um gráfico mostrando a superposição espectral está apresentado na figura 5.3.7. A tabela 5.3.5 mostra os valores de concentração de cada espécie, a proporção de heparina/peptídeo, a superposição espectral J, o rendimento quântico do doador e os valores de R_0 obtidos.

Figura-5.3.7. Espectro de fluorescência do KKA e coeficiente de absorção do KKQ normalizados pela área.

Figura-5.3.8. Distribuições de distância para o peptídeo RKK3 nas seguintes relações Ch/Cp: 0,00-(■), 0,15-(○), 0,47-(□) e 0,65- (□).

Figura-5.3.9. Distribuições de distância para o peptídeo RKK3 nas seguintes relações Ch/Cp: 0,00 (■), 0,83 (○), 1,02 ( ) e 1,44 (□).

Ch/Cp	Ch(μM)	Cp(μM)	Φ_d	J(M^{-1}cm^3)	R_0 (Å)
0,00	0,00	34,00	0,30	5,13E-11	25,66
0,15	5,00	32,45	0,23	4,97E-11	24,46
0,47	15,00	31,68	0,34	5,01E-11	26,31
0,65	20,00	30,91	0,36	4,99E-11	26,07
0,83	25,00	30,14	0,34	4,85E-11	26,41
1,02	30,00	29,36	0,38	4,93E-11	26,11
1,44	40,00	27,82	0,35	4,92E-11	25,41

Tabela-5.3.5 Valores da concentração de heparina (Ch) e de peptídeo (Cp), relação entre a concentração de heparina e peptídeo (Ch/Cp), rendimento quântico do o-Abz no KKA (Φ_d), superposição espectral (J) e R_0 .

Houve pouca variação nos valores de R_0 com a adição de heparina. Isto indica que não há mudanças nas características espectrais de emissão do o-Abz e de absorção do Eddnp com a presença de heparina. Há pouca interação da heparina com os grupos doadores e aceitadores.

As distribuições de distância, obtidas com o método análogo ao usado para os peptídeos melanotrópicos, estão apresentadas nas figuras 5.3.8 e 5.3.9. Nas duas figuras estão apresentados as distribuições de distância para o RKK3 na ausência de heparina. Na figura 5.3.8 estão as distribuições de distância para relações concentração de heparina (Ch) e concentração de peptídeo (Cp) de 0,15 a 0,65 e na figura 5.3.9 de 0,83 a 1,44. Os valores da posição do máximo de cada pico e suas respectivas largura a meia altura e área estão apresentadas na tabela 5.3.6

Ch/Cp									L		L	
	P1	P2	P3	P4	A1	A2	A3	A4	L1	2	3	L4
0,00	--	19,7	--	32,4	--	0,029	--	0,971	--	2,2	--	5,1
0,15	8,09	18,7	28,9	-	0,739	0,045	0,217	-	7,1	3,1	4,9	-
0,47	8,09	17,8	24,0	31,1	0,900	0,032	0,055	0,014	7,1	3,1	4,0	4,4
0,65	8,78	18,6	24,9	-	0,751	0,095	0,153	-	7,3	4,2	6,7	-
0,83	8,75	18,8	24,7	-	0,731	0,078	0,190	-	7,7	4,1	6,8	-
1,02	9,15	19,1	26,0	40,0	0,540	0,155	0,288	0,016	7,5	4,7	6,4	5,8
1,44	7,68	19,2	25,9	41,1	0,624	0,124	0,234	0,018	7,3	3,1	4,8	5,4

Tabela-5.3.6. Posições (Å) dos máximos nas distribuições de distância normalizadas (P1, P2, P3, P4) suas respectivas áreas (A1, A2, A3, A4) e largura (Å) a meia altura (L1, L2, L3, L4)

O peptídeo RKK3 na conformação toda estendida (figura 5.3.10a) tem uma distância entre o carbono do terminal carboxílico e o nitrogênio do terminal

