UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

HAROLDO DE LIMA PIMENTEL CRAVO

ESTUDOS BIOFÍSICOS DA CORRELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO NA PROTEÍNA
P450 DE *S. clavuligerus* E EM PEPTÍDEOS ATIVOS NA MEMBRANA

RIBEIRÃO PRETO
2017

HAROLDO DE LIMA PIMENTEL CRAVO

Estudos biofísicos da correlação estrutura-função na proteína P450 de *S. clavuligerus* e em peptídeos ativos na membrana.

2ª Versão

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cravo, Haroldo de Lima Pimentel

Estudos biofísicos da correlação estrutura-função na proteína P450 de *S. clavuligerus* e em peptídeos ativos na membrana. / Haroldo de Lima Pimentel Cravo;

orientador Prof. Dr. Antonio José da Costa-Filho. Ribeirão Preto –SP, 2017.

152 f.:il

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Biofísica. 2. Espectroscopia. 3. Citocromo P450. 4. Peptídeos ativo na membrana. 5. Biologia Estrutural. 6. Ácido clavulânico. I. José da Costa-Filho, Antonio, orient. II. Título.

Nome: CRAVO, Haroldo de Lima Pimentel

Título: Estudos biofísicos da correlação estrutura-função na proteína P450 de *S. clavuligerus* e em peptídeos ativos na membrana.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 04/05/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico aos meus pais e irmãos, que
nunca mediram esforços para me
ajudarem nesta intensa jornada.

Especial, à minha doce amiga
Natália Biziak.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Deus, que permitiu que eu chegasse ao fim desta jornada iniciada em 2006.

Ao JB, por todos os anos de trabalho, companheirismo, ensinamentos de como fazer ciência, muita paciência e principalmente por ser um líder que agrega e te motiva para frente, sempre!

Aos amigos do “Laboratório de Biofísica Molecular” pelos anos de convivência e aprendizagem conjunta. Pri e Ana, sempre iremos ao Valter para a hora de tirar o “stress”. Sussu e Rafa, meu agradecimento eterno por me socorrerem quando eu precisei. Felipe e Pops pelas idas e conversas de golfinhos no bandex. Raquel e Natasha pelas longas conversas das quais sinto falta e Naty, pela parte nerd que faltava neste laboratório. Carol e Lucas, pelos cafés e os bolos.

Ao pessoal do grupo de São Carlos que sempre foram prestativos em nos ajudar com as facilidades que eles possuem lá. Aos técnicos Bel, Drê e Fernando, por abrirem as portas e nos fazerem sentir no laboratório “de casa”.

Ao pessoal do Laboratório de Cristalografia, Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Nonato e Dr(a). Joanne Rustigel por me ajudarem a aprender um pouco desse mundo dos cristais de proteínas.

Aos que me fizeram companhia em Ribeirão quando me mudei, Géssyka que sempre me ouviu, me compreendeu e para mim é como minha irmã, por isso escrevo seu nome errado, viu Jessica? Marina e David por serem inspiração para mim e Natália, pelas inúmeras e incontáveis vezes que me ajudou como agente infiltrada USP, por todos os crochês, bordados e unhas que te acompanhei fazer em conversas na copinha. “Nhéeeeeeee” para você amiguinha.

Aos meus amados amigos de Rio Preto que sempre me apoiaram: Mirian Elisa, Bruno, Camila, Rafa, Mari e Thiago, Flavia e ao Raulzito e a Elizinha por me encherem de boas energias e o incondicional apoio do Danilo.

À professora Dr(a). Anne Ulrich por me aceitar em seu grupo na KIT e o Dr. Jochen Bürck, por me receber tão bem em Karlsruhe. Siegmar, pelas longas filosofias e curiosidades de micro-controladores. À minha grande amiga Bianca, pela inestimável companhia no meu período na Alemanha, com dicas, passeios, corridas, conversas e um jeito tão gentil de ser, sinto muita falta de tudo. Foi uma experiência maravilhosa!

Aos meus amigos de todo sempre e décadas: Andrea, Elisiane, João Vitor, Leandro, Jamilly, Tati, André, Ana Paula, vocês sempre acreditaram em mim e não existem palavras para expressar o que sinto para agradecer.

À minha família, vocês me trouxeram até aqui.

Ao CNPq, CAPES, FAPESP e Fundação Erasmus Mundus por todo apoio financeiro.

“Pergunte aos céus, quem sabe ele te dirá, o que acontece contra sua vontade”, LP, 2015.

RESUMO

CRAVO, Haroldo de Lima Pimentel. **Estudos biofísicos da correlação estrutura-função na P450 de *S. clavuligerus* e em peptídeos ativos na membrana**. 2017. 153 f. Tese (Doutorado em Física aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

As técnicas espectroscópicas utilizam a interação entre luz e matéria como forma de obter informações das características moleculares de um sistema. Os diversos níveis de energia manifestam-se em bandas espectrais que ao serem interpretadas fornecem características sobre estrutura, orientação e interações a nível molecular. O presente trabalho explorou as diversas facetas espectroscópicas, aliadas a técnicas biofísicas/bioquímicas, no intuito de compreender melhor dois tipos de biomoléculas importantes para a maquinaria dos seres vivos: proteínas e peptídeos. O citocromo P450 é uma enzima do tipo monooxigenase e constitui uma das maiores superfamílias de proteínas. Essa hemoproteína foi assim nomeada devido à sua característica absorção na região da Banda de Soret (450 nm), sendo esta uma particularidade natural muito utilizada em estudos por espectroscopia. Além disso, existe interesse de estudar esta família de proteínas em virtude de suas variadas funções metabólicas e biossintéticas, nos mais diversos organismos, como catalisação de esteróides, ácidos graxos, fármacos, carcinógenos químicos e metabólitos de plantas. Em especial, para a P450 de *Streptomyces clavuligerus* (P450CLA), ainda não se sabe ao certo como e com quais moléculas interage, e como funciona o mecanismo utilizado pela proteína para atuar em vias de síntese como a do ácido clavulânico, importante composto terapêutico. Paralelo ao paradigma de interação de uma proteína e potenciais ligantes, o entendimento dos mecanismos de interação entre peptídeos e membranas lipídicas também são de suma importância para uma melhor compreensão dos sistemas biomoleculares. Peptídeos ativos na membrana desempenham funções fundamentais no sistema de defesa de diversos organismos e decifrar os mecanismos de como essas biomoléculas agem quando inseridas em bicamadas lipídicas pode auxiliar, por exemplo, no desenvolvimento de terapias seguras e eficientes contra doenças degenerativas. Desta forma, aproveitamos as características espectroscópicas naturais de ambas as moléculas para serem empregadas em técnicas de absorção UV/vis, Dicroísmo Circular Eletrônico e Magnético, Ressonância Paramagnética Eletrônica e Ressonância Magnética Nuclear, auxiliados por técnicas termodinâmicas e de fluorescência, de modo a explorar a interação da luz com a matéria, sem interferências de sondas externas, dando enfoque às alterações de estrutura e orientação, nas mais variadas formas de interação entre moléculas de sistemas biológicos.

Palavras-chave: 1. Espectroscopia. 2. Citocromo P450. 3. Peptídeos ativos na membrana. 4. Biofísica Molecular. 5. Ácido Clavulânico.

ABSTRACT

CRAVO, Haroldo de Lima Pimentel. **Biophysical studies of structuring-function correlation in *S. clavuligerus* P450 and membrane active peptides**. 2017. 153 f. Thesis (Ph.D. in Physics applied to Medicine and Biology) – Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

Spectroscopic techniques use the interaction between light and matter as a way for obtaining information about molecular characteristics of a system. The many energy levels manifest themselves in spectral bands, which when are interpreted, it provides characteristics about structure, orientation and interactions at the molecular level. The present study explored the various spectroscopic facets, allied to biophysical/biochemical techniques, in order to understand better two important biomolecules types for living beings machinery: proteins and peptides. Cytochrome P450 is a monooxygenase-like enzyme and it belongs to one of the largest proteins superfamilies. The hemoprotein received this name due its unique spectral absorption in Soret Band region (450 nm), a natural particularity widely used in spectroscopic studies. In addition, there is interest in studying this protein family by virtue of their several metabolic and biosynthetic functions in the most diverse organisms, such as steroids, fatty acids, drugs, chemical carcinogens and plant metabolites. In particular, regarding P450 from *Streptomyces clavuligerus* (P450CLA), it is still unclear how and which molecules it interacts with, and how the mechanism used by the protein to act in synthesis pathways such as clavulanic acid, an important therapeutic compound. Parallel to the interaction paradigm between proteins and potential ligands, the interaction mechanisms understanding between peptides and lipid membranes are also of paramount importance for a better understanding of the biomolecular systems. Active membrane peptides play key roles in the defense system of various organisms and to decipher the mechanisms how these biomolecules act when inserted into lipid bilayers, for example in the development of safe and efficient therapies against degenerative diseases. This way, we take advantage of the natural spectroscopic characteristics of both molecules to be used in UV/vis absorption techniques, Electronic and Magnetic Circular Dichroism, Electronic Paramagnetic Resonance and Nuclear Magnetic Resonance, aided by thermodynamic and fluorescence techniques, in order to explore the interaction of light with matter, without interference from external probes, focusing on changes in structure and orientation, in the most varied forms of interaction between biological systems molecules.

Key-words: 1. Spectroscopy. 2. P450 Cytochrome. 3. Active Membrane Peptides. 4. Molecular Biophysical. 5. Clavulanic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura de P450.	20
Figura 2: Estrutura do grupo heme.....	22
Figura 3: Esquema do espectro da diferença de absorção UV/vis.	25
Figura 4: Resultados da expressão e purificação da P450CLA visualizados por eletroforese em gel SDS-Page.....	41
Figura 5: Perfil de eluição da proteína P450CLA.	42
Figura 6: Curva de calibração de massa molecular obtida a partir dos resultados de gel filtração.....	43
Figura 7: Perfil de eluição da proteína P450CLA e Ovoalbumina..	44
Figura 8: Espectro de CD da proteína P450CLA..	45
Figura 9: Espectros de Dicroísmo Circular com variação de temperatura.....	48
Figura 10: Termograma de DSC obtido da proteína P450CLA..	49
Figura 11: Medida da Temperatura de transição da P450CLA pela técnica de Termofluor. .	50
Figura 12: Espectro de absorção UV/vis do citocromo P450CLA.	52
Figura 13: Espectro de EPR do estado férrico de P450CLA.	54
Figura 14: Espectro de MCD da proteína P450CLA.....	55
Figura 15: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA na presença de Imidazol.....	59
Figura 16: Espectro de absorção no UV/vis da P450CLA na presença de Glicil-Histina.	60
Figura 17: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA em presença de Diclofenaco de Sódio (A) e Lidocaína (B).....	61
Figura 18: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA em presença de Cânfora (A) e Prolina (B).	62
Figura 19: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada à molécula de Imidazol.	63
Figura 20: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada a molécula de Glicil-Histidina.	64
Figura 21: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada à molécula de (A) Diclofenaco de Sódio e (B) Lidocaína.....	65
Figura 22: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada a molécula de (A) Cânfora e (B) Prolina.	66
Figura 23: Espectro de EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Imidazol.....	69
Figura 24: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Glicil-Histidina.	70
Figura 25: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Lidocaína.	71
Figura 26: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e presença de Diclofenaco de Sódio.....	72
Figura 27: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e presença de Cânfora. .	73
Figura 28: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Prolina.	75
Figura 29: Termograma da proteína P450CLA na ausência presença de Imidazol (A) e Glicil-Histidina (B).....	77
Figura 30: Termograma da proteína P450CLA na ausência e na presença de Diclofenaco de Sódio (A) e Lidocaína (B).....	78

Figura 31: Termograma da proteína P450CLA na ausência e na presença de Cânfora (A) e Prolina (B).....	80
Figura 32: MCD da Proteína P450CLA na ausência e presença de Imidazol.	82
Figura 33: MCD da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Diclofenaco de Sódio.	83
Figura 34: HYSORE Proteína P450CLA na presença de Diclofenaco de Sódio.	85
Figura 35: Voltametria Cíclica do Polímero Polianilina depositado sobre um eletrodo.....	87
Figura 36: Voltametria Cíclica do Polímero Polianilina com a P450CLA imobilizada.....	88
Figura 37: Ensaios de Cristalização da P450CLA na ausência de ligantes.	90
Figura 38: Ensaios de Cristalização da P450CLA complexado ao Imidazol..	91
Figura 39: Ensaio de Cristalização da P450CLA complexada ao Diclofenaco de Sódio..	91
Figura 40: Espectro de CD (A) e OCD (B) do trabalho de Woody (1993).....	112
Figura 41: Espectros de CD dos na região do UV distante peptídeos (KL) _n em água, pH 4,5.	116
Figura 42: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos (KL) _n em tampão fosfato de potássio, pH 7,0.	117
Figura 43: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos (KL) ₁₀ e (KL) ₂₀ em diferentes tampões.....	119
Figura 44: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos (KL) _n em tampão fosfato de potássio e TFE 50/50 (v/v)..	120
Figura 45: Espectros de CD na região do UV distante obtidos dos peptídeos (KL) _n em DMPC:DMPG e POPC:POPG.	121
Figura 46: Representação Geométrica da curvatura de fosfolipídeos.....	124
Figura 47: Espectros de OCD dos peptídeos (KL) _n na presença de membranas de diferentes composições lipídicas.....	126
Figura 48: Espectros de OCD dos peptídeos (KL) _n na presença de vesículas de diferentes composições lipídicas.....	129
Figura 49: Espectros de NMR ³¹ P da mistura de DMPC:DMPG em função da variação da temperatura.....	132
Figura 50: Espectros de RMN de ³¹ P com variação da razão molar do peptídeo (KL) ₁₀ na presença de POPC:POPG e DMPC:DMPG.	134
Figura 51: Espectros de RMN de ³¹ P - Perturbação dos peptídeos (KL) _n em presença POPC:POPG (1:2).	135
Figura 52: Espectros de RMN de ³¹ P - Perturbação dos peptídeos (KL) _n em presença DMPC:DMPG (1:2).	137
Figura 53: Espectros de RMN de ³¹ P - Teste de concentração do peptídeo (KL) ₁₀ na presença LMPC:DMPC (1:2).....	138
Figura 54: Vazamento de vesícula por Fluorescência.	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Moléculas <i>decoys</i>	57
Tabela 2 – Nomenclatura utilizada para identificação dos peptídeos	106
Tabela 3 - Resultados da desconvolução dos espectros de CD dos peptídeos (KL) _n	123
Tabela 4 – Razão $\theta_{200}/\theta_{218}$ das intensidades máximas e mínimas dos espectros de OCD.	128
Tabela 5 – Teste de concentração inibitória contra microrganismos	130