amino de $\sim 90\text{\AA}$. Na conformação hélice alfa (figura 5.3.10b) esta distância é de $39\text{\AA}$. A distribuição de distância para o peptídeo na ausência de heparina mostra um pico predominante em $32,4\text{\AA}$ e um outro pico menor em $19,7\text{\AA}$. Quando adicionamos a primeira alíquota de heparina, ou seja, quando a relação entre a concentração de heparina e a concentração do peptídeo está em 0,15, o pico de $32,4\text{\AA}$ diminui para $28,9\text{\AA}$; o pico de $19,7\text{\AA}$ aparece novamente um pouco deslocado para distâncias menores e aparece um novo pico predominante em $8,09\text{\AA}$. Com adição de mais heparina estabilizam-se três picos: um perto de $8\text{\AA}$, outro perto de $19\text{\AA}$ e um outro perto de $25\text{\AA}$. Os resultados indicam que a adição de heparina favoreceu a formação de uma conformação com distância em torno de $19\text{\AA}$ que já existia antes da adição da heparina e a formação de uma nova conformação com distância próxima de $25\text{\AA}$ em detrimento da conformação com distância em $32,4\text{\AA}$. A distância de $8\text{\AA}$ que aparece com a adição de heparina pode tanto estar relacionada com alguma conformação dobrada de tal maneira que os terminais ficam muito próximos, como estar relacionada com a ligação de mais de um peptídeo por heparina causando a aproximação dos terminais de diferentes peptídeos. As distâncias obtidas são menores que as distâncias da conformação toda estendida e em hélice alfa.

A hélice alfa que aparece nos resultados de dicroísmo circular obtidos para o peptídeo RKK4 (Pimenta *et al*, 2002), pode estar em apenas parte do peptídeo e a outra parte que não está em hélice estaria dobrada de tal maneira que resultasse em uma distância entre as extremidades mais curta. É possível que algo semelhante esteja ocorrendo para o peptídeo RKK3. Se este peptídeo estiver todo em hélice alfa, esta hélice pode não ser toda reta e sim estar torcida em torno da heparina de tal maneira que resulte em uma distância entre as extremidades menor que a de uma hélice alfa.

Figura-5.3.10 RKK3 na conformação toda estendida (a) e na conformação hélice alfa. (b)

5.3.2.3 Mistura tampão/TFE.

Fizemos medidas em diferentes proporções da mistura TFE/Tampão. O TFE, conforme discutido no capítulo 1, é um solvente que induz a formação de hélice alfa em peptídeos em misturas TFE/Água, até a razão vol./vol. 30% (Hong *et al*, 1999). Portanto, espera-se que em 100% TFE o peptídeo esteja todo na conformação hélice alfa. Na tabela 5.3.7 estão apresentados os tempos de vida para o doador na ausência de aceitador.

Solvente	$\tau_1(\text{ns})$	a_1	$\tau_2(\text{ns})$	a_2	$\tau_3(\text{ns})$	a_3	$\tau_m(\text{ns})$
0 %TFE	8,589	0,274	3,101	0,055	-	-	8,22
20 %TFE	9,399	0,138	5,114	0,025	0,852	0,027	9,03
40 %TFE	9,592	0,150	4,944	0,027	1,097	0,029	9,22
60 %TFE	9,356	0,147	4,012	0,021	1,171	0,026	9,07
80 %TFE	9,172	0,154	3,952	0,032	0,749	0,032	8,75
100 %TFE	8,764	0,104	4,467	0,024	0,923	0,022	8,33

Tabela-5.3.7. Tempos de vida (τ) e os respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência do KKA

Na tabela 5.3.8 estão os valores de índice de refração (Katagiri, 2003) e rendimento quântico usados para determinar a integral de superposição espectral e R_0 que também estão apresentados nesta tabela.

	n	Φ_d	$J(\text{M}^{-1}\text{cm}^3)$	$R_0(\text{\AA})$
0 %TFE	1,334	0,286	4,14E-15	24,50
20 %TFE	1,332	0,225	7,31E-15	25,97
40 %TFE	1,326	0,529	5,85E-15	28,94
60 %TFE	1,315	0,565	7,30E-15	30,53
80 %TFE	1,303	0,522	7,36E-15	30,36
100 %TFE	1,291	0,341	7,59E-15	28,60

Tabela-5.3.8. A superposição espectral J , o rendimento quântico do doador e os valores de R_0 obtidos para o RKK3 em diferentes misturas tampão/TFE.

Houve um aumento do rendimento quântico com a adição do TFE na mistura TFE/Água e as alterações em R_0 forma maiores que as obtidas com a variação da proporção peptídeo/heparina. Estes resultados indicam que o TFE, diferentemente da heparina, gera uma alteração nos espectros do *o*-Abz e do Eddnp. Podemos notar que o rendimento quântico nas misturas TFE/Água é maior que nos ambientes em que há somente um tipo de solvente, seja ele água ou TFE. Este resultado, provavelmente, é um efeito dos agrupamentos de TFE que formam na mistura TFE/Água que gera um ambiente hidrofóbico em torno da sonda fluorescente (Hong *et al*, 1999).

A figura 5.3.11 apresenta as distribuições de distâncias obtidas. Na tabela 5.3.9 estão apresentados os valores das posições, a área normalizada e a largura a meia altura de cada pico para cada distribuição.

Figura-5.3.11 Distribuição de distâncias para o peptídeo RKK3 nas seguintes porcentagens de TFE na mistura TFE/Tampão 0% (■), 20% (○), 40% (□), 60% (▴), 80% (▾) e 100% (●).

	P1	P2	A1	A2	L1	L2
0 % TFE	16,3	28,0	0,05	0,95	5,3	6,5
20 % TFE	22,5	30,0	0,15	0,85	3,7	6,2
40 % TFE	33,8	-	1,00	-	8,2	-
60 % TFE	34,9	-	1,00	-	10,3	-
80 % TFE	34,8	-	1,00	-	11,5	-
100 % TFE	33,1	-	1,00	-	9,2	-

Tabela-5.3.9. Pico (P), área (A) e Largura a meia altura (L) obtidos da distribuição de distâncias para o RKK3 em diferentes misturas Tampão/TFE.

As distribuições de distâncias obtidas para os peptídeos em TFE e em misturas TFE/Água não correspondem as distribuições obtidas para os peptídeos na presença de heparina. Este resultado indica que as alterações nas conformações dos peptídeos na presença de heparina envolvem outras estruturas além da conformação hélice- α induzida pelo TFE.

5.2.3.4 SDS.

O peptídeo RKK3 contém muitos aminoácidos lisinas e argininas e portanto, possui muitas cargas positivas. Por outro lado, a heparina possui muitas cargas negativas. Portanto existe uma forte interação eletrostática entre

o peptídeo e a heparina. Como os agregados de SDS também são carregados negativamente, estudamos as alterações nas conformações no peptídeo devido a sua interação com esses agregados. Na tabela 5.3.10 estão apresentados os tempos de vida para o doador na ausência de aceitador.

Solvente	τ_1 (ns)	a_1	τ_2 (ns)	a_2	τ_3 (ns)	a_3
Tampão Fosfato	8,589	0,274	3,101	0,055	-	-
Tp. Fosf. + SDS	9,982	0,142	4,559	0,027	0,372	0,052

Tabela-5.3.10. Tempos de vida (τ) e os respectivos fatores pré-exponenciais (a) obtidos dos ajustes pelo decaimento da fluorescência do KKA.

Na tabela 5.3.11 estão os valores de índice de refração e rendimento quântico usados para determinar a integral de superposição espectral e R_0 que também estão apresentados nesta tabela.

	n	Φ_d	$J(M^{-1}cm^3)$	$R_0(\text{\AA})$
RKK3	1,334	0,286	4,142E-15	24,5
RKK3 + SDS	1,334	0,321	4,480E-15	25,4

Tabela-5.3.10. A superposição espectral J , o rendimento quântico do doador e os valores de R_0 obtidos.

Na figura 5.3.12 estão apresentadas as distribuições de distâncias para o peptídeo RKK3 na presença e na ausência de heparina. Na tabela 5.3.12 estão apresentados os valores das posições, a área normalizada e a largura a meia altura de cada pico para cada distribuição.

	P1	P2	P3	A1	A2	A3	L1	L2	L3
Tp. Fosf.	16,3	28,0	-	0,05	0,95	-	5,3	6,5	-
Tp. Fosf. + SDS	14,5	22,1	29,3	0,12	0,19	0,69	3,4	4,1	6,5

Tabela-5.3.12. Pico (P), área (A) e Largura a meia altura (L) obtidos da distribuição de distâncias para o RKK3 na presença e na ausência de SDS.

Figura-5.3.12 Distribuição de distâncias para o peptídeo RKK3 na presença e na ausência de SDS em tampão fosfato 0,01M pH 7,4

As medidas em SDS foram feitas na concentração de 150mM, acima da concentração micelar crítica, e bem maior que a concentração do peptídeo que foi de 20 μ M. Os resultados obtidos para o peptídeo RKK3 em SDS, embora diferentes daqueles obtidos para o mesmo peptídeo em misturas TFE/Água e em presença de heparina, também mostram que há uma diminuição da distância entre as extremidades. Isto indica que a diminuição da distância entre as extremidades, nos casos de interação com SDS e com heparina, provavelmente é um efeito combinado da neutralização das cargas positivas do peptídeo e do efeito hidrofóbico.