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1.0 O CITOCROMO P450	17
1.1 Introdução	17
1.1.1 Características estruturais do citocromo P450.....	19
1.1.2 Atividade enzimática do citocromo P450	21
1.1.2.1 Propriedades do grupo Heme	21
1.1.2.2 Mecanismo Catalítico	23
1.1.2.3 O paradigma da classificação espectroscópica por tipos	24
1.1.3 CYP105M1 - O citocromo de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	27
1.2 OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVAS	29
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
1.3.1 Propagação do plasmídeo, expressão e purificação da P450CLA.....	30
1.3.2 Estudos de Oligomerização do Citocromo P450CLA.....	32
1.3.3 Dicroísmo Circular	33
1.3.4 Dicroísmo Circular Magnético.....	34
1.3.5 Caracterização por Espectrometria Ultravioleta visível (UV/vis)	34
1.3.6 Thermofluor	35
1.3.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	36
1.3.8 Ressonância Paramagnética Eletrônica de onda contínua e de onda pulsada (EPR-CW e EPR-Pulsado).....	36
1.3.9 Voltametria Cíclica	37
1.3.10 Ensaio de Cristalização	38
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
1.4.1 Expressão e Purificação do Citocromo P450CLA	40
1.4.2 Caracterização Biofísica da P450CLA.....	41
1.4.2.1 Estudo de Oligomerização da Proteína P450CLA.....	41
1.4.2.2 Análise Estrutural por Dicroísmo Circular (CD)	44
1.4.2.3 Estudos de estabilidade térmica	46
1.4.2.4 Caracterização do grupo Heme	50
1.4.3 Caracterização da interação da P450CLA com moléculas <i>decoy</i>	56
1.4.3.1 Caracterização de ligantes a proteína P450CLA pelo perfil da curva de absorção UV-Vis	58
1.4.3.2 Caracterização do tipo de ligante a proteína P450CLA pelo espectro da diferença UV/vis.....	62
1.4.3.3 Caracterização da interação da P450CLA com moléculas <i>decoy</i> por EPR	68
1.4.3.4 Caracterização Termodinâmica da interação da proteína P450CLA com moléculas <i>decoy</i>	75

1.4.4 Caracterização das interações P450CLA com Diclofenaco de Sódio e Imidazol por MCD, EPR pulsado e Voltametria Cíclica	80
1.4.5 Ensaios de Cristalização da P450CLA	89
2.0 PEPTÍDEOS ATIVOS NA MEMBRANA	94
2.1 Introdução.....	94
2.1.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMP)	95
2.1.2 Peptídeos amilóides	97
2.1.3 Peptídeos anfipáticos modelo.....	100
2.2 OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVA	102
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.3.1 Materiais utilizados	104
2.3.2 Escolha do peptídeo anfipático modelo	104
2.3.3 Síntese dos peptídeos.....	105
2.3.4 Dicroísmo Circular (CD)	106
2.3.5 Dicroísmo Circular Orientado (OCD)	108
2.3.5.1 Considerações teóricas.....	109
2.3.5.2 OCD em peptídeos de folha- β	111
2.3.5.3 Preparação das amostras e Medidas.....	112
2.3.6 Ressonância Magnética Nuclear de Estado Sólido - ssNMR	114
2.3.7 Experimento de Vazamento de Vesícula por Espectroscopia de Fluorescência	115
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	116
2.4.1 Análise estrutural por Dicroísmo Circular.....	116
2.4.2 Estudo da orientação de folhas- β em membranas modelo por Dicroísmo Circular Orientado	123
2.4.3 Perturbação da bicamada lipídica por ssNMR	130
2.4.3.1 Atividade antimicrobiana	130
2.4.3.2 Estudos de ssNMR ^{31}P	131
2.4.3.3 Ensaio de Vazamento de Vesículas por Fluorescência.....	139
3.0 CONCLUSÕES.....	143
4.0 REFERÊNCIAS	145

INTRODUÇÃO

A luz possui diferentes tipos de energia e, por meio disto, pode ser usada como instrumento capaz de fornecer características moleculares da matéria. As técnicas espectroscópicas tiram proveito deste fato e empregam a interação da luz com a matéria como forma de extrair informações consistentes a respeito de sua identidade e estrutura. Esta interação é um fenômeno quântico dependente de propriedades da radiação e de partes estruturais da matéria, sendo que as transições eletrônicas envolvidas neste evento são responsáveis pelo perfil espectral que emergirá como resultado (HOFMANN, 2012).

O gráfico de intensidade da absorção em função do comprimento de onda é chamado de espectro de absorção. De casos mais simples, como átomos individuais, a situações complexas, como o caso molecular, as transições eletrônicas levam ao formato da linha do espectro. Geralmente as moléculas biológicas possuem mais que dois átomos e assim, os diagramas de energia produzidos por estas moléculas são extremamente complexos, uma vez que diferentes orbitais se combinam para produzir os orbitais moleculares. Por causa da existência dos mais diversos tipos de níveis de energia, o espectro molecular geralmente manifesta-se na forma de bandas espectrais que são particulares e específicas da molécula devido aos seus estados únicos de vibração. (SCHULTZ, 2010).

Os conceitos básicos de espectroscopia consistem no lançamento de partículas com propriedades bem definidas em uma amostra e posterior análise das partículas resultantes que são emitidas desta interação. Uma dada ferramenta espectroscópica pode ser apta a investigar determinados compostos biológicos e responder uma hipótese em particular. A aplicação de uma dada técnica espectroscópica vem da identificação dos seus limites fundamentais e da informação que ela pode fornecer, a partir de sua sensibilidade, seletividade e resolução (HOFMANN, 2012).

Proteínas e peptídeos são sistemas que se assemelham em constituição, contudo, tornam-se distintos em nível de complexidade. Uma vez que objetos de estudos biológicos constituem um vasto conjunto de integrantes moleculares e macromoleculares, em que cada um possui propriedades particulares, a junção de diversas técnicas espectroscópicas pode oferecer as ferramentas necessárias para investigar informações relevantes a respeito de suas estruturas e funções, adequados aos seus tamanhos, complexidade e aos desafios envolvidos neste contexto (SCHULTZ, 2010).

Neste trabalho podemos constatar que o uso de diversas técnicas espectroscópicas, aliadas a métodos biofísicos, é uma estratégia útil para correlacionar o entendimento de sistemas mais simples, como a interação peptídeo-membrana e suas particularidades de estrutura/função, bem como situações que envolvam maior complexidade, ao considerarmos interações proteína-ligantes, seus mecanismos de ação e alterações estruturais que proporcionam isso.

1.0 O CITOCROMO P450

1.1 Introdução

As primeiras evidências experimentais da existência das proteínas P450 apareceram em 1958, quando um pigmento ligante de monóxido de carbono foi identificado em microssomos de fígado de coelho, cujas características espectrais apresentaram absorção máxima no comprimento de onda 450 nm (OMURA, 2012). Em um trabalho de 1962, Mason e colaboradores utilizaram Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) em frações celulares de tecido animal e os espectros de microssomos de fígado obtidos sugeriram a presença de ferro nas amostras (OMURA, 2012). Posteriormente, demonstrou-se que o pigmento era advindo de uma hemoproteína com grupamento ferro-protoporfirina IX e, devido a sua característica única de absorção na região de 450 nm, recebeu o nome de citocromo P450, em que o “P” é a abreviatura para “pigmento” (PYLYPENKO; SCHLICHTING, 2004).

Desde então, abriu-se um vasto campo de pesquisa para uma das maiores superfamílias de proteínas encontradas na natureza. Os citocromos P450 possuem papel essencial na biossíntese de diversas substâncias, como por exemplo hormônios esteróides, vitaminas, na desintoxicação e ativação de fármacos e poluentes ambientais, participam da síntese de uma gama de metabólitos secundários de bactérias, fungos, plantas e insetos, além da ativação enzimática de carcinógenos. (URLACHER; GIRHARD, 2011). Hoje são mais de 21.000 proteínas conhecidas, atuando em todos os tipos de seres vivos (ZHAO et al., 2012) e que catalisam as mais diversas reações de moléculas orgânicas, sendo assim, um atrativo sistema biotecnológico a ser estudado com inúmeras aplicações (BERNHARDT; URLACHER, 2014).

Os citocromos P450 são enzimas do tipo monooxigenase externa, identificadas pela presença de um grupo porfirina coordenado por uma ligação do tipo heme-tiolato, em que um íon de Ferro III (Fe^{+3}) encontra-se ligado. As monooxigenases podem ser divididas em duas classes: interna, se extraem agentes redutores do próprio substrato

para reduzir a molécula de oxigênio em água, ou externa, ao se utilizarem de um agente redutor externo. Em virtude de suas distintas propriedades espectroscópicas, de caráter similar às hemoproteínas e por suas funcionalidades para transferências de elétron, a P450 também recebeu a alcunha de citocromo (BERNHARDT, 2006).

A imensa quantidade de citocromos P450 levou ao estabelecimento de uma nomenclatura própria embasada no grau de identidade entre as sequências primárias de aminoácidos das enzimas dos diversos organismos. Inicialmente, elas são nomeadas pela sigla CYP (originado do inglês, **Cytochrome P450**) e em seguida recebem números (CYP1, CYP2, CYP3, etc) que identificam as famílias cujos membros pertencentes dividem mais de 40% de identidade em suas sequências de aminoácidos. Por sua vez, estas famílias foram divididas em subfamílias que compartilham mais de 55% de identidade entre suas sequências primárias e identificadas por letras maiúsculas do alfabeto (A, B, C, D e etc). Por fim, estas subfamílias foram subdivididas de acordo com o *locus* gênico de cada proteína e nomeadas por seus respectivos números. Sendo assim, o citocromo CYP105M1 pertence à família 105, subfamília M, com *locus* gênico 1. A aceitação universal deste sistema fornece um índice compreensivo que relaciona as sequências de aminoácidos das proteínas descobertas com suas espécies, bem como entre os diferentes reinos (SCHULER; SLIGAR, 2007).

A função metabólica do citocromo P450 sobre os compostos xenobióticos presentes no fígado foi inicialmente descoberta em 1963 e, desde então, diversas outras enzimas P450 foram identificadas em tecidos humanos, bem como em outros organismos como fungos, bactérias e plantas, participando das mais diferenciadas reações (OMURA, 2012). As CYP's estão envolvidas em reações enzimáticas que incluem hidroxilação de carbonos, oxidação de heteroátomos, remoção de radicais alquila, epoxidação e migração de grupos. Dentre as reações mais complexas estão incluídas oxigenação de clorina, formação de dímeros e o acoplamento, formação e desalogenação de anéis aromáticos, sendo que todas têm catálise atribuída a participação das P450 (ZHAO et al., 2012). As reações que possuem participação das P450s mostram-se mais diversificadas do que se espera, principalmente em atuações

na catalisação de reações biossintéticas e biodegradativas, como em processos de desintoxicação e algumas vezes na ativação de xenobióticos (ZHAO et al., 2012).

A capacidade em participar das mais diversas transformações químicas demonstra que a proteína possui grande versatilidade ao reconhecer os múltiplos substratos, de todas características e tamanhos. As proteínas P450 combinam uma arquitetura estrutural conservada a uma notável capacidade de adaptação no reconhecimento, na formação e rompimento de ligações e na estereo seletividade dos substratos para as reações das quais participa. Esta habilidade só existe devido à natureza modular das características estruturais secundárias que circundam o sítio ativo das CYP's. A flexibilidade adaptativa das enzimas é característica particular, não somente das P450 em relação a outras enzimas, como também entre os diferentes estados da própria proteína. Desta forma, sua estrutura deve ser considerada como um arranjo flexível e dinâmico que pode mudar dependendo da presença de substratos, cofatores ou até mesmo por seu estado de oxidação (POCHAPSKY; KAZANIS; DANG, 2010).

1.1.1 Características estruturais do citocromo P450

As variadas famílias de P450 dos mais diferentes organismos dividem um alto grau de conservação de suas estruturas secundárias e terciárias. Apenas variações sutis de posicionamento dos elementos estruturais secundários e de comprimento de regiões de volta interconectadas é que contribuem para a diversidade de seus sítios catalíticos, refletindo em sua especificidade (SCHULER; SLIGAR, 2007). As estruturas normalmente consistem de 11 α -hélices, nomeadas de A a K e 5 fitas- β que circundam o sítio ativo hidrofóbico enterrado no interior de cada proteína, formando uma estrutura que se assemelha a um prisma (**Figura 1**). O núcleo conservado da proteína é constituído de um feixe de 4 hélices e um conjunto de duas folhas- β . Estas regiões compreendem o grupamento heme da proteína e a sequência consenso de aminoácidos FxxGx(H/R)xCxG, em que X representa um aminoácido aleatório, característica entre as P450. Esta sequência possui uma cisteína que se mostra

altamente conservada e que atua como ligante do grupamento heme (PYLYPENKO; SCHLICHTING, 2004).

Figura 1: Representação da estrutura de P450. Estrutura de P450 de *Pseudomonas putida* (azul) sobreposta ao modelo por homologia da estrutura da P450 de *Streptomyces clavuligerus* (vermelho), demonstrando a estrutura em formato de prisma e o alto teor de estruturas helicoidais. Em destaque, a hélice I em verde e rosa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com este tipo de estruturação, são poucos os segmentos protéicos que se envolvem no contato direto com o substrato e no ciclo catalítico da proteína. Estas limitadas regiões compreendem duas voltas entre as hélices B e C, que se posicionam acima do heme, a hélice I (**Figura 1**), que se estende sobre o anel pirrólico heme, as folhas- β de 1 a 4 e uma volta β no final da fita 4 (SCHULER; SLIGAR, 2007). Como esperado, esta é a estrutura mais conservada de todas as P450, uma vez que esta rígida arquitetura é necessária para proteger a cisteína responsável pela ativação do oxigênio da ligação heme-tiolato. Esta não é característica exclusiva das CYP's, uma vez que outras proteínas contendo a ligação cisteína-ferro, como a ferredoxina, também apresentam estrutura semelhante (POULOS; JOHNSON, 2005).

Outra região altamente conservada envolvida na ativação da molécula de O_2 é a região da hélice I, localizada acima do grupamento heme. Esta é a mais longa α -

hélice nas estruturas de P450, atravessando a molécula inteira. Diversos resíduos da hélice I parecem possuir importantes papéis na transferência de prótons durante a interação com o substrato. Um deles é uma Treonina conservada que se encontra no centro da hélice I, apontada para o heme. Acredita-se que ela seja responsável pela estabilização da molécula de O_2 e auxilie na transferência eletrônica. Além disso, muitos dos aminoácidos hidrofóbicos posicionados sobre o heme podem auxiliar na ligação do substrato ao núcleo do sítio ativo, uma vez que suas cadeias laterais orientadas em direção ao heme, podem criar ligações de hidrogênio que interagem com o substrato (ZHAO et al., 2012).

Esta arquitetura única, em partes, possibilita o mecanismo de mudança conformacional de abertura e fechamento da proteína, que parece ser necessário para que o substrato acesse o sítio ativo. Alguns destes movimentos parecem também estar envolvidos na transferência de elétrons associada à ativação da molécula de O_2 . A dinâmica associada à ligação do substrato e à liberação do produto surgiu imediatamente após a resolução das primeiras estruturas cristalográficas de P450, em que a molécula ligada aparentava estar enclausurada no interior da proteína, de forma que apenas pequenas mudanças estruturais permitiriam o acesso ao sítio ativo. Desta forma, acredita-se que a flexibilidade das CYP's possibilite à estrutura um mecanismo de abertura e fechamento, para a entrada do substrato, ação enzimática e a posterior saída do produto. Esta capacidade levanta questões de como o sítio ativo se adapta à presença de substratos e como a dinâmica conformacional é importante para a interação com o substrato (POULOS; JOHNSON, 2005).

1.1.2 Atividade enzimática do citocromo P450

1.1.2.1 Propriedades do grupo Heme

O grupamento heme (**Figura 2**) refere-se ao complexo de um íon metálico ligado a um anel porfirínico. A porfirina é um macrociclo formado por 4 anéis pirrólicos interconectados via ligações de metano e sua estrutura possui ainda quatro grupos metil, dois grupos vinil e dois radicais propionato ligados. As porfirinas possuem um

elétron $18-\pi$ deslocalizado que é responsável pela maior absorção e intensas características de emissão na região do visível (JEONG; CHOI, 2016). Os quatro átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos são os responsáveis pela coordenação com o íon de ferro ao heme. O ferro, por sua vez, pode se coordenar com seis ligantes, mas os quatro anéis pirrólicos fornecem apenas quatro ligações, assim, ele ainda possui duas ligações axiais das quais uma pode interagir com uma proteína através dos resíduos de cisteínas, histidina ou metionina e a outra pode coordenar-se com pequenas moléculas, o que inclui oxigênio, óxido nítrico e monóxido de carbono (ZHANG, 2011).

Figura 2: Estrutura do grupo heme. Representação do grupo heme formado de 4 anéis pirrólicos e o íon Fe hexacoordenado.

Fonte: Adaptado de (ZHANG, 2011).

As ligações do heme em proteínas podem ser penta ou hexa coordenadas. Se o ferro do heme em proteínas é penta-coordenado, geralmente liga-se às moléculas pequenas, o que inclui oxigênio e monóxido de carbono. Isto possibilita a enzima ligar, transportar ou mesmo utilizar estas pequenas moléculas através do heme. Entretanto, a principal característica do heme férrico é adotar e oscilar entre os múltiplos estados de oxidação, dos estáveis Fe^{+2} e Fe^{+3} , até o menos estável Fe^{+4} em certos estados catalíticos intermediários. Esta propriedade permite às hemoproteínas realizar transporte de elétrons e reações de oxirredução (ZHANG, 2011).

1.1.2.2 Mecanismo Catalítico

De maneira geral, o mecanismo catalítico do citocromo P450 é baseado na transferência de um átomo de oxigênio advindo da molécula de O₂ para o substrato, como xenobióticos ou substâncias endógenas, a partir da oxidação de uma molécula de NAD(P)H e formação de água, como expresso na reação (1).

O estado fundamental do ferro das P450 é o de baixo spin hexa-coordenado, com os nitrogênios doadores de átomos da porfirina ocupando quatro posições equatoriais, a cisteína e a água em localização proximal e distal, respectivamente, em posições axiais. A catálise inicia-se pela ligação do substrato ao sítio ativo da proteína deslocando a molécula de água axial e assim, convertendo o estado de baixo spin (Fe⁺³) do ferro em um complexo de alto spin penta-coordenado. A redução do Ferro III para Ferro II (Fe⁺²) permite que a molécula de oxigênio possa se ligar ao ferro, formando o complexo Fe⁺²-O₂. O passo crítico do mecanismo é a segunda redução de um elétron seguida pela protonação que gera um complexo peróxido, Fe⁺³-OOH⁻. Esta espécie é protonada para produzir uma molécula de água e um intermediário oxi-férrico altamente reativo, geralmente chamado de composto I. Sua natureza exata ainda não é bem esclarecida, mas nos passos seguintes do ciclo, o composto I é responsável por oxigenar o substrato e regenerar o estado fundamental da P450 (UDIT; CONTAKES; GRAY, 2007).

Portanto, os principais passos do seu mecanismo podem ser sumarizados: (1) ligação do substrato a um complexo P450 Fe⁺³; (2) redução do ferro ao estado Fe⁺²; (3) ligação da molécula de O₂ ao Fe⁺² do grupamento heme; (4) liberação do segundo elétron; (5) clivagem da ligação entre os átomos de oxigênio da molécula de O₂ ligada ao ferro; (6) inserção de um átomo de oxigênio no substrato; (7) liberação do produto hidroxilado.

A redução de um elétron do estado férrico do citocromo P450 para seu estado ferroso (P450-Fe⁺²) torna a proteína extremamente reativa, possibilitando a ligação com diversos ligantes, incluindo o monóxido de carbono (CO). Assim sendo, quando o monóxido de carbono (CO) interage com a P450 ao invés da molécula de O₂, ocorre o deslocamento do pico da banda de Soret para o comprimento de onda 450 nm. Esta é a característica marcante das proteínas desta família e por esta razão foi utilizada para nomeá-las. Contudo, o complexo P450 com monóxido de carbono impede a ligação com o oxigênio, o que inibe sua atividade enzimática (PYLYPENKO; SCHLICHTING, 2004). Além disso, estas interações são o que lhe confere a coloração laranja/amarela, característica desse citocromo (ROBERT et al., 2010).

1.1.2.3 O paradigma da classificação espectroscópica por tipos

O espectro de absorção óptica do heme é sensível ao estado de spin do ferro ligado a ele, refletindo essas características diretamente na posição da banda de Soret em um espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV/vis). Geralmente, o estado fundamental da proteína de baixo spin possui um máximo de 415 a 417 nm enquanto que as P450 em estado de alto spin, possuem máximo entre 390 e 394 nm. Este equilíbrio pode ser alterado pela interação com uma molécula ligante, em que perturbações no espectro de absorção significam algum tipo de interferência no estado fundamental do heme. A interação de um ligante com o sítio ativo da proteína é frequentemente monitorado pela transição do estado de baixo para o de alto spin utilizando o espectro da diferença de absorção UV/vis (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

A diversidade de ligantes existente para as CYPs, em suas variadas características endógenas e xenobióticas, faz a classificação de substratos e inibidores uma tarefa praticamente impossível. Contudo, um simples paradigma de classificação baseado na absorção espectral foi sugerido na década de 80 (SCHENKMAN; SLIGAR; CINTI, 1981), em que os ligantes podem ser agrupados em substratos e inibidores de acordo com as características de absorção espectral.

O espectro chamado Tipo I (**Figura 3**, linha azul) advém da diferença espectral correspondente ao deslocamento da molécula de água do sítio ativo pelo substrato que interage juntamente ao heme, gerando um espectro da diferença com mínimo na região de 420 nm e um máximo na região de 390 nm. Estruturalmente isso acontece por uma mudança na coordenação do heme para o estado penta-coordenado, sugerindo que a interação pode provocar perturbação na coordenação da molécula de água axial. O espectro absoluto geralmente é caracterizado por um aparente deslocamento da banda de Soret para o azul, resultante do aumento da fração de alto spin ($S = 5/2$) caracterizada na região entre 380 a 390 nm (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

Figura 3: Esquema do espectro da diferença de absorção UV/vis. O clássico espectro do Tipo I é mostrando em azul e o espectro do Tipo II em vermelho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A quantidade de proteínas convertidas do estado de baixo para alto spin pode ser estimada pela amplitude de absorção do espectro. Como todos os citocromos P450 possuem o mesmo tipo de grupo prostético heme, seus espectros de absorção variam por uma pequena extensão entre as diferentes isoenzimas, de forma que a diferença de espectro de um estado de baixo spin puro para um de alto spin é praticamente o mesmo para todos os citocromos. No geral, os ligantes que são

classificados como do Tipo I são esperados para atuarem como bons substratos da proteína (CONNER, 2013).

Por outro lado, o chamado espectro do Tipo II (**Figura 3**, linha vermelha) possui um máximo positivo na região entre 425 e 440 nm e um mínimo negativo na região de comprimento de onda de 415 nm ou mais baixo, resultante da formação de um complexo hexa-coordenado ligado fortemente à molécula, que pode incluir fármacos ou inibidores. Em seu espectro absoluto, este tipo de interação responde com deslocamento da banda de Soret para o vermelho, juntamente a uma diminuição da fração em estado de alto spin da enzima. A geometria hexa-coordenada do heme consiste na substituição da molécula de água axial pelo ligante doador. A forte coordenação entre o heme e o ligante geralmente desloca a banda de Soret para comprimentos de onda distantes, de 422 a 435 nm para ligantes contendo átomos de nitrogênio como o imidazol, de 440 a 450 nm para cianidas e de 450 a 460 nm para tiolatos (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

A posição da banda de Soret e a presença dos complexos hexa-coordenados dependem da habilidade dos ligantes axiais funcionarem como aceptores π ou como doadores σ , em que os complexos formados causam um deslocamento para o vermelho da transição eletrônica $\pi - \pi^*$ da porfirina, resultando na divisão da banda de Soret. Do ponto de vista catalítico, esta situação torna o citocromo P450 inativo, uma vez que o estado de baixo spin hexacoordenado do heme é difícil de reduzir. Desta forma, aqueles ligantes que exibem as características espectroscópicas do Tipo II são classificados como inibidores para a proteína (CONNER, 2013).

Por fim, o reverso Tipo I ou o Tipo II modificado é um tipo de classificação que induz aumento da porção de enzima em estado de baixo spin em seu estado fundamental, sendo este fenômeno observado pelo aumento da intensidade da banda de Soret com um mínimo ou nenhum tipo de deslocamento. Este fato advém da ideia de que uma significativa porção de proteínas em estado de alto spin já estavam presentes na preparação inicial da enzima e a titulação do ligante resultou na

diminuição ou na eliminação desta população na amostra (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

1.1.3 CYP105M1 - O citocromo de *Streptomyces clavuligerus*

A maioria das proteínas P450 com estruturas resolvidas é de origem procariótica, principalmente porque estas formas são mais solúveis. Estes organismos estão envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, na biossíntese de antibióticos e na desintoxicação de xenobióticos. Em eucariotos, as P450 normalmente estão ancoradas às membranas de mitocôndrias ou microsossomos por uma porção transmembrânica na região N-terminal. As suas diversas funções dependem diretamente do organismo no qual estão inseridas, como por exemplo: a biossíntese de esteróides e vitamina D3 em mamíferos, a síntese de hormônios em plantas e metabolismo de lipídios em fungos. As proteínas P450 de bactérias são similares às de eucariotos, correspondendo à forma truncada na região de ancoragem destas proteínas (LEWIS; WISEMAN, 2005).

Em bactérias, a ocorrência de P450s é altamente variável. As CYP105 são predominantemente encontradas em bactérias que pertencem ao filo Actinobacteria, da ordem Actinomycetales. Esta família de P450 deve ser a única com representantes em todas as espécies de *streptomicetos*, sendo distribuída em no mínimo 17 subfamílias, abrangendo duas categorias de funções: biotransformação ou degradação de xenobióticos e biossíntese de moléculas bioativas especializadas. Esta diversidade funcional sugere que há uma considerável variação estrutural dos membros desta família. O baixo nível de restrição relacionado à escolha de substratos, torna as proteínas interessantes para o estudo de novos compostos a partir de substratos relacionados (MOODY; LOVERIDGE, 2014).

Do amplo número de P450 procariotas caracterizados, acredita-se que a maioria esteja envolvida na biossíntese de antibióticos e auxiliares. De forma particular, alguns trabalhos já demonstraram que a CYP105M1 de *Streptomyces*

clavuligerus, também chamada de P450CLA, está envolvida na via de síntese do ácido clavulânico. Li e colaboradores (LI et al., 2000) notaram que a P450CLA possui uma identidade elevada com P450 de outras bactérias que atuam na biossíntese de metabólitos secundários. Os estudos realizados os levaram à conclusão de que a P450CLA possivelmente envolve-se em um passo oxidativo do clavaminato, ainda sem explicação, na rota de biossíntese do ácido clavulânico. A participação da enzima nesta via ficou ainda mais evidente após o silenciamento do gene que o codifica, já que houve perda total da produção do ácido clavulânico (LI et al., 2000).

A propriedade mais importante das bactérias *Streptomyces* é a habilidade de produzir vários antibióticos e compostos bioativos com enorme valor medicinal, veterinário e para uso na agricultura. O microrganismo *Streptomyces clavuligerus* é uma bactéria gram-positiva utilizada em escala industrial para a produção de ácido clavulânico, um potente inibidor de serinas β -lactamases. O uso combinado do ácido clavulânico com antibióticos β -lactâmicos (como a penicilina) é uma importante estratégia terapêutica contra microrganismos produtores de enzimas β -lactamases, que conferem aumento da resistência de bactérias frente a ação desses antibióticos (LI et al., 2000).

A biossíntese do ácido clavulânico em *S. clavuligerus* possui passos bem caracterizados ao longo dos anos, no entanto, muitas rotas ainda permanecem parcialmente entendidas, como por exemplo aquela com participação da enzima P450CLA. Neste sentido, faz-se necessário estudos que apresentem resultados esclarecendo a respeito do mecanismo de ação do citocromo P450 de *Streptomyces clavuligerus* e como esta pode atuar na biossíntese do ácido clavulânico.

1.2 OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVAS

Devido à importância do entendimento da rota de biossíntese do ácido clavulânico e a falta de informações na literatura a respeito do real papel da CYP105M1 nesta via, o objetivo deste trabalho é caracterizar os tipos de interações que a CYP105M1 pode estabelecer com moléculas similares ao seu substrato natural, de forma a compreender a relação proteína-substrato e proteína-inibidor e como estas interações podem contribuir com informações a respeito das mudanças estruturais, para o equilíbrio do estado de spin do heme e na atividade enzimática oxidativa da enzima sobre seus ligantes.

Por consequência, para um melhor entendimento dos objetivos mencionados, realizamos:

- Estudo estrutural e caracterização da identidade da proteína;
- Análises de estabilidade devido à presença ou ausência dos ligantes;
- Verificação do ponto de vista eletrônico das interações e concordância com o paradigma de classificação por tipos de ligantes;
- Possível aplicação biotecnológica para diferentes uso da proteína;

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Propagação do plasmídeo, expressão e purificação da P450CLA

O plasmídeo recombinante contendo o gene da CYP105M1 em pET28a(+) foi gentilmente concedido pela Prof(a). Dr(a). Ana Paula Ulian de Araújo, do Instituto de Física de São Carlos, USP. Para manutenção e propagação, o plasmídeo foi transformado em linhagens de *E. coli* DH5- α (Invitrogen) e para expressão, transformou-se linhagens de *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen). As células transformadas foram cultivadas em meio LB-ágar (Lúria-Bertani) em concentração de 50 μ g/ml de Canamicina e 34 μ g/ml de Cloranfenicol

Utilizamos o protocolo de expressão e purificação para a P450CLA determinado no trabalho de Goto e colaboradores (2012), contudo, com algumas adaptações. Colônias transformantes isoladas da linhagem de expressão foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido e autoclavado, na presença de antibióticos canamicina (50 μ g/ml) e cloranfenicol (34 μ g/ml) e deixadas por 16 h, sob agitação de 220 rpm a uma temperatura de 37° C. O pré-inóculo foi transferido para 1000 ml de meio LB, líquido e autoclavado, contendo os mesmos antibióticos e suas respectivas concentrações citadas anteriormente e 0,2 g/L de Cloreto de Ferro (III), e deixados para crescimento celular a 37° C, a uma agitação de 220 rpm, monitorando-se a densidade óptica (D.O.) em 600 nm até 0,8. Em seguida, a expressão foi induzida pela adição de 0,2 mM de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo). A cultura ficou sob agitação de 220 rpm a temperatura de 18° C, 18 h, *overnight*. As células foram centrifugadas a 6000 rpm em centrífuga *SorvallLegendXT* da *ThermoScientific* Rotor *Fiber Lite* F14-6x 250 LE por 20 minutos, a 8° C, descartando-se o sobrenadante. As células centrifugadas foram ressuspensas em tampão de lise Tris 50 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e pH 8,0, a uma proporção de 10 mL a cada 500 mL de células de cultura, estocadas a -20° C ou utilizadas logo em seguida.

As células em alíquotas de 10 mL foram repousadas em gelo e submetidas à lise por ultrassom em sonicador *SonicDismembrator* modelo 500 (Fisher *Scientific*), a

potência de 50% em 10 ciclos de 30 s, em intervalos de 45 s de descanso entre cada pulso. Em seguida, fez-se a centrifugação do extrato resultante em centrífuga refrigerada a 8° C, por 20 min a uma velocidade de 12.000 g. A fração solúvel foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade, em uma coluna de fase estacionária de resina de níquel Ni-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com o mesmo tampão de lise. A coluna foi deixada sob agitação branda em mesa agitadora por 20 minutos para aumento da interação proteína-resina.