5.3.2.5 Dicroísmo Circular.

A figura 5.3.13 apresenta os espectros de dicroísmo circular, do peptídeo RKK3 em presença de heparina e de SDS e em TFE.

Os espectros de cd indicam a presença de hélice alfa no peptídeo RKK3 tanto em TFE como na presença de SDS. Porém, a presença de hélices alfa é maior em TFE, como pode ser visto na figura 5.3.13 pela elipticidade molar em 208nm.

Figura-5.3.13 Espectros de dicroísmo circular para o peptídeo RKK3 em presença de heparina (■) e SDS (▲) e em TFE (○).

Os espectros de dicroísmo circular mostram que há alterações na estrutura secundária dos peptídeos com a adição de TFE. Vemos pelos espectros de dicroísmo circular que está ocorrendo a formação de hélices alfa. Mesmo com a formação de hélice alfa nas medidas com TFE o decaimento não foi tão rápido como no caso da heparina. Este fato confirma a suposição de que no caso da interação com a heparina há formação de outras estruturas além das hélices alfa. Como o peptídeo é muito longo e o R_0 para estes peptídeos é da ordem de 26 Å, é de se esperar que a eficiência de

transferência, $E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$, seja muito pequena quando o peptídeo está em

uma conformação cuja distância (r) entre as extremidades seja quase o dobro de R_0 , como é o caso do RKK3 na conformação em hélice alfa. As distâncias obtidas ainda são menores que as distâncias esperadas para uma conformação toda em hélice alfa. Este problema pode estar relacionado com o fator orientacional k^2 , que depende das orientações relativas dos momentos de dipolo do doador e do aceitador e da orientação destes momentos de dipolo em relação ao eixo que une os dois. Estamos usando neste trabalho o valor médio de $2/3$ para o k^2 . O valor de k^2 pode variar de 0 a 4 conforme a mobilidade dos grupos doador-aceitadores. Vemos também que quando os

espectros de cd mostram um resultado de estrutura desordenada, a distribuição de distâncias tem uma largura maior representando a maior flexibilidade do peptídeo; quando o peptídeo adquire uma conformação mais definida a largura a meia altura é menor, indicando a formação de uma estrutura mais rígida.

Os resultados de dicroísmo circular para o RKK4 em TFE obtidos por Alberto Katagiri em seu trabalho de mestrado apresentado no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (Katagiri, 2003) indicaram a formação de hélices alfa assim como os de RKK4 em presença de heparina. Porém, as distribuições de distâncias para o RKK4 em TFE mostraram distâncias maiores que as obtidas para o peptídeo em presença de heparina. Este fato fortalece a suposição de que há formação de outras estruturas, além das hélices alfa, no peptídeo em presença de heparina.

A distribuição de distância em 20% de TFE mostra dois picos (22,5Å e 30,0Å) deslocados para distâncias maiores quando comparadas com os resultados em tampão. De 40% a 100% de TFE os resultados mostram apenas um pico largo (~10Å) centrado em torno de 34Å. Essa distância não é muito diferente do valor teórico para o peptídeo na conformação hélice alfa, que é de 39Å. Os resultados de cd, obtidos para este peptídeo, em TFE (100%) é típico de hélice. Portanto, os resultados da distribuição de distâncias indicam que é muito provável que o peptídeo esteja todo em hélice alfa a partir de 30% de TFE (Hong *et al*, 1990). Isto indica que a presença de hélice alfa mostrada no espectro de cd para o RKK3 em presença de heparina deve estar apenas em parte da sua seqüência de aminoácidos e que o peptídeo deve assumir outras conformações. A distribuição de distância para o RKK3 em presença de SDS mostra um pico centrado em 29,3Å, um centrado em 22,1Å e um centrado em 14,5Å. O espectro de cd do peptídeo RKK3 em presença de SDS é bastante parecido com o espectro obtido para o mesmo peptídeo em TFE, indicando a presença de hélice alfa. A elipticidade molar em 208nm para o peptídeo em presença de SDS é um pouco menor que a obtida para o peptídeo em TFE. Esta diferença vai ao encontro dos resultados de distribuição de distâncias que indicam a formação de outras conformações além da hélice alfa.

6 CONCLUSÕES

6.1 7B2CT.

Os espectros de absorção e de fluorescência do peptídeo 7B2CT são semelhantes aos da tirosina livre, com as mesmas posições das bandas. Desconsiderando os tempos de vida devido ao espalhamento, o decaimento da fluorescência da tirosina livre é praticamente mono-exponencial e o do 7B2CT é ajustado adequadamente por duas exponenciais. Os análogos A12 e A18 apresentam propriedades espectrais semelhantes, apesar da presença de um tempo de vida um pouco mais longo no 7B2CT.