Eluímos a porção não ligada e logo após foi feita uma lavagem de 20 volumes de coluna de tampão de lise, a uma concentração de 20 mM de Imidazol, a fim de retirar possíveis impurezas ligadas ao níquel. Posteriormente, lavou-se com 5 volumes de coluna de tampão de lise a uma concentração de 500 mM de Imidazol para eluição da proteína. Para eliminar eventuais resíduos contaminantes, o volume eluído foi concentrado para 1 mL utilizando-se concentrador Amicon Ultra-15 (Milipore) e submetendo a amostra a cromatografia de exclusão molecular. Utilizou-se como método o sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare, EUA) juntamente a coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare, EUA) como fase estacionária, equilibrada previamente com tampão de lise. A purificação da proteína foi monitorada por absorbância UV/vis em 280 nm, 417 nm e 220 nm, pelo método de eluição isocrática sob um fluxo de 0,5 mL/min. Após a purificação, caso houvesse necessidade, a proteína poderia ser armazenada a -20° C em Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0 e glicerol 10% v/v. Foram retiradas alíquotas de todos os passos de purificação para posterior análise por eletroforese em gel SDS-PAGE.

A quantificação da concentração da proteína obtida foi realizada por absorção em 280 nm em espectrofotômetro *Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific Inc., EUA). O coeficiente de extinção molar teórico (ϵ) foi determinado pelo programa de bioinformática *ProtParam Tool*, do servidor *ExPASy* (**Expert Protein Analysis System**, <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>). O valor encontrado foi de $\epsilon_{280} = 33585 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Pela lei de Beer-Lambert dada pela equação (2), temos que:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Em que I_0 corresponde a luz que atinge a amostra, I a intensidade da luz após passar pela amostra, A a absorbância em 280 nm, ε o coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), c a concentração em (M) e L o caminho ótico (cm).

1.3.2 Estudos de Oligomerização do Citocromo P450CLA

Para uma análise do estado oligomérico da enzima, utilizamos a eletroforese em condições nativas para verificar previamente os monômeros ou possíveis formas oligoméricas presentes pós-purificação. A concentração de 0,5 mg/mL de proteína e alíquotas coletadas durante a purificação foram aplicadas em um gel nativo com concentração de 15% de poliacrilamida. Posteriormente, as bandas do gel foram coradas com *Coomassie Blue* 0,2% (m/v) preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Utilizamos um marcador de massa molecular comercial *Broad Range Protein Molecular WeightMarkers* (Promega).

A análise do estado oligomérico da proteína foi complementada por um ensaio de cromatografia por exclusão molecular. Este método de cromatografia se utiliza da separação das várias porções devido às diferentes massas da população oligomérica ou mesmo do agregado protéico. Essa é uma propriedade da matriz da fase estacionária que compõe a coluna, que pode ser de poliacrilamida, dextrana ou agarose. A coluna de gel filtração Superdex 200 (HR 10/30, GE *Healthcare*) foi equilibrada com o tampão fosfato de sódio 10 mM e injetou-se 1 mL de amostra a concentração de 2,5 mg/mL. A gel filtração foi realizada à temperatura ambiente e sob o fluxo de 0,5 mL/min, monitorando-se o eluato em 280 nm e 417 nm. A coluna foi ajustada com o *kit* de calibração de coluna gel filtração para baixo e alto pesos moleculares (*Gel Filtration Calibration Kits*, GE *Healthcare*). Seguindo as instruções do fabricante, foram preparadas soluções das seguintes proteínas: Conalbumina (75 kDa), Anidrase Carbonica (29 kDa), Ribonuclease A (13 kDa), Aldolase (158 kDa),

Ovalbulmina (44 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa). Utilizamos *Blue Dextran* para determinação do volume morto da coluna.

1.3.3 Dicroísmo Circular

Medidas de Dicroísmo Circular (CD) foram feitas para verificação das estruturas secundárias da amostra. Utilizamos um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Jasco Corporation, Japão) equipado com controlador de temperatura do tipo *Peltier*. Um volume de amostra pertinente foi adicionado a uma cubeta retangular de quartzo de caminho óptico de 1 mm. A amostra estava a uma concentração de 0,015 mg/mL em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0. A estabilidade térmica da proteína foi testada verificando-se as alterações do espectro de CD com a elevação gradativa da temperatura. Medidas de desnaturação térmica foram realizadas a uma concentração protéica de 0,15 mg/mL em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0. A rampa de aquecimento foi da faixa de 20° C a 100° C com variações de 2° C a cada medida. O experimento foi realizado em comprimento de onda UV distante, de 195 a 280 nm, com acumulação média de 6 varreduras para melhora da relação sinal/ruído, a 100 nm/min.

Todos os espectros obtidos foram submetidos ao *software* de tratamento de dados do fabricante, *Spectra Analysis*, para subtração de possíveis interferências do tampão da amostra. Os valores espectrais foram coletados em unidades de elipticidade (θ) e convertidos em elipticidade molar residual $[\theta]$ para normalização dos espectros em relação a concentração e número de resíduos, de acordo com a equação (3):

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 0,1 \cdot MM}{n-1} \cdot c \cdot l \quad (3)$$

em que θ é a elipticidade coletada, MM é a massa molecular da proteína em daltons, n o número de resíduos, c a concentração utilizada na medida e l é o caminho óptico em cm da cubeta.

A curva de fração desnaturada é calculada a partir da relação (4):

$$[f_D] = \frac{x_n - x_{obs}}{x_n - x_D} \quad (4)$$

Em que X corresponde a valores mínimos característicos do espectro de CD, n e D são designações de X correspondentes aos valores do espectro da proteína nativa e desnaturada e obs é o valor espectral observado a uma dada temperatura (GARCIA, 2011).

1.3.4 Dicroísmo Circular Magnético

Os experimentos de Dicroísmo Circular Magnético (MCD) foram feitos em um espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Corporation, Japão) com um imã acoplado de 860 mT. Os espectros foram medidos na faixa de 700 a 380 nm em uma cubeta de quartzo, retangular, de caminho óptico de 1 mm em que um volume de proteína foi adicionado a concentração de 40 µM. A velocidade de varredura foi de 100 nm/min com média de oito acumulações, largura de banda de 1 nm e a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionamos o volume adequado de ligantes a partir de uma solução estoque concentrada, de forma que o volume final na cubeta não excedeu 2% do volume total inicial.

1.3.5 Caracterização por Espectrometria Ultravioleta visível (UV/vis)

Os espectros de absorção UV/vis foram registrados em espectrofotômetro modelo UV-2550 Shimadzu de feixe duplo. Um volume apropriado da proteína à concentração de 2 µM foi adicionado a uma cubeta de quartzo, retangular, de caminho óptico de 1 cm em tampão de lise.

O espectro de absorção absoluto foi registrado entre os comprimentos de onda de 700 nm a 250 nm, para a proteína livre e na presença de ligantes. Um volume adequado da solução estoque dos ligantes foi adicionado a cubeta contendo a

proteína de modo que a proporção Proteína:Ligante (P:L) fosse suficiente para saturação da presença das moléculas em solução e que o volume total não excedesse um valor 2% acima da quantidade inicial.

O espectro da diferença foi tomado entre a região de 600 a 300 nm em que uma concentração de 2 μ M de proteína foi utilizada em tampão de lise em uma cubeta de quartzo retangular, de caminho óptico 1 cm. O mesmo volume e concentração de proteína foi adicionado em outra cubeta de características similares a primeira, e posta na direção do segundo feixe do espectrofotômetro. Uma linha de base é medida sem a presença dos ligantes. Em seguida, iniciamos a titulação de volumes apropriados dos ligantes em uma das cubetas de modo que o volume total adicionado não exceda 2% do volume na cubeta. Após titulação e homogeneização da amostra, medimos o espectro da diferença.

1.3.6 Thermofluor

Uma varredura diferencial por fluorescência (*Differential Scanning Fluorimetry*) ou Thermofluor foi realizada com o intuito de monitorar o desenovelamento da proteína P450CLA e em busca de possíveis ligantes para estabilização protéica. A técnica acompanha o desenovelamento térmico da proteína na presença de uma sonda que tem característica fluorescente amplificada com o aumento da hidrofobicidade do meio. Desta forma, a sonda tem sua fluorescência suprimida quando em ambiente aquoso, contudo, ao interagir com regiões hidrofóbicas parcialmente ou totalmente expostas pelo desenovelamento da proteína, sua fluorescência é recuperada.

O equipamento utilizado foi um termociclador em tempo real - Mx3005p (*Agilent Technologies*) provido de filtro específico de detecção de sinais fluorescentes do corante SYPRO *orange* (492/610 nm) (Invitrogen). Um volume apropriado de proteína em tampão de lise foi adicionado em uma placa de PCR contendo 96 poços, juntamente com 10 μ L de solução do Kit de estabilidade *Solubility and stability screen*

(Hampton Research) e 1 μL de sonda SYPRO orange. Os resultados foram processados de acordo com Niesen e colaboradores (2007).

1.3.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O ensaio de estabilidade térmica da proteína e seus ligantes foram realizados em equipamento Nano-Differential Scanning Calorimeter II modelo 6100 (CSC, Lindon, Utah, EUA). As varreduras foram feitas para o aquecimento em intervalo de 10° a 100° C, com taxa de aquecimento de 0,5 °C/min, com pressão aplicada em ambas as celas de 3,00 ATM conforme instruções do fabricante. A fim de evitar que bolhas atrapalhassem as medidas, as amostras foram previamente desgaseificadas em vácuo por 5 minutos. Um volume apropriado de proteína a 50 μM em tampão de lise foi aplicado no equipamento. As medidas de interação com ligante seguiu padrão de proporção Proteína:Ligante (P:L) de acordo com concentração conveniente ao estado de saturação de ligante na solução.

As análises dos dados foram feitas por *software* fornecido pela fabricante do equipamento, CpCalc. Os termogramas das amostras foram manipulados com subtração de possíveis contribuições do tampão, correção da linha de base e a integração dos picos calorimétricos para obtenção de parâmetros termodinâmicos.

1.3.8 Ressonância Paramagnética Eletrônica de onda contínua e de onda pulsada (EPR-CW e EPR-Pulsado)

As medidas de ressonância paramagnética eletrônica de onda contínua (EPR-CW) e pulsada (EPR-pulsado) foram feitas a partir de um espectrômetro Bruker Elexsys E-580 (modelo ER 4118X-MS3, Bruker Biospin) em banda X (9,5 GHz) que trabalha em ambos os modos. A temperatura ótima para tomada das medidas para a P450CLA foi de 20 K. A regulação da temperatura foi feita por sistema criogênico Oxford, modelo ITC503 que permite atingir baixas temperaturas.

Um volume de 40 μL de P450CLA à concentração de 150 μM foi adicionado em tubo de quartzo para ser congelado inicialmente em nitrogênio líquido e imediatamente, colocada na cavidade retangular do equipamento para realização do experimento. Volumes pertinentes da solução estoque dos ligantes foram adicionados a proteína antes do resfriamento em nitrogênio líquido, em proporção Proteína:Ligante (P:L, mol/mol) de tal forma que a concentração do ligante estivesse saturada. Os mesmos procedimentos foram usados para as medidas de EPR-pulsado, no entanto, a proteína foi utilizada a uma concentração de 400 μM para uma melhor resolução dos resultados.

1.3.9 Voltametria Cíclica

A eletroquímica da proteína P450CLA foi testada por Voltametria Cíclica em colaboração com o aluno de doutorado David Tatsuo Atique Sawazaki e do Prof. Dr. Zeki Naal do Laboratório de (Bio)sensores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Utilizou-se um potenciostato modelo C-27 da *Bionalytical System* e um registrador X - Y.

A imobilização da proteína foi feita em um filme de polímero depositando-se 10 μL de Polianilina no eletrodo de trabalho de carbono vítreo em posição vertical e face voltada para cima. Espera-se a evaporação total dos solventes em temperatura ambiente e a secagem por completo do filme. Em seguida, deposita-se 3 μL de P450CLA a concentração de 1,5 mg/mL e espera-se novamente o filme secar a temperatura ambiente. Para a realização das medidas, o eletrodo de trabalho contendo a proteína P450, um eletrodo de referência contendo fio de prata (Ag^0) com AgCl depositado em solução de KCl 3 M e um eletrodo auxiliar de fio de platina em espiral são inseridos em solução tampão de lise contida em uma célula em um suporte de teflon. Volumes apropriados de Diclofenaco de Sódio seguindo a proporção Proteína:Ligante (P:L, mol/mol) foram adicionados de forma gradativa ao tampão de lise à medida que os experimentos foram realizados.

1.3.10 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados em colaboração com a Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Nonato e a Pós-Doutoranda Dr(a). Joane Kathelen Rustigel Bonalumi, do Laboratório de Cristalografia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

Os ensaios por cristalização foram realizados a fim de se obter informações estruturais de alta resolução da P450CLA para posterior análise de mutantes e seus ligantes. Utilizamos para os testes iniciais o método de difusão por vapor que tem por preceito elevar a concentração da solução protéica a um estado de supersaturação através da evaporação dos componentes voláteis da solução em um ambiente hermeticamente fechado. Para isso, placas *Cryscem* (Hamptom Research) de 24 poços foram usadas juntamente a kits comerciais de condições favoráveis a cristalização. A varredura inicial partiu dos kits: *Crystal Screen*, *Crystal Screen 2*, PEG/ION, PEG/ION 2, PEGRx 1, PEGRx 2, *Index 1 e 2*, todos providos pela Hampton Research. Todos os testes foram realizados a partir de estoque da proteína purificada pelo método descrito neste trabalho e em tampão de lise.

Inicialmente fizemos a deposição de uma gota de 2 μ L de proteína a concentração de 10 mg/mL no cilindro do centro de um dos poços das placas. A concentração protéica foi testada até o estabelecimento de uma concentração ótima entre 17 e 20 mg/mL. Os poços foram preenchidos com 500 μ L de solução cristalizante, providenciados pelos kits comerciais citados, e uma gota de 2 μ L foi misturada a gota com solução protéica para equilíbrio e instigar a difusão por vapor. Todos os poços da placa são fechados com fita adesiva *Crystal Clear* (Henkel Consumer Adhesives) e armazenados em sala com temperatura controlada a 21° C.

Os testes seguiram-se com estratégias padrões após escolha de condição mais favorável a cristalização, com modificações de parâmetros físicos e químicos a fim de otimizar os primeiros resultados obtidos. Para isso, condições de pH, temperatura,

volume da gota e do poço, além de alterações genéticas na proteína foram realizados. Mudanças na técnica de cristalização também foram adotadas, como experimentos de semeaduras, adição de óleo no poço para controle da velocidade de difusão e adição de aditivos à solução.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A diversidade estrutural das proteínas da superfamília P450 e o seu importante papel em reações metabólicas fazem dessa enzima um interessante objeto de estudo. Visto que a relação estrutura/função é estreita quando consideramos o papel de uma enzima em uma via catalítica, compreender as interações que são realizadas pelo citocromo P450CLA e os mecanismos envolvidos podem contribuir para a solução de diversos problemas nos quais ela participa (OMURA, 2010). A partir destes preceitos, conduzimos nossos primeiros ensaios experimentais a fim de caracterizar a proteína e fazer uma varredura das possíveis interações que podem afetar sua estrutura.

1.4.1 Expressão e Purificação do Citocromo P450CLA

A expressão do citocromo P450CLA seguiu inicialmente o protocolo descrito por Goto e colaboradores (2012), contudo, para adaptar-se às circunstâncias do projeto, melhorias no método foram aplicadas sem alteração da proteína obtida e com significativo aumento do rendimento. Sistemas bacterianos de expressão são comumente utilizados por serem de fácil manipulação, fácil crescimento e baixo custo (GARCIA, 2012). A partir de testes de expressão, a condição com melhor resultado adveio da cultura com densidade óptica de 0,8 em 600 nm, com consequente adição de 0,2 mM de IPTG e expressão protéica por 18 h a 18° C.