As curvas de decaimento da anisotropia dos três peptídeos, ajustado a dois tempos de correlação rotacional também são bastante parecidas. O 7B2CT apresenta tempos menores indicando que tanto a tirosina como o peptídeo como um todo tem uma liberdade de movimento maior. Este resultado está de acordo com os resultados de supressão por iodeto, que mostram que a tirosina está acessível ao solvente da mesma maneira nos três peptídeos, apesar de uma supressão ligeiramente maior para o 7B2CT, comparado aos dois análogos.

Aliados aos resultados de cd, que indicam que os três peptídeos não possuem estrutura secundária definida, os dados obtidos mostram que a dinâmica da conformação dos peptídeos não é um fator preponderante na interação do peptídeo 7B2CT com a pró-hormônio convertase 2 no seu poder de inibição da atividade daquela enzima.

6.2 α -MSH.

A ligação do grupo *o*-Abz ao terminal amino do peptídeo α -MSH permitiu o seu estudo usando as técnicas associadas à transferência de energia por ressonância de Förster. As melanotropinas modificadas com o ácido orto aminobenzóico apresentam emissão do Trp⁹ significativamente reduzida comprada com melanotropinas nativas. Alteramos o programa CONTIN para

interpretar os dados de decaimento da fluorescência de modo a obter a distribuição de distâncias entre o *o*-Abz e o Trp⁹, supondo a validade do modelo de Förster para uma dada distância fixa e estimando as distâncias doador-aceitador dentro de 20% de incerteza para a distância crítica de Förster R_0 .

A função distribuição de distância entre o *o*-Abz e o Trp⁹ no α -MSH, que recuperamos os dados de fluorescência resolvida no tempo usando o CONTIN, são consistentes com os de simulação do peptídeo em solução aquosa por dinâmica molecular. Os dados revelaram uma ampla distribuição de distâncias entre o *o*-Abz e o Trp⁹, que pode refletir tanto a flexibilidade estrutural do peptídeo, como as distintas distâncias inter-residuais correspondentes às diferentes conformações acessíveis ao peptídeo.

No análogo o *o*-Abz-NDP- α -MSH, três distintas distâncias entre o *o*-Abz e o Trp⁹ puderam ser identificadas, mais curtas que aquelas do hormônio nativo. O peptídeo NDP- α -MSH tem maior atividade biológica que o hormônio nativo. Nossos resultados indicam a ocorrência de conformações relativamente compactas no hormônio modificado, comparado com o hormônio nativo. Os dados são consistentes com observações por nmr, que sugerem uma conformação com uma dobra induzida pela D-Phe⁷ no NDP- α -MSH, levando ao surgimento de uma população com distância curta na separação entre o *o*-Abz e o Trp⁹, em equilíbrio dinâmico com populações com distâncias mais longas.

Em TFE, os peptídeos apresentaram aumento no conteúdo de estruturas em hélice alfa e nossas medidas geraram duas populações de distâncias *o*-Abz -Trp⁹ no *o*-Abz- α -MSH, refletindo as restrições nas conformações impostas pelo solvente. Da mesma maneira, as três populações de distâncias obtidas para o *o*-Abz-NDP- α -MSH em água se tornaram em duas em TFE indicando que também nesse caso ocorre uma diminuição das conformações disponíveis para o peptídeo.

A técnica de fluorescência, com especial ênfase nos métodos baseados em fret, mostrou que o análogo mais potente tem uma conformação dobrada estabilizada em meio aquoso, em vez de flexibilidade característica do hormônio nativo. Além disso, foi observada similaridade entre as conformações dos peptídeos em ambiente não polar, sendo que a estrutura dobrada induzida

por um solvente menos polar pode ser importante para a atividade biológica do hormônio.

6.3 Cardin.

As técnicas de fluorescência associadas à transferência de energia por ressonância de Förster puderam ser aplicadas no estudo desta família de peptídeo. Dada a ausência de um fluoróforo intrínseco, a ligação do grupo o-Abz ao terminal amino do peptídeo e a ligação do grupo aceitador Eddnp no terminal carboxila permitiu o estudo por transferência de energia. Usando o programa CONTIN, foi possível, neste caso, recuperar dos dados de fluorescência resolvida no tempo, a função de distância entre os extremos dos peptídeos.

Verificamos que os peptídeos KK4, RKK4 e RKK3 não possuem uma estrutura definida quando estão na ausência de heparina. Na presença de heparina, a distância entre as extremidades destes peptídeos diminui consideravelmente, resultado que concorda com a observação do surgimento de hélices alfa nos peptídeos em heparina, feita por dicroísmo circular.

Alterações na distribuição de distância em KK4, RKK4 e RKK3 também foram observadas quando o meio solvente era TFE ou quando micelas de SDS estavam presentes no meio. Em ambos os casos houve diminuição nas distâncias Abz-Eddnp mostrando que os peptídeos adquirem conformações mais compactas. Todavia, os valores de distâncias obtidos para os peptídeos na presença de heparina, de TFE, ou de SDS, são menores que os valores esperados se estes peptídeos estivessem totalmente em hélice alfa. Portanto, podemos supor que estes peptídeos não estão totalmente em hélice e que podem estar ocorrendo outras dobras na estrutura, que levam a diminuição adicional da distância entre os terminais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Obeidi, F.; Hruby, V.J.; Castrucci, A.M.; Hadley ME. N.V.; Perkyns, J.S.; Pettitt, B.M.. *J Med Chem*, 32, 1, 174-179, Jan **1989a**.
- Al-Obeidi, F.; Castrucci, A.M.; Hadley, M.E.; Hruby, V.J. Potent and prolonged acting cyclic lactam analogues of alpha-melanotropin: design based on molecular dynamics. *J Med Chem*, 32, 12, 2555-2561, Dec **1989b**.
- Apletalina, E.V.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Lindberg, I. Structure-function analysis of the 7B2 CT peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 3, 940-942, Jan **2000**.
- Biaggi, M.H.; Riske, K.A.; Lamy-Freund, M.T.; Melanotropic peptides-lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone alpha-MSH to a biologically more potent analog. *Biophys Chem*, 67, 1-3, 139-149, Sep **1997**.
- Buck, M. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Quarterly Reviews Of Biophysics* 31 (3), 297-355, Aug 1998.
- Cann, J.R.; Liu, X.; Stewart, J.M.; Gera, J.; Kotovych, G. A cd and nmr study of multiple bradykinin conformations in aqueous trifluoroethanol solutions. *Biopolymers*, 34, 869-878, **1994**.
- Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. Techniques for the study of biological structure and function. San Francisco, W.H. Freeman and Company, **1980**. Part II.
- Cardin, A.D.; Weintraub, H.J.R. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*, 9, 21-32, **1989**
- Chagas, J.R.; Juliano, L.; Prado, E.S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. *Anal Biochem*, 92, 2, 419-25, Feb **1991**.
- Dale, R.E.; Eisinger, J. Intramolecular distances determined by energy-transfer - Dependence on orientational freedom of donor and acceptor. *Biopolymers*, 13, 8, 1573-1605, **1974**.
- Dive, V.; Lintner, K.; Femandjian, S.; St. Pierre, S.; Regoli, D. Preferred solution conformation of des-Arg9-bradykinin and analysis of structure conformation-activity relationships in the series [alan]des-arg9-bradykinin. *Eur J Biochem*, 123, 1, 179-90, Mar **1982**.
- Fernandez, R.M.; Ito, A.S.; Schioth, H.B. Structural study of melanocortin peptides by fluorescence spectroscopy: identification of beta-(2-naphthyl)-D-alanine as a fluorescent probe. *BBA-Gen Subjects*, 1623, 1, 13-20 Sep **2003**.