Após o tempo de expressão, as células foram submetidas à lise celular e o extrato protéico purificado por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA. No entanto, após análise por eletroforese (**Figura 4**), optamos por adicionar um passo cromatográfico diferente do descrito anteriormente por Goto (2012), com a utilização da coluna de exclusão molecular Superdex 200 no lugar da coluna de troca iônica Mono-Q. O uso deste método resultou em maior grau de pureza, maior eficiência, rapidez para obtenção da amostra e possibilitando a realização dos estudos subsequentes.

Figura 4: Resultados da expressão e purificação da P450CLA visualizados por eletroforese em gel SDS-Page. Em (1) marcador de peso molecular; (2) pellet; (3) sobrenadante; (4) eluição da coluna de Ni-NTA; (5) eluição da Superdex 200.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.2 Caracterização Biofísica da P450CLA

1.4.2.1 Estudo de Oligomerização da Proteína P450CLA

Os citocromos P450 aparentemente possuem a mesma estrutura de enovelamento, no entanto, com baixa porcentagem de identidade sequencial e alta afinidade a uma enorme variedade de substratos (LEWIS; WISEMAN, 2005). Por este motivo, espera-se que suas características estruturais sejam similares entre os diversos organismos. Geralmente estas proteínas são constituídas apenas de uma unidade, ou seja, monoméricas, com massa molecular em torno de 45 kDa. O estudo de oligomerização por cromatografia de exclusão molecular permitiu determinarmos algumas destas propriedades para confirmar a identidade da amostra obtida.

O perfil de eluição da proteína foi analisado pelo cromatograma obtido por purificação em coluna Superdex 200 (**Figura 5**). O perfil do pico inicialmente apresentou a presença de duas porções moleculares, uma correspondente à proteína monomérica e outra a um provável agregado dimérico. Em trabalho de Lipscomb e colaboradores (1978), a proteína P450CAM de *Pseudomonas putida*, muito utilizada como modelo para todas as P450, apresentou propensão de formar dímeros

intermoleculares por pontes dissulfeto. O estudo sugere a adição de β -mercaptoetanol durante a purificação para solucionar a dimerização.

Figura 5: Perfil de eluição da proteína P450CLA. Eluição da proteína P450CLA da coluna Superdex 200 após equilibração com tampão da proteína: Tris 50mM, NaCl 100 mM, 1 mM de β -mercaptoetanol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após adotar esse procedimento, adicionando cerca de 1 mM de β -mercaptoetanol, o pico de purificação tornou-se único e simétrico. A massa molecular foi obtida através do coeficiente de partição (K_{av}) da curva de calibração construída a partir dos perfis de eluição de proteínas padrões de massas moleculares conhecidas (**Figura 6**).

Figura 6: Curva de calibração de massa molecular obtida a partir dos resultados de gel filtração. O gráfico foi construído a partir dos perfis de eluição de proteínas de diversos tamanhos, encontrando o valor do coeficiente de partição K_{av} e graficando-o contra o log da massa molecular de cada proteína. A regressão linear do gráfico fornece os parâmetros necessários para estimarmos a massa da proteína de interesse.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A massa molecular aparente calculada para a P450CLA foi de aproximadamente 45 kDa, valor experimental próximo ao encontrado na literatura para outras P450 e com diferença de 10% em relação ao valor teórico. O erro encontra-se dentro dos padrões da técnica, uma vez que a cromatografia de exclusão molecular é um método de baixa resolução e pode apresentar diferenças de 10 a 20% do valor teórico (GOETZ et al., 2004). O cromatograma da purificação da P450CLA pode ser sobreposto ao perfil de eluição da Ovalbumina, que possui massa molecular determinada de 44 kDa. Como visto na **(Figura 7)**, nota-se que os perfis são bem similares, sugerindo que a P450CLA possui massa molecular aparente próxima ao valor da massa de Ovalbumina.

Figura 7: Perfil de eluição da proteína P450CLA e Ovoalbumina. Nota-se a similaridade entre os perfis de eluição da Ovoalbumina e da P450CLA, indicando que as duas proteínas possuem massas moleculares similares. O volume de eluição foi monitorado em 280 nm e indica uma massa de aproximadamente 45KDa para a P450CLA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.2.2 Análise Estrutural por Dicroísmo Circular (CD)

Macromoléculas opticamente ativas, tais como proteínas e peptídeos, apresentam absorção diferencial da luz polarizada circularmente (KELLY; JESS; PRICE, 2000). O dicroísmo circular utilizando radiação eletromagnética com comprimentos de onda na região do UV distante (180 - 250 nm) é utilizado predominantemente nessas moléculas e baseia-se na excitação eletrônica dos grupos amidas de suas ligações. Para o espectro de CD contribuem majoritariamente estruturas em hélices, folhas- β , desordenadas ou voltas formadas pelo esqueleto peptídico, podendo ser explorado para fornecer informações de sua estabilidade, interações intermoleculares e com ligantes (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Desta forma, para garantirmos a fidedignidade da amostra purificada, ela foi submetida a medidas de CD na região do UV distante. As transições eletrônicas fracas, do tipo $n \rightarrow \pi^*$, que estão centradas no comprimento de onda de 220 nm e as transições do tipo forte $\pi \rightarrow \pi^*$, que são próximas ao comprimento de onda 190 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2000), fornecem um perfil espectral de CD característico para as diferentes estruturas secundárias em proteínas e peptídeos, oferecendo assim um resultado aproximado a respeito de sua constituição tridimensional.

Os espectros de CD na região do UV distante para estruturas em α -hélice apresentam banda negativa na região de 222 nm, advinda da transição $n \rightarrow \pi^*$ e mais duas bandas devido à transição $\pi \rightarrow \pi^*$: uma negativa na região de 208 nm e outra intensa e positiva na região de 192 nm. Os espectros que indicam estruturas do tipo β , possuem elipticidade negativa na região próxima a 218 nm e intensa banda positiva na região de 200 nm (KELLY; JESS; PRICE, 2000).

Figura 8: Espectro de CD da proteína P450CLA. O perfil obtido pelo espectro corresponde a uma estrutura com prevalência de α -hélice. Este resultado é condizente com o esperado para proteínas da Superfamília P450 (PYLYPENKO; SCHLICHTING, 2004), uma vez que estruturas cristalizadas da proteína de outros organismos mostram uma prevalência de α -hélice.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro de CD da proteína P450CLA está mostrado na **(Figura 8)** e apresenta elipticidade negativa em 222 nm e uma outra na região entre 204 nm. O espectro ganha uma banda positiva intensa abaixo dos 200 nm. Este resultado indica que a proteína é constituída majoritariamente por α -hélices, o que concorda com as estruturas de outras P450 (GRAHAM; PETERSON, 1999). Geralmente, estruturas resolvidas de P450 sobrepostas apresentam desvio médio padrão de 2 Å, uma vez que possuem um núcleo formado por um feixe de hélices bem conservado. Ainda existe uma porção formada por 4 folhas- β , contudo, uma quantidade bem inferior frente ao número de aproximadamente 13 α -hélices (GRAHAM; PETERSON, 1999).

1.4.2.3 Estudos de estabilidade térmica

A estabilidade estrutural de uma proteína é um fator crítico para estudos bioquímicos e biotecnológicos. Uma proteína exibe admiráveis propriedades biológicas, no entanto, é necessário manter sua estrutura tridimensional através da participação de fracas interações internas, em que se incluem ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas e interações iônicas (PATEL; KUMARI; KHAN, 2014). Uma mudança no microambiente no qual as proteínas estão inseridas, pode romper todas essas interações, levando à desnaturação e inativação dessa proteína. Embora diversos fatores causam a desestruturação de uma proteína, a desnaturação térmica é o maior problema quando se trata de armazenamento e análises necessárias na realização de um estudo. Apesar das diversas estratégias químicas que evitem a desestabilização de proteínas em solução, nenhuma delas é capaz de prevenir a desnaturação térmica irreversível de proteínas (PATEL; KUMARI; KHAN, 2014). Sabe-se que incubar soluções proteicas a altas temperaturas, geralmente, resultam na degradação física das mesmas. Embora a desnaturação térmica induzida resulte em um processo reversível para algumas proteínas, altas temperaturas usualmente levam a processos irreversíveis devido à agregação. É válido ressaltar também que o aquecimento inicia o processo de agregação em valores abaixo da temperatura estipulada como de desnaturação (CHI et al., 2003).

Além disso, a estabilidade molecular também é um aspecto de intersecção na relação entre a função enzimática e a temperatura. Enzimas mantêm um certo nível de flexibilidade dependente da temperatura e esta, por sua vez, dita o nível de estabilidade da proteína em seu ambiente (BISCHOF; HE, 2005). Sendo assim, existe um delicado balanço entre temperatura, estabilidade proteica e função ótima da proteína, que advém dos parâmetros cinéticos entre mudanças térmicas e flexibilidade ou rigidez enzimática (FIELDS, 2001). Assim, ao considerar os objetivos deste estudo, a análise minuciosa do comportamento da proteína P450CLA em diferentes situações de mudança de temperatura mostrou-se necessária.

Testamos a estabilidade térmica da proteína P450CLA com medidas de variação do espectro de CD a partir do aumento da temperatura (**Figura 9 (A)**), em uma faixa de 10° a 100° C, medindo o espectro de CD a cada 10° C. Construímos também uma curva de desnaturação (**Figura 9 (B)**) em que a fração de proteína desnaturada em função da diminuição da elipticidade, determinada a partir do comprimento de onda em 222 nm, é monitorada em função da temperatura. Notamos que, como usual, o aumento da temperatura inicia o processo de desnaturação da P450CLA, progredindo até o estado de desenovelamento da proteína na temperatura mais alta. A determinação da temperatura de transição ou temperatura de *melting* (T_m) através do ponto médio da curva da fração desenovelada, resultou em um T_m de 45 °C. Apesar das P450 serem proteínas altamente solúveis, também são conhecidas por serem flexíveis e alguns estudos demonstraram que citocromos P450 de outros organismos possuem um processo de desnaturação complexo, podendo ocorrer em mais de um passo (ANZENBACHER & HUDECEK & STRUNZINSKY, 1982). Contudo, a curva de fração desnaturada demonstra apenas que a estabilidade da proteína monitorada por CD é afetada entre 40° e 50° C e a presença de intermediários não pode ser detectada.

Figura 9: Espectros de Dicroísmo Circular com variação de temperatura. Notamos que com o aquecimento da amostra, **(A)** a elipticidade molar também vai diminuindo e o espectro perde seu formato característico, o que sugere que a proteína desnaturou com o aumento da temperatura. Apenas destacamos os espectros com uma variação de 10 em 10° C para facilitar a visualização. **(B)** O comprimento de onda de 220 nm foi monitorado e a partir dele construímos a curva de fração desnaturada.

Fonte: Elaborada pelo autor

Ainda com o intuito de investigarmos a estabilidade térmica da P450CLA, outros dois métodos foram utilizados: calorimetria diferencial de varredura (DSC) e

Thermofluor. A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica poderosa para se investigar o enovelamento e a estabilidade de proteínas, uma vez que seu processo experimental reflete o ponto de vista energético de todas as conformações que a proteína pode ter durante o processo de desenovelamento induzido pela temperatura (IBARRA-MOLERO et al., 2016). O Thermofluor é uma técnica prática, que requer pouca quantidade de amostra, pouco tempo e fornece informações a respeito da termoestabilidade de forma sistemática. É muito utilizada no controle de qualidade e otimização de condições da amostra (BOIVIN; KOZAK; MEIJERS, 2013).

Figura 10: Termograma de DSC obtido da proteína P450CLA. Um típico perfil de desnaturação por DSC foi obtido para a P450CLA em que o ponto máximo corresponde à temperatura de transição, sendo identificado como 43,2° C.

Fonte: Elaborada pelo autor

Uma típica curva calorimétrica obtida para P450CLA por DSC é mostrada na **Figura 10**, enquanto que a curva obtida por Thermofluor é vista na **Figura 11**. Por DSC, o ponto máximo da curva corresponde à temperatura de transição e seu valor é de 43,2° C. Percebemos, ainda, certa assimetria no termograma, o que sugere a presença de mais do que um evento térmico. No caso da curva de Thermofluor, assim

como para curva de fração desnaturada de CD, devemos olhar o ponto médio da transição, o que resulta em uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 43° C. Observamos que os três métodos resultaram em valores similares, enquadrando a temperatura de transição da P450CLA entre 42° e 45° C, sendo uma proteína relativamente estável em temperatura ambiente.

Figura 11: Medida da Temperatura de transição da P450CLA pela técnica de Thermofluor. O ponto de inversão indica a temperatura de desenovelamento da proteína, que no caso da P450CLA foi ~43° C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.2.4 Caracterização do grupo Heme

A presença do grupamento heme na proteína recombinante é uma característica importante a ser verificada. O heme em uma P450 é um grupo prostético formado pelo íon de ferro ligado a um grupo porfirínico, que possui importantes propriedades espectroscópicas (JEONG; CHOI, 2016). As porfirinas são muito importantes em biologia, uma vez que participam de diversas reações essenciais, tais

como fotossíntese, oxidação e redução, transporte de oxigênio, transferência de elétrons, conversão de energia e geralmente, sendo o sítio ativo de muitas proteínas (GOUTERMAN, 1961). Deste grupamento é que depende a avaliação da atividade da enzima e a identificação do Fe^{+3} incorporado na proteína.

O espectro de absorção eletrônica típico de porfirinas consiste em uma forte transição para o segundo estado excitado ($S_0 \rightarrow S_2$), por volta de 400 nm (banda de Soret ou B) e uma fraca transição para o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$), por volta dos 550 nm (bandas Q) (PRUSHAN, 2005). Por ambas se tratarem de uma transição do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ foram explicadas considerando o modelo de quatro orbitais de Goutermann (1961). De acordo com este modelo, a absorção das porfirinas advém da transição de dois orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) para dois orbitais LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e são os tipos de metais ligados e os substituintes no anel que afetam as energias relacionadas a estas transições (PRUSHAN, 2005).

As transições fracas relacionadas às bandas Q são afetadas pela presença de íons metálicos. Neste caso, a formação da metaloporfirina bloqueia uma transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ que existe na região de 630 nm, mudando a formação de quatro bandas Q para apenas duas, bandas α e β . A região das bandas Q é a parte sensível a influências externas, provavelmente devido à presença do nitrogênio no anel heterocíclico da porfirina. O padrão de divisão desta banda é considerado um indicador da origem das interações entre influências externas e o anel porfirínico (DAYER; MOOSAVI-MOVAHEDI; DAYER, 2010).

Figura 12: Espectro de absorção UV/vis do citocromo P450CLA. O perfil de absorção da P450CLA se apresenta similar à de proteínas contendo o grupo porfírico. No espectro, em (A) destacamos os máximos normalmente observáveis em hemoproteínas, como a absorção na região da banda de Soret, que para a P450CLA ocorreu em 417 nm, e absorções na região da banda Q. (B) Destaque para a região das bandas Q, em que os máximos das bandas α e β , em 536 e 570 nm, respectivamente, são melhor observados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro de absorção UV/vis da P450CLA pode ser visto na **Figura 12**. Como discutido anteriormente, o perfil do espectro é característico de um grupamento heme constituído de porfirina ligada ao íon metálico. Notamos a presença intensa da banda de Soret em 417 nm, sendo este de maior absorção e a presença da absorção da banda Q, mas apenas dividida nos dois picos α e β em 570 e 536 nm, respectivamente, como esperado para porfirinas que interagem com íons metálicos. O pequeno ombro na região de 356 nm representa uma pequena porcentagem de proteínas no estado de spin alto. A razão A_{417}/A_{280} pode ser usada como um indicador de pureza da hemoproteína se o seu valor estiver entre 1,0 e 2,0. Pela curva de

absorvência temos um valor de 1,6, o que concorda com o cromatograma de purificação discutido anteriormente (**Figura 5**) (SCHENKMAN; JASSON, 2006).