- Förster Th. Delocalized excitation and excitation transfer. In: Sinanoglu O., ed. *Modern Quantum Chemistry*. New York, Academic Press, **1965**. v.3.
- Haas, E.; Wilchek, M.; Katchalski-Katzir, E.; Steinberg, I.Z. Distribution of end-to-end distances of oligopeptides in solution as estimated by energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 5, 1807-11, May **1975**.
- Horton, H.R.; Moran, L.; Ochs, R.; Rawn, J.D.; Scrimgeour, K.G. Principles of biochemistry. 2.ed. New Jersey, Prentice Hall, **1996**.
- Hoch, G.; Knox, R.S. Primary processes in photosynthesis. In: Giese, A.C., ed. *Photophysiology*. New York, Academic Press, **1968**. v.3.
- Hong, D.P.; Hoshino, M.; Kuboi, R.; Goto, Y. Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides *Journal Of The American Chemical Society*, 121, 37, 8427-8433 Sep **1999**.
- Hruby, V.J.; Cody, W.L.; Castrucci, A.M.L.; Hadley, M.E. Conformational and biological analysis of α -MSH fragment analogues with sterically constrained amino acid residues. *Collect. Czech. Chem. Commun*, 53, 2549-2566, **1988**.
- Ito, A.S.; Turchiello, R.D.; Hirata, I.Y.; Cezari, M.H.; Meldal, M.; Juliano, L. Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid. *Biospectroscopy*, 4, 6, 395-402, **1998**.
- Ito, A.S.; Castrucci, A.M.D.; Hruby, V.J.; Hadley, M.E.; Krajcarski, D.T.; Szabo, A.G. Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry-US*, 32, 45, 12264-12272, Nov **1993**.
- Ito, A.S.; de Souza, E.S.; Barbosa, S.D. Nakaie C.R. Fluorescence study of conformational properties of melanotropins labeled with aminobenzoic acid. *Biophys, J* 81, 2, 1180-1189, Aug **2001**.
- Jacchieri, S.G.; Ito, A.S. Characterization of structural transitions from aqueous-solution to a lipid phase for α -msh. *Int J Quantum Chem*, 53, 3, 335-341, Feb **1995**.
- Jackson, R.L.; Busch, S.J.; Cardin, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev*, 71, 2, 481-539, Apr **1991**.
- Jasanoff, A.; Fersht, A.R. Quantitative-determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. *Biochemistry*, 33, 8, 2129-2135, Mar **1994**.

- Juliano, L.; Chagas, J.R.; Hirata, I.Y.; Carmona, E.; Sucupira, M.; Oliveira, E.S.; Oliveira, E.B.; Camargo, A.C. A selective assay for endooligopeptidase a based on the cleavage of fluorogenic substrate structurally related to enkephalin. *Biochem Biophys Res Commun*, 173, 2, 647-52, Dec 1990.
- Kotovych, G.; Cann, J.R.; Stewart, J.M.; Yamamoto, H. Nmr and cd conformational studies of bradykinin and its agonists and antagonists: application to receptor binding. *Biochem Cell Biol*, 76, 2-3, 257-66, 1998.
- Kulinski, T.; Wennerberg, A.B.; Rigler, R.; Provencher, S.W.; Pooga, M.; Langel, U.; Bartfai, T. Conformational analysis of galanin using end to end distance distribution observed by forster resonance energy transfer. *Eur Biophys J*, 26, 2, 145-54, 1997.
- Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Plenum Press, 1983.
- Landau, L. D.; Lifshitz, E. M. The classical theory of fields. Oxford; New York : Pergamon Press, 1983.
- Lee, S.C.; Russell, A.F.; Laidig, W.D. three-dimensional structure of bradykinin in sds micelles. study using nuclear magnetic ressonance, distance geometry, and restrained molecular mechanics and dynamics. *Int J Pept Protein Res*, 35, 5, 367-77, May 1990.
- Lehninger, A.L. Princípios de bioquímica. Trad. de W.R. Lodi e A.A. Simões. São Paulo, Sarvier, 1984.
- Lide, D.R. Handbook of organic solvents. Boca Raton, CRC Press, 1995.
- Macedo, Z.S.; Furquim, T.A.; Ito, A.S. Estimation of average depth of penetration of melanotropins in dimyristoylphosphatidylglycerol vesicles *Biophys Chem*, 59, 1-2, 193-202, Mar 1996.
- Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *Journal of Physical Chemistry*, 65, 2, 229-235, Feb 1961.
- Mukhopadhyay, K.; Basak, S. Conformation induction in melanotropic peptides by trifluoroethanol: fluorescence and circular dichroism study. *Biophys Chem*, 74, 3, 175-86, Sep 1998.
- Nakaie, C.R.; Barbosa, S.R.; Vieira, R.F.; Fernandez, R.M.; Cilli, E.M.; Castrucci, A.M.D.; Visconti, M.A.; Ito, A.S.; Lamy-Freund, M.T. Comparative epr and fluorescence conformational studies of fully active spin-labeled melanotropic peptides. *Febs Lett*, 497, 2-3, 103-107, May 2001.