Para seguirmos na caracterização da P450CLA, utilizamos a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), que pode auxiliar na compreensão da estrutura local de centros paramagnéticos, bem como de mecanismos funcionais (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015). Em um primeiro momento, o espectro de EPR de um sistema biológico pode fornecer informações a respeito: da identidade das espécies paramagnéticas em uma amostra, a magnitude das interações magnéticas e o estado de spin do centro paramagnético. No caso das hemoproteínas, o centro paramagnético é composto pelo átomo de Fe^{+3} , que pode ser usado para detectar a presença do grupo porfirínico e a integridade deste na amostra. As proteínas da família P450 são paramagnéticas e apresentam espectro de EPR típico de grupamento heme férrico de spin baixo ($S = \frac{1}{2}$) (TSAI et al., 1970).

A **Figura 13** mostra o espectro de EPR obtido para a P450CLA, à temperatura de 20 K, em tampão usado na purificação, pH 8,0. Nele identificamos um espectro característico de ferro Fe^{+3} , $S = \frac{1}{2}$, (spin baixo) e simetria ortorrômbica, próprio de proteínas da família P450 e caracterizado pelos valores efetivos de g : $g_1 \sim 3,0$, $g_2 \sim 2,3$ e $g_3 \sim 1,5$. Estes valores são compatíveis ao de outras P450 encontradas na literatura (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015), reforçando a presença do grupamento heme e principalmente que este tem ligado o íon Fe^{+3} .

Figura 13: Espectro de EPR do estado férrico de P450CLA. Um espectro característico de Fe^{+3} foi obtido, evidenciando que o mesmo está ligado ao grupo porfirínico da proteína. Através do espectro também observamos os g efetivos, característicos para medidas com o ferro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, um espectro de Dicroísmo Circular Magnético (MCD) também foi medido na região do UV visível próximo para caracterização do grupo heme. A técnica de MCD envolve medidas do espectro de CD em um campo magnético aplicado paralelo à direção de propagação do feixe de luz circularmente polarizado (MCMaster; OGANESYAN, 2010). O MCD permite observar os subníveis de transição do efeito Zeeman, do estado fundamental aos estados excitados, através de luz circularmente polarizada, mesmo que a intensidade da separação seja menor que as linhas de transição (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

Figura 14: Espectro de MCD da proteína P450CLA. O espectro demonstra bandas características de hemoproteínas que correspondem às transições da Banda de Soret e da Banda Q (CHEESMAN; GREENWOOD; THOMSON, 1991).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 14** mostra o espectro de MCD medido para a P450CLA, em temperatura ambiente. Como esperado, o perfil corresponde ao relatado na literatura para outras hemoproteínas com íon férrico ligado (CHEESMAN; GREENWOOD; THOMSON, 1991). Identificamos a contribuição da banda Q nas duas bandas de elipticidade negativa, uma com pico em aproximadamente 580 nm e outra na região de 540 nm. A banda de Soret contribui com uma intensa banda negativa na região próxima a 430 nm, advinda da transição $\pi \rightarrow \pi^*$, além da transição π da porfirina para o metal. Isso sugere a presença do Fe^{+3} , posto que a energia desta transição é sensível às energias dos orbitais do íon férrico, trazendo como consequência mudança no comprimento de onda desta banda, caso ocorram alterações na ligação axial deste íon (CHEESMAN; GREENWOOD; THOMSON, 1991).

1.4.3 Caracterização da interação da P450CLA com moléculas *decoy*

Para estudarmos a interação de ligantes a proteínas da família P450, o grupamento prostético heme é muito útil como cromóforo para análise das diversas propostas de caracterização. O diferencial dos citocromos P450 em relação a outras hemoproteínas é que o átomo de ferro se liga a uma única cadeia lateral de uma cisteína, situação esta encontrada para poucas proteínas (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011). Desta forma, a ligação de substratos ao heme possuem aspectos que podem ser prontamente estudados por espectrometria (LOCUSON; HUTZLER; TRACY, 2007).

Uma vez que a estrutura molecular sugere propriedades espectroscópicas e catalíticas, compreender estes atributos através de uma sonda natural, como o grupamento heme, pode fornecer características particulares do sítio ativo e sua forma de ação. Assim, utilizamos uma estratégia conhecida para proteínas deste tipo, a partir de comparação das propriedades espectrais, utilizando a própria P450CLA nativa como ponto de partida e, com a adição de moléculas ligantes, identificar pelos espectros das diversas técnicas biofísicas um padrão que possibilite extrair informações detalhadas da relação estrutura/ligante (LOCUSON; HUTZLER; TRACY, 2007).

A utilização de moléculas *decoy* (do inglês *decoy molecules*, moléculas que agem como iscas) (SHOJI et al., 2013) baseia-se no fato de não se ter disponível para compra ou síntese o substrato em que se acredita que a P450CLA atue. Como discutido anteriormente, demonstrou-se que a P450CLA participa da via de síntese do ácido clavulânico, mais especificamente, na catálise da deaminação oxidativa do clavaminato para produção do ácido clavulânico (MOODY; LOVERIDGE, 2014). Uma vez que as P450 são proteínas plásticas e “promíscuas” em relação aos seus ligantes, moléculas *decoy* foram selecionadas por seus históricos de afinidade a P450 de outros organismos e/ou suas similaridades estruturais com o substrato natural, que neste caso foram a presença de anéis β -lactâmicos ou do tipo azóis (SHOJI; KUNIMATSU; KAWAKAMI, 2013).

As moléculas escolhidas estão listadas na **tabela 1** abaixo.

Tabela 1 - Moléculas *decoys* selecionadas para a P450CLA por suas estruturas químicas semelhantes ao substrato natural, Clavaminato

Molécula	Estrutura Química
Clavaminato
Imidazol
Glicil-Histidina
Diclofenaco de Sódio
Lidocaína
Cânfora
Prolina

1.4.3.1 Caracterização de ligantes a proteína P450CLA pelo perfil da curva de absorção UV-Vis

Quando diferentes moléculas se ligam às proteínas P450, elas induzem mudanças na absorção do seu espectro UV/vis (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011). O comprimento de onda da banda de Soret e das bandas Q são determinadas pela coordenação de ligantes ao grupamento férrico heme (ZHAO et al., 2008). As moléculas *decoy* foram testadas inicialmente para interação com a P450CLA por absorção no UV visível e utilizando-se o paradigma de classificação do tipo de ligante que estas moléculas representam (SCHENKMAN; SLIGAR; CINTI, 1981), foram classificadas como inibidores ou substratos, a fim de investigar particularmente as características eletrônicas e termodinâmicas de cada tipo de molécula. Partimos de moléculas *decoy* que sabidamente interagem com os citocromos P450 para serem usadas como padrão para as outras moléculas que ainda não possuem nenhum tipo de evidência sobre sua forma de interação.

Compostos baseados em anéis azóis, como Imidazol, são conhecidos inibidores de enzimas P450, com uso principalmente em tratamentos tópicos sistêmicos de infecções fúngicas (VERRAS; ALIAN; MONTELLANO, 2006). Desta forma, realizamos o primeiro experimento de interação com ligante através do espectro de absorção da P450CLA na presença de Imidazol. O resultado pode ser visto na **Figura 15** abaixo.

Figura 15: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA na presença de Imidazol. A linha preta exibe o clássico espectro de absorção da P450CLA, enquanto que a linha vermelha representa a absorção da proteína complexada à molécula de Imidazol em concentração saturada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No espectro de absorção da P450CLA, identificamos que o pico da banda de Soret encontrava-se em 417 nm, com as bandas Q em 536 nm e 570 nm. No espectro sobreposto da proteína após a adição de Imidazol, observamos que há uma clara mudança tanto nas bandas de Soret quanto na região das bandas Q. A banda de Soret sofre um deslocamento de 5 nm para o vermelho, influenciada pela presença do anel azólico, além de uma relativa diminuição evidenciada no pico de absorção máxima. Este deslocamento é devido a doação de elétron de um nitrogênio do Imidazol para o grupamento heme em estado férrico (ZHAO et al., 2008).

Contudo, o deslocamento observado para a banda de Soret da P450CLA na presença de Imidazol em excesso foi um pouco menor que o usual de 425 nm visto para outras P450, sugerindo um modo de ligação alterado, com a formação de grupos no estado de spin baixo (SEWARD et al., 2006). Pequenas perturbações também foram notadas na região das bandas Q. Como é característico deste tipo de interação,

ocorreu o deslocamento das bandas, com leve diminuição da intensidade da banda α . No caso, nenhuma correção de diluição foi feita, pois o volume da amostra foi alterado menos que 0,5% (LOCUSON; HUTZLER; TRACY, 2007).

Figura 16: Espectro de absorção no UV/vis da P450CLA na presença de Glicil-Histina. A linha preta exibe o clássico espectro de absorção da P450CLA, enquanto que a linha vermelha representa a absorção da proteína complexada à molécula de Glicil-Histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um segundo ligante testado foi o dipeptídeo glicil-histidina. Os espectros de absorção (**Figura 16**) mostram que a Glicil-Histidina provoca um deslocamento similar ao do Imidazol. A banda de Soret foi deslocada para o vermelho, com 5 nm de diferença, de 417 nm para 422 nm. A Glicil-Histidina também possui em sua estrutura química um anel azólico, sendo assim esperado o comportamento similar do seu espectro ao do Imidazol. A sugerida interação alterada também aparece, uma vez que deslocamento da banda de Soret com a molécula em excesso também foi menor que o descrito na literatura (SEWARD et al., 2006).

A **Figura 17 (A) e (B)** representa o deslocamento provocado pelo Diclofenaco de Sódio e a Lidocaína, respectivamente. Ambos aparentam um perfil do espectro de compostos que atuam como substrato, devido ao discreto deslocamento para o azul e conversão do estado férrico da proteína de spin baixo para spin alto. Em relação à usual coordenação da molécula de água como sexto ligante, esta posição fica tipicamente desocupada quando há interação com substratos que migram o espectro absoluto da banda de Soret para comprimentos de onda mais curtos, em direção ao azul.

Figura 17: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA em presença de Diclofenaco de Sódio (A) e Lidocaína (B). Em preto, observamos espectro de absorção da P450CLA, enquanto que a linha azul representa a absorção da proteína complexada a molécula de Diclofenaco de Sódio em (A) e com Lidocaína em (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observamos os espectros de absorção da P450CLA interagindo com Cânfora e Prolina na **Figura 18 (A) e (B)**. A Cânfora é uma molécula conhecida por ser substrato da P450CAM (NICKERSON; WONG, 1997), o citocromo mais estudado da família das P450 nos dias atuais e que estabeleceu a maioria dos parâmetros de estudos desta família de proteínas. Por se tratar de substrato, geralmente seu deslocamento ocorre para o azul, deslocando a banda de Soret dos usuais 417 nm para 390 nm (ZHAO et al., 2008). Entretanto, para a P450CLA, ocorre um comportamento similar a ligação ao Imidazol. A banda de Soret deslocou-se para o

vermelho, de 417 para 421 nm, com diminuição da intensidade da banda, além da perturbação na região da banda Q, identificada também pela diminuição da intensidade da banda α . A Prolina, apesar de possuir um anel do tipo azólico, não provocou nenhuma alteração significativa no espectro UV da P450CLA. As bandas característica não tiveram mudanças, sugerindo que a molécula seja inerte para a P450CLA.

Figura 18: Espectro UV/vis de absorção da P450CLA em presença de Cânfora (A) e Prolina (B). A linha preta representa o espectro de absorção da P450CLA, enquanto que a linha azul representa a absorção da proteína complexada a molécula de Cânfora (A). Em (B), as linhas azul e vermelha representam os testes de saturação de Prolina, mas nenhuma mudança significativa foi identificada no espectro de absorção em relação a proteína sem ligante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.3.2 Caracterização do tipo de ligante a proteína P450CLA pelo espectro da diferença UV/vis

O espectro da diferença UV foi utilizado para determinarmos os modos de ligação dos compostos a P450CLA. Tal espectro é obtido pela diferença entre o espectro absoluto de absorção UV/vis da proteína livre e com ligante. Com base nas formas das curvas do espectro da diferença, os ligantes podem ser classificados: do tipo I, compostos que atuam como substratos e cujos espectros da diferença apresentam máximo por volta de 390 nm e mínimo em 430 nm e tipo II, sugeridos

como inibidores para a proteína e cujos espectros da diferença apresentam máximo por volta de 434 nm e mínimo próximo a 410 nm (LUTHRA; DENISOV; SLIGAR, 2011).

Usamos inicialmente a molécula de Imidazol como padrão devido à sua comprovada função inibitória. O espectro na **Figura 19** apresentou-se com perfil clássico do Tipo II, sugerindo ser uma molécula inibidora, com o átomo de nitrogênio coordenando com o ferro do grupamento heme. O perfil do Tipo II reflete a ligação axial no sítio de ligação pelo Imidazol. Há um pico claro por volta de 430-440 nm e absorção negativa na região entre 410-420 nm, com pequena perturbação na região da banda Q (Dawson et al., 1982).

Figura 19: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada à molécula de Imidazol. O espectro demonstra o chamado perfil do Tipo II, que corresponde a moléculas que geralmente possuem características inibitórias para os citocromos P450. O Imidazol é um conhecido inibidor das proteínas da família P450, desta forma, o resultado condiz com o descrito na literatura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Partindo deste formato, analisamos os espectros da diferença das outras moléculas *decoy* de acordo com o seu tipo. Na **Figura 20** nota-se que o espectro da diferença da Glicil-Histidina, apesar de não tão claro quanto o de Imidazol, também aparenta ser do Tipo II, com regiões de absorção similares ao do Imidazol. O pico positivo está entre 430-440 nm e o negativo está entre 410-420 nm. Este resultado sugere que o anel azólico da Glicil-Histidina também coordena em ligação axial com o ferro do grupamento heme, ocupando espaço no sítio ativo e com atuação inibitória para a P450CLA.

Figura 20: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada a molécula de Glicil-Histidina. O espectro da molécula de Glicil-Histidina não demonstra um perfil claro, contudo, aparenta-se a um do Tipo II, que corresponde a moléculas que geralmente possuem características inibitórias para os citocromos P450.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ao compararmos os espectros da P450CLA obtidos na presença de Diclofenaco de Sódio e de Lidocaína na **Figura 21 (A)** e **(B)**, respectivamente, constatamos o perfil de classificação do Tipo I, indicando que ambos podem agir como substratos para a proteína P450CLA. Para o Diclofenaco de Sódio, o espectro

apresentou uma banda negativa na região de 420-430 nm, enquanto que o pico de absorção diferencial positiva é percebido na região entre 390-400 nm. A região da banda Q não apresentou nenhuma perturbação significativa. Em relação à Lidocaína, a absorção diferencial negativa apresentou mínimo entre 410-420 nm e a absorção positiva teve seu máximo entre 370-380 nm, com aumento da intensidade negativa na região da banda Q.

Figura 21: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada à molécula de (A) Diclofenaco de Sódio e (B) Lidocaína. (A) O Diclofenaco de Sódio apresentou um espectro claro identificado como do Tipo I, geralmente atribuído a moléculas com papel similar ao substrato natural da proteína. **Em (B)** o perfil da Lidocaína remete ao do tipo I por suas características e forma semelhante ao de Diclofenaco de Sódio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em comparação ao Diclofenaco, a Lidocaína teve seu resultado levemente deslocado, indicando que existem diferenças nas interações das duas moléculas em relação ao posicionamento no sítio ativo no heme da P450CLA. Além disso, a intensidade espectral da Lidocaína foi de aproximadamente 2,5 vezes maior que a do Diclofenaco. Este resultado sugere que a mudança do estado de spin obtida pela Lidocaína também foi 2,5 vezes maior que a provocada pelo Diclofenaco. Moléculas que apresentam espectro do Tipo I perturbam o equilíbrio do estado de spin, favorecendo o deslocamento do ligante axial, com mudança no estado de spin de hexacoordenado (baixo spin) para pentacoordenado (alto spin) (WARRILOW et al.,

2010). Desta forma, aparentemente as moléculas de Lidocaína foram mais eficazes em deslocar a molécula de água da posição coordenada de sexto ligante no estado de spin baixo para o de spin alto, levando o heme à condição de ligação pentacoordenada.

Os espectros da diferença apresentados na **Figura 22 (A) e (B)**, correspondentes à Cânfora e à Prolina, exibiram perfis bem diferentes dos apresentados pelas outras moléculas. A Cânfora aparentou ter um espectro absoluto do tipo II, com deslocamento da banda de Soret para o vermelho, apesar de seu caráter de substrato para a P450 de *Pseudomonas putida*, sugerindo um perfil do Tipo I para esta investigação espectroscópica. O espectro da diferença, entretanto, reforçou esta tendência não usual do caráter inibitório. A única absorção constatada é o mínimo na região entre 410-420 nm, que coincide com o demonstrado anteriormente para o Imidazol e a Glicil-Histidina, dois compostos de caráter inibitório e de perfil do tipo II.

Figura 22: Espectro da Diferença UV/Vis da P450CLA complexada a molécula de (A) Cânfora e (B) Prolina. Os espectros da diferença de Cânfora (A) e Prolina (B) não aparentaram nenhum perfil clássico de Tipo, o que dificulta a sua classificação, exigindo análise por outras técnicas para determinação da interação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A absorção diferencial da Cânfora não exibiu nenhuma banda reconhecível, nem presença de um pico positivo claro na região de 430-440 nm, bem como nenhum tipo de alteração significativa na Banda Q. Por sinal, esta ausência evidencia um coeficiente de extinção molar menor para o complexo produzido pela interação da Cânfora com a P450CLA. Um espectro da diferença com perfil assimétrico deste tipo foi relatado por Conner e colaboradores em 2015. Neste trabalho, o espectro mostrou-se diferente do padrão clássico do Tipo II para a interação entre a CYP2C9 e a molécula de 4-(3-fenilpropil-1H-1,2,3-triazol) (PhP-TRZ), considerado um inibidor para as P450 devido à presença do seu anel azólico. Apesar do espectro da Cânfora não poder ser classificado facilmente de acordo com a divisão clássica de tipos, a similaridade do seu mínimo com do Imidazol e Glicil-Histidina sugere algumas perturbações no campo ligante, entretanto, são muito complexas para serem compreendidas apenas pelo ponto de vista da diferença do espectro (CONNER et al., 2015).

A presença de um anel do tipo azólico na Prolina nos remeteria a um espectro do tipo II, correspondente a um inibidor. Contudo, a Prolina exibiu resultados sem nenhum tipo de interação clara com a P450CLA por espectroscopia. Além do seu espectro absoluto não apresentar nenhuma alteração de deslocamento da banda de Soret, o espectro da diferença também se mostrou não usual, com uma aparente tendência ao Tipo II ou Tipo I Reverso, uma vez que os dois são bem similares. O espectro aparenta ter uma absorção positiva na região entre 415-425 nm que se desloca com a titulação para entre 430-440 nm. A absorção diferencial negativa torna-se mais proeminente em seguida, com o mínimo também se deslocando entre 390-410 nm para 400-420 nm. Estas características vão ao encontro dos resultados descritos para o Tipo I Reverso, para o qual acredita-se que identifique o movimento de volta da molécula da água a posição coordenada do sexto ligante (ligante distal), dirigida por alguma mudança conformacional da proteína (CHUN et al., 2001). A falta de resposta espectral, contudo, não significa necessariamente uma falta de interação, mas que o posicionamento da molécula ocorre em um sítio da proteína distante do grupamento heme (MAST; LIN; PIKULEVA, 2015). Este resultado surge apenas com a molécula acima do nível de saturação e não é similar a qualquer outra molécula

deste estudo, sendo que assim, a técnica espectroscópica mostra-se limitada para explicar o comportamento deste ligante.

1.4.3.3 Caracterização da interação da P450CLA com moléculas *decoy* por EPR

Uma análise das interações entre as moléculas *decoy* e a P450CLA foi realizada por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) para obtenção de informações do ponto de vista da vizinhança do íon de Fe existente no grupo heme. Assim, através do EPR é possível comprovarmos a interação das moléculas usando o heme do sítio ativo como sonda intrínseca. A técnica tem sido aplicada extensivamente a outras proteínas da família P450 no estudo dos mecanismos de reação e de espécies intermediárias, com análise da posição das moléculas no sítio ativo da proteína em estado férrico, de modo a auxiliar na compreensão estrutural de mudanças conformacionais e da atividade fornecidas pelo espectro da diferença (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015).

Compostos que interagem com o grupamento heme das P450 geralmente possuem dois modos de ligação: um com o deslocamento da molécula de água da posição axial em relação ao heme e outro com a substituição da água pelo composto, coordenando-se através de um nitrogênio hibridizado (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015). Estes modos de interações produzem mudanças no campo ligante do heme com subsequente alteração no espectro óptico. Por meio do EPR somos capazes de obter os valores do fator g associado ao ferro do heme e o seu estado de spin, de forma a identificar a ausência ou mesmo a identidade dos ligantes axiais, enquanto que o acoplamento dipolar próximo ao ferro do heme auxilia na localização da posição da água e de outras moléculas no sítio ativo (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015).

Algumas CYP's são extremamente seletivas, modificando apenas uma posição na interação com substratos únicos, enquanto que outras modificam-se amplamente para comportar vários tipos de moléculas. Contudo, as reações químicas básicas

catalisadas por essas enzimas são muito similares. A chave do entendimento encontra-se na especificidade, na seletividade e na orientação que estes compostos possuem no sítio ativo, possibilitando a enzima atuar sobre eles ou modificando o estado de spin do heme, de forma a inibir a atividade proteica.

O espectro da proteína livre sem ligante foi apresentado na seção 1.4.2.4 e pode ser visto na **Figura 12**. O espectro destaca os valores das componentes g para o Ferro em estado de baixo spin sem interferências de ligantes extrínsecos com valores para g de: g_z : 3,0; g_y : 2,3; g_x : 1,5. O espectro da P450CLA na presença de Imidazol é mostrado na **Figura 23** sobreposto ao espectro da proteína livre. Na figura observamos a interferência do Imidazol, em que as intensidades dos picos são menores e as componentes encontram-se deslocadas em seus valores. A componente g_z geralmente é a mais sensível a mudanças pela presença de outras moléculas, enquanto que para a componente g_y obtém-se a menor sensibilidade (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015).

Figura 23: Espectro de EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Imidazol. A linha preta corresponde ao espectro da proteína livre de ligantes e a linha vermelha corresponde à proteína complexada ao Imidazol. As linhas demonstram perturbação nos fatores g , indicando que houve alteração da geometria do grupamento heme.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A diminuição da intensidade em g_z sugere que a interação da molécula é fraca, por ser resultado da coordenação de um Nitrogênio hibridizado no orbital sp^3 (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015). O deslocamento na posição da linha centrada em torno de g_z advém de um novo arranjo para a coordenação com o Ferro. Já o alargamento das linhas representa uma distribuição de modos de ligação ou diferentes distribuições de carga na interação com o sítio ativo de uma mesma espécie sp^3 (CRUCE; LOCKART; BOWMAN, 2015). O espectro da interação com o Imidazol ainda mostra uma componente extra (segunda ressonância na região g_z e ombro em g_x) que sugere a ligação do Imidazol ao grupo heme de duas formas distintas.

Em comparação ao espectro obtido para a Glicil-Histidina (**Figura 24**), que também apresenta um comportamento do Tipo I (**Figura 20**), vemos que os valores de g estão também deslocados em relação ao g original da proteína sem a presença de ligantes. O alargamento das componentes é menor, indicando que a distribuição das conformações da proteína ligada a Glicil-Histidina é mais homogênea que no caso do Imidazol.

Figura 24: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Glicil-Histidina. A linha preta corresponde ao espectro da proteína livre de ligantes e a linha vermelha corresponde a proteína complexada a Glicil-Histidina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Lidocaína. Os espectros de EPR indicam a perturbação da geometria do Heme através das alterações dos valores das componentes g.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 25** exibe o espectro da P450CLA com Lidocaína sobreposto ao espectro da proteína livre. Assim como para o Imidazol e a Glicil-Histidina, notamos que o composto também perturbou a região de ligação do Ferro no grupamento heme, fato que constatamos pelos diferentes valores de g. Em comparação aos valores da proteína livre fica claro o deslocamento destas componentes. Contudo, os picos são mais estreitos que os mostrados nas figuras 24 e 23, indicando que as conformações de interação da P450CLA com este composto são mais homogêneas que as anteriores, ou seja, possuem modo de interação similares. A intensidade também não sofre muita alteração em relação à proteína, denotando um tipo de ligação forte entre o composto e a proteína, com o deslocamento da molécula de água axial, sem uma interação direta com o ferro, deixando-o livre para que a atividade enzimática ocorra no caso de transferência de elétrons.

Figura 26: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e presença de Diclofenaco de Sódio. A sobreposição dos espectros da proteína P450CLA livre (preto) e da proteína complexada ao Diclofenaco de Sódio (vermelho) deixa claro que o composto perturba intensamente a região do heme.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De todos os compostos selecionados, a maior perturbação do espectro foi evidenciada para a interação da enzima com o Diclofenaco de Sódio, como visto na **Figura 26**. O deslocamento das componentes, bem como o seu alargamento é evidente. As componentes quase desaparecem, sugerindo uma forte alteração geométrica no grupo heme da proteína devido à presença do ligante, o que provavelmente, pode provocar mudanças estruturais na enzima para acomodação do ligante. Este resultado vem de encontro com o do espectro de absorção da diferença (**Figura 21**), em que o perfil do Tipo I indicou que o Diclofenaco de Sódio poderia atuar como um substrato para a P450 de *Streptomyces clavuligerus*.

Figura 27: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e presença de Cânfora. A linha preta corresponde ao espectro da proteína livre de ligantes e a linha vermelha corresponde a proteína complexada a Cânfora. Diferente dos outros espectros, a Cânfora demonstrou uma presença clara de duas espécies paramagnéticas que pode corresponder a mais de um modo de interação do composto com o grupamento heme.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em particular, o espectro da Cânfora na **Figura 27** expôs uma forma diferente das vistas até o momento para as outras moléculas utilizadas. A Cânfora, que atua como substrato para a P450CAM, em realidade demonstrou perfil óptico similar ao Tipo II na seção 1.4.3.1, aparentando ser um possível inibidor para a P450CLA. O espectro de EPR apresentou o deslocamento das componentes g_z e g_x , com leve diminuição na intensidade, indicando posições diferentes de coordenação e uma interação do tipo forte, além de um discreto alargamento das componentes mais intensas em relação às da proteína livre. No entanto, nota-se a presença de novas componentes g_z e g_x de menor intensidade ao lado das já deslocadas de maior intensidade, caracterizando a existência de uma amostra heterogênea quanto às formas de coordenação do Nitrogênio ao Ferro, além de uma clara perturbação do espectro de baixo spin da P450CLA. Esta situação pode ser advinda de tipos de

ligação distintos em que variam a orientação e proximidade dos compostos em relação ao elétron não emparelhado do Fe^{+3} .

Posto que a coordenação direta do Nitrogênio com o Ferro ocorre apenas para espectros do Tipo II, neste caso, o EPR tornou-se uma ferramenta imprescindível para o esclarecimento da identidade do espectro da diferença que a Cânfora produziu, dado que o perfil não se enquadrava aos formatos clássicos descritos na literatura. A vantagem do método em relação à absorbância UV/vis é o foco sobre a fração do estado de baixo spin que o EPR permite verificar de forma exclusiva. A análise de absorção óptica da diferença é difícil para compostos do tipo II, porque o deslocamento para o vermelho da banda de Soret frequentemente coincide com a diminuição do coeficiente de extinção molar da banda e isso combina-se ao fato da predominância da forma em baixo spin, o que torna difícil identificar qualquer deslocamento do equilíbrio nesta direção (CONNER, 2013).

O espectro da Prolina na **Figura 28** é o que demonstrou menor intensidade aliado a largura mais fina dos picos das componentes. De fato, este era um resultado esperado, uma vez que durante as investigações por UV nenhuma alteração foi identificada, sendo assim, uma interação mais fraca desta espécie ligante parece razoável. Contudo, o deslocamento causado nos valores de g sugere a existência de uma perturbação, dado que houve alteração na forma de interação do heme da proteína, mesmo que de menor intensidade em relação às outras moléculas. Os fatos analisados tanto para a Cânfora, quanto para a Prolina, colocam em discussão a classificação por Tipos pelo perfil espectroscópico, dado que mesmo a Prolina não exibindo nenhum tipo claro através da espectroscopia UV, foi possível identificar uma perturbação utilizando-se o EPR. Contudo, mesmo para este caso, não é possível classificar o tipo de interação existente para a Prolina, dado que os únicos parâmetros encontrados hoje na literatura são os especificados para o padrão clássico do espectro da diferença UV/vis.

Figura 28: Espectro EPR/CW da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Prolina. A linha preta corresponde ao espectro da proteína livre de ligantes e a linha vermelha corresponde à proteína complexada à Prolina. Apesar de não ter sido identificada nenhuma alteração no seu espectro UV/Vis, a perturbação apresentada pelas linhas espectrais de EPR/CW denotam que a Prolina interage com o grupamento heme.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.3.4 Caracterização Termodinâmica da interação da proteína P450CLA com moléculas *decoy*

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é um método experimental direto que fornece dados termodinâmicos a respeito das transições conformacionais de macromoléculas biológicas. Pela medida da capacidade térmica em função da temperatura, propriedades termodinâmicas podem ser calculadas e esclarecer os mecanismos que governam um equilíbrio conformacional, como por exemplo entre o estado enovelado e desenovelado de uma proteína (CELEJ et al., 2006). A técnica oferece vantagens significativas ao caracterizar interações biomoleculares. Uma vez que toda reação química acontece com trocas de calor, o calorímetro funciona como um detector universal. Assim, as moléculas e suas interações podem ser estudadas por uma visão calorimétrica em seu estado natural, sem a necessidade de imobilizá-

las ou utilizar algum tipo de sonda que forneça um sinal externo (PLOTNIKOV et al., 2002). Portanto, optamos por utilizar esta técnica para melhor avaliar as interações entre a P450CLA e as moléculas *decoy* propostas.