- Pascutti, P.G.; El-Jaik, L.J.; Bisch, P.M.; Mundim, K.C.; Ito, A.S. Molecular dynamics simulation of alpha-melanocyte stimulating hormone in a water-membrane model interface *Eur Biophys J Biophys*, 28, 6, 499-509, **1999**.
- Pimenta, D.C.; Nantes I.L.; De Souza E.S.; Le Bonniec, B.; Ito, A.S.; Tersariol, I.L.S.; Oliveira, V.; Juliano, M.A.; Juliano, L. Interaction of heparin with internally quenched fluorogenic peptides derived from heparin-binding consensus sequences, kallistatin and anti-thrombin III. *Biochem J*, 66, 435-446, **2002**.
- Prabhu, N.V.; Perkyuns, J.S.; Pettitt, B.M. Modeling of alpha-MSH conformations with implicit solvent. *J Pept Res*, 54, 5, 394-407, Nov **1999a**.
- Prabhu, N.V.; Perkyuns, J.S.; Pettitt, B.M.; Hruby, V.J. Structure and dynamics of alpha-MSH using DRISM integral equation theory and stochastic dynamics. *Biopolymers*, 50, 3, 255-272, Sep **1999b**.
- Provencher, S.W. A Constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Computer Physics Communications*, 27, 213-227, **1982**.
- Provencher, S.W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Computer Physics Communications*, 27, 229-242, **1982**.
- Rao, A.G.; Stewart, J.M.; Vavrek, R.J.; Sillerud, L.O.; Fink, N.H.; Cann, J.R. A fluorometric study of the interaction of bradykinin with lipids. *Biochim Biophys Acta*, 997, 3, 278-83, Aug **1989**.
- Reiersen, H.; Rees, A.R. Trifluoroethanol may fomr a solvent matrix for assited hydrophobic interactions between peptide side chains. *Protein Engineering*, 13, 11, 739-743, **2000**.
- Ross J.B.A.; Laws W.R.; Rousslang K.W.; Wyssbrod H.R. Tyrosine fluorescence and phosphorescence from proteins and polypeptides. In: *Topics in fluorescence spectroscopy*. New York, Plenum Press, **1992**. v.3.
- Sawyer, T. K.; Sanfillippo, P. J.; Hruby, V. J.; Engel, M. H.; Heward, C. B.; Burnett, J. B.; Hadley, M. E. 4-norleucine, 7-Dphenylalanine-R-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent r-melanotropin with ultra long biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 5754-5758, **1980**.
- Souto, A.L.C.F.; Ito, A.S. Tryptophan fluorecence studies of melanotropins in the amphiphile-water interface of reversed micelles *Eur Biophys J Biophys*, 29, 1, 38-47, **2000**.
- de Souza, E.S.; Hirata, I.Y.; Juliano, L.; Ito, A.S. End-to-end distance distribution in bradykinin observed by Forster resonance energy transfer. *Biochim Biophys Acta*, 1474, 2, 251-261, Apr **2000**.

- Speiser, S. Photophysics and mechanisms of intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecular systems: solution and supersonic jet studies. *Chemical Reviews*, 96, 6, 1953-1976, Sep-Oct **1996**.
- Steinberg, I.Z.; Haas, E.; Katcahlski-Katzir, E. Long-range nonradiative transfer of electronic excitation energy. In: Cundall, R.B.; Dale, R.E, eds. *Time resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology*. New York, Plenum Press, **1983**. (NATO ASI Séries. Series A: Life Science, v.69).
- Stryer, L. Biochemistry. 4.ed. New York, W.H. Freeman and Company, **1995**.
- Turchiello, R.F.; Lamy-Freund, M.T.; Hirata, I.Y.; Juliano, L.; Ito, A.S. Ortho-aminobenzoic acid as a fluorescent probe for the interaction between peptides and micelles. *Biophysical Chemistry*, 73, 3, 217-225, Jul **1998**.
- Turchiello, R.F.; Juliano, L.; Ito, A.S. How bradykinin alters the lipid membrane structure: A spin label comparative study with bradykinin fragments and other cations. *Biopolymers*, 54, 3, 211-221, Sep **2000**.
- Woody R.W. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In: Fasman G.D., ed. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. New York, Plenum Press, **1996**.
- Yaron, A.; Carmel, A.; Katchalski-Katzir, E. Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. *Anal Biochem*, 95, 1, 228-235, May **1979**.
- Young, J.K.; Hicks, R.P. Nmr and molecular modeling investigations of the neuropeptide bradykinin in three different solvent systems: DMSO, 9:1 dioxane/water, and in the presence of 7.4 mM lyso phosphatidylcholine micelles. *Biopolymers*, 34, 5, 611-623, May **1994**.
- Zhu, X.; Lamango, N.S.; Lindberg, I. Involvement of a polyproline helix-like structure in the interaction of 7B2 with prohormone convertase 2. *Mol Biol Cell*, 7, 2922-2922, Suppl. S, Dec **1996**.