Os termogramas obtidos para a proteína P450CLA em associação aos ligantes são mostrados abaixo. Todos eles são sobrepostos ao termograma da proteína livre para melhor comparação dos resultados. Uma análise de mudanças da temperatura de transição, variação da entalpia e da energia livre, pode fornecer dados sobre o reconhecimento molecular da proteína em relação aos compostos *decoys*. A proteína sem a presença dos ligantes teve uma temperatura de transição ou *melting* (T_m) centrada em 43,2° C, como discutido anteriormente, e sua entalpia de desenovelamento foi de 150,02 kcal/mol. A adição dos ligantes *decoys* causaram clara perturbação tanto na estabilização, como na desestabilização da proteína, evidenciados pelas mudanças nos valores da temperatura de transição.

Na **Figura 29** estão dispostos em **(A)** e **(B)** os termogramas da P450CLA complexada ao Imidazol e a Glicil-Histidina, respectivamente. Apesar de ambas terem sido classificadas como moléculas do tipo II, com ação inibitória, o comportamento termodinâmico foi diferente. O Imidazol complexado deslocou o pico de transição para temperaturas menores, demonstrando notoriamente que a interação com esta molécula causa desestabilização da proteína. O termograma também se apresenta mais largo, o que sugere a ocorrência de mais de uma transição, provavelmente pela heterogeneidade da ligação. Este é um resultado que entra em concordância com o observado a partir do espectro de EPR (**Figura 23**), já que a componente espectral também sugeriu heterogeneidade de espécies. Isso pode ser atribuído ao fato de mais de uma forma de coordenação com o Ferro do grupamento Heme, o que no entanto, não torna a estrutura conformacional da proteína diferente a ponto de gerar temperaturas de transição tão distintas ao nível de captação da técnica. Diferentemente, o termograma da Glicil-Histidina demonstrou um pico de largura similar ao da proteína livre e levemente deslocado para temperaturas maiores, indicando que a interação favorece a estabilidade da proteína. Apesar de também poder ser classificada como molécula do tipo II, aparentemente, o tipo de molécula

não representa um parâmetro de determinação para a estabilidade ou instabilidade da proteína.

Figura 29: Termograma da proteína P450CLA na ausência presença de Imidazol (A) e Glicil-Histidina (B). A curva em preto representa a proteína sem a presença de ligantes, enquanto que a curva vermelha representa a associação da P450CLA às moléculas. O deslocamento do pico para temperaturas menores no Termograma (A) indica que o Imidazol provoca a desestabilização da proteína. Diferente do Termograma em (B), em que se deslocou pouco para temperaturas maiores sugerindo que a Glicil-Histidina estabiliza a proteína, apesar das duas moléculas serem do tipo II e apresentaram caráter inibitório.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Situação semelhante é vista para os termogramas do Diclofenaco de Sódio e da Lidocaína, mostrados nas **Figura 30 (A) e (B)**, respectivamente. Ambas as moléculas foram classificadas como do Tipo I, ou seja, de características de substrato para a proteína. Da mesma forma que serem moléculas do Tipo II não foi determinante para estabilizar ou desestabilizar a proteína, ser do Tipo I também não apresenta um padrão neste sentido. O deslocamento provocado pelo Diclofenaco de Sódio foi em direção a temperaturas maiores, enquanto que da Lidocaína, apesar de menor, o deslocamento deu-se em direção a temperaturas menores. Constata-se que o deslocamento provocado pelo Diclofenaco de Sódio foi o maior desvio do pico de transição em relação à proteína livre, partindo de 43,2° C para 52,2° C, o que indica a maior estabilização e mudança dentre as moléculas *decoys*. Este resultado vem em concordância com o espectro de EPR/CW obtido para a interação do Diclofenaco de

Sódio com a proteína, em que a maior perturbação na vizinhança do grupo heme foi verificada. Em relação à largura da transição da proteína sem a presença de ligantes, o complexo P450CLA e Diclofenaco de Sódio manteve-se semelhante, indicando que a conformação de interação pode ser única e a mais estável para este complexo.

Figura 30: Termograma da proteína P450CLA na ausência e na presença de Diclofenaco de Sódio (A) e Lidocaína (B). A curva em preto representa a proteína sem a presença de ligantes, enquanto que a curva vermelha representa a associação da P450CLA às moléculas. A presença do Diclofenaco de Sódio em (A) levou o pico a se deslocar quase 10° C para temperaturas maiores, sugerindo a estabilização da proteína. A Lidocaína em (B) provocou um deslocamento menor para temperaturas menores e nota-se a presença de mais um processo, representado pelo ombro a direita, próximo à linha de base.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo não acontece com a Lidocaína, em que o pequeno deslocamento provocado vai para 42,8° C, aliado a mais outras transições de menor intensidade, representadas pelo ombro próximo a base direita do termograma. Assim como descrito para o Imidazol, o alargamento da curva sugere mais de uma transição com valores próximos, o que pela análise espectral nos permite interpretar como uma provável segunda forma de interação da molécula com a proteína, que diferente do Imidazol, foi suficiente para deslocar o pico além do valor médio. O resultado indica a existência de mais de uma população de proteínas ligadas a Lidocaína em outros tipos de conformação, que pelo alcance do pico, representam uma forma do complexo

proteína-ligante tão estável quanto ao atingido para o caso do Diclofenaco de Sódio, embora, em menor porção.

Os últimos termogramas (**Figura 31**) **(A)** e **(B)**, correspondentes à Cânfora e Prolina, tiveram comportamento semelhante aos anteriores, entretanto, em menor intensidade de perturbação. Os resultados entram em acordo com os resultados analisados por EPR, sugerindo que mesmo de forma mínima, os compostos possuem um nível de interação com a proteína. No caso da Cânfora, em que os resultados por espectroscopia também foram mais evidentes, nota-se que o deslocamento do pico de transição foi maior no sentido das temperaturas menores, com ação de desestabilização da proteína. A Prolina, por sua vez, não apresentou nenhum indicativo por UV/vis de interação com a P450CLA, entretanto, mesmo que minimamente, a temperatura de transição foi deslocada no sentido das temperaturas maiores, atuando na estabilização da proteína. Em comparação aos níveis de intensidade das outras técnicas, a perturbação provocada pela Prolina entra em consonância com os resultados obtidos, posto que para as outras técnicas o efeito é minimamente percebido ou nem mesmo distinguido. A largura da curva para ambos se manteve próxima à da curva da proteína livre indicando que as espécies complexadas possuem temperaturas de transição similares.

Figura 31: Termograma da proteína P450CLA na ausência e na presença de Cânfora (A) e Prolina (B). A curva em preto representa a proteína sem a presença de ligantes, enquanto que a curva vermelha representa a associação da P450CLA às moléculas. Apesar de não ter sido bem identificada por métodos espectroscópicos, vemos no termograma (A) a influência da Cânfora sobre o grupamento heme da proteína pelo deslocamento do pico para temperaturas menores. Em (B) o termograma da Prolina, com exceção do espectro de EPR/CW, continua demonstrando que a proteína aparenta ser inerte à presença do composto, sem nenhuma alteração aparente e/ou significativa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4.4 Caracterização das interações P450CLA com Diclofenaco de Sódio e Imidazol por MCD, EPR pulsado e Voltametria Cíclica

Os resultados obtidos a partir da absorção ótica e da calorimetria até o momento demonstraram que as moléculas *decoy* de Imidazol e Diclofenaco de Sódio são as que provocam maiores efeitos de interação com a P450CLA. Portanto, estes foram escolhidos dentre os compostos testados para uma análise particular dos efeitos da ligação com a proteína. Para isto, o Imidazol, por ser uma molécula conhecida e amplamente estudada juntamente à família dos citocromos P450, foi estabelecida como modelo de ligante inibitório, enquanto que o Diclofenaco de Sódio por sua forte interação a P450CLA, além do seu interesse farmacológico (XU et al., 2015), foi utilizado como molécula de interação desconhecida. Voltamos o foco ao nível eletrônico e estrutural aplicando as técnicas de Dicroísmo Circular Magnético (MCD - *Magnetic Circular Dichroism*) e de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Onda Pulsada (*Pulsed EPR* ou EPR Pulsado) associadas à atividade da proteína sobre os ligantes por Voltametria Cíclica.

Como discutido na seção 1.4.2.4, o espectro de MCD da proteína P450CLA foi analisado e está de acordo com o padrão clássico de spin baixo, com bandas em regiões dos espectros similares ao de outras proteínas da família P450 previamente caracterizadas com dados na literatura (CONNER, 2013). Para que uma molécula *decoy* seja considerada um bom composto imitador do substrato real, algumas características espectrais da proteína nativa devem ser reproduzidas pelo complexo ligado, advindas da análise da banda de Soret e da Banda Q. O espectro de MCD da P450CLA apresenta ponto de inversão da banda de Soret em 416 nm, além de 3 máximos na região visível em 465 nm, 519 nm e 560 nm, além de um mínimo em 578 nm. Nenhuma característica de spin alto foi observada no espectro da P450CLA, que normalmente se evidenciaria através de uma banda de elipticidade negativa característica deste estado no comprimento de onda em 645 nm. Baseados na comparação empírica destas características chave na proteína nativa com as correspondentes características vistas para vários ligantes, a melhor correlação é estabelecida para análise do espectro (DAWSON; ANDERSSON; SONO, 1982).

A mudança provocada pela adição do Imidazol é mostrada na **Figura 32**. Notamos uma alteração significativa no espectro, com mudanças na intensidade e deslocamento das bandas, assim como os identificados no espectro UV/vis. Na presença do Imidazol o ponto de inversão da Banda de Soret surge em 421 nm, a primeira banda positiva em 473 nm e a segunda em 528 nm. A terceira banda positiva é correspondente a 565 nm e o mínimo em 583 nm. Os valores são similares aos já estudado por Dawson e colaboradores (1982) para a P450CAM (426 nm; 475 nm; 530 nm; 565 nm; 585 nm, respectivamente), estando de acordo ao descrito na literatura e indicando, como em estudos prévios, que o Nitrogênio do Imidazol tem função doadora frente ao grupamento heme (DAWSON; ANDERSSON; SONO, 1982).

Figura 32: MCD da Proteína P450CLA na ausência e presença de Imidazol. A linha vermelha corresponde a P450CLA, enquanto que a linha corresponde a proteína complexada ao Imidazol. Nota-se pequenas mudanças nas bandas características do grupamento heme, no posicionamento da Banda de Soret e nas bandas correspondentes às Bandas Q.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Análise similar pode ser feita com a adição do Diclofenaco de Sódio e em comparação aos dados encontrados na literatura. O espectro de MCD da proteína P450CLA na presença do ligante foi sobreposto ao espectro da proteína sem a presença do mesmo (**Figura 33**). Os valores destacados neste caso são: 416 nm para o ponto de inversão da Banda de Soret, com o primeiro pico pouco pronunciado e aproximadamente em 460 nm; o segundo e o terceiro máximo em 521 nm e 560 nm, respectivamente, além do mínimo em 578 nm. Estes valores são similares aos obtidos para P450CAM na presença de substâncias com átomo de oxigênio doador, e que resultaram em 419 nm, 458 nm, 522 nm, 558 nm e 578 nm, na mesma ordem citada anteriormente (DAWSON; ANDERSSON; SONO, 1982). Tanto para os espectros da proteína com Imidazol quanto para com o Diclofenaco de Sódio, não foi possível identificarmos a banda de alto spin em 645 nm, sugerindo que não há conversão direta do estado de baixo spin com a adição do ligante.

Figura 33: MCD da Proteína P450CLA na ausência e na presença de Diclofenaco de Sódio. A linha preta corresponde a P450CLA, enquanto que a linha azul corresponde a proteína complexada ao Diclofenaco de Sódio. Poucas mudanças podem ser percebidas visualmente, entretanto, a análise dos pontos característicos do espectro do grupamento Heme dão indicações a respeito do ligante axial do Ferro.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de MCD se somam neste caso aos de EPR ao auxiliar na identificação do ligante axial do ferro do grupamento heme, determinando o tipo de molécula e por consequência, o espectro UV/vis que este pode produzir. A técnica espectroscópica de MCD é conhecida por conseguir caracterizar proteínas que contém o grupamento heme de forma única através das informações obtidas pelo espectro particular de cada proteína. Assim, é possível classificar outras proteínas similares e seus compostos pela comparação de espectros e propriedades (HALES, 2011). As bandas do heme em estado de baixo spin variam substancialmente em seu comprimento de onda como função da energia do acceptor dos orbitais d e consequentemente, do ligante axial do íon férrico. Desta forma, características das bandas podem ser usadas como indicadores da natureza do ligante axial, dada uma faixa ampla de ligações axiais ao heme que sejam conhecidas e propriamente calibradas (CHEESMAN; GREENWOOD; THOMSON, 1991).

Alguns estados funcionais de proteínas com grupamento heme dependem fortemente da natureza dos ligantes axiais. Uma ligação forte leva ao estado de baixo spin e este estado pode ser esclarecido utilizando EPR de onda contínua. Contudo, as interações entre os momentos magnéticos dos spins dos elétrons e dos núcleos magnéticos em volta são difíceis de serem estudadas desta forma (FITTIPALDI et al., 2008). Portanto, ao considerarmos o estudo do ligante axial do grupamento heme, utilizamos a técnica de EPR pulsado a fim de analisarmos a estrutura local do centro paramagnético, dado que o método permite analisar a contribuição de diferentes espécies de forma a distinguir as linhas de ressonância sobrepostas (PRISNER; ROHRER; MACMILLAN, 2001).

O estudo focou-se na interação da P450CLA com a molécula de Diclofenaco de Sódio. A medida foi realizada no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) e contou com o auxílio do Dr. José Fernando de Lima. A **Figura 34** mostra o resultado obtido pelo experimento de espectroscopia da correlação de subnível hiperfina (HYSCORE - *Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy*). A técnica permite a detecção dos núcleos ligantes que interagem ou que estão próximos ao ferro do heme na proteína, com uma possibilidade de obter informações estruturais relacionadas à esfera de coordenação do heme (CONNER, 2013).

Figura 34: Espectro EPR pulsado 2D da Proteína P450CLA na ausência e presença de Diclofenaco de Sódio. (A) Espectro sem a presença da molécula, a seta indica a presença da água e a posição do Heme. **(B)** A adição do Diclofenaco de Sódio desloca a molécula de água e há diminuição da intensidade da presença do grupamento heme.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na **Figura 34 (A)** são exibidos os dois quadrantes para o caso da P450CLA sem a presença de um ligante. No segundo quadrante (-,+) do espectro de *HYSCORE* identificamos dois núcleos correspondentes ao grupamento heme, um em (-7,0, 3,5) e outro em (-3,0, 7,0). No primeiro quadrante (+,+) identificamos o sinal devido aos núcleo de hidrogênio da molécula de água, um com coordenada aproximada de (12,0,13,0) e o segundo em (13,0, 11,5). Algumas impurezas também apareceram no espectro e foram consideradas artefatos, mas suas naturezas não foram identificadas. O espectro correspondente a adição do Diclofenaco de Sódio é visto na **Figura 34 (B)** em que uma significativa mudança pode ser notada. No segundo quadrante, o sinal correspondente ao heme tornou-se menos intenso, enquanto que o sinal dos prótons

correspondentes a molécula de água axial desapareceu completamente. Este resultado sugere que a molécula de Diclofenaco de Sódio desloca a molécula de água para interagir com o Ferro do grupamento heme, demonstrando a interação da molécula no sítio ativo da P450CLA

Em vista desse resultado, optamos por testar a atividade da P450CLA sobre a molécula de Diclofenaco de Sódio. Os citocromos da família P450 necessitam de um parceiro para a transferência de elétrons, ou seja, elas funcionam apenas como monoxigenases externas. Para a ativação do oxigênio e consequente conversão do substrato, os elétrons necessários normalmente são transferidos por proteínas redox parceiras. No caso das P450 de bactérias *Streptomyces*, a ferredoxina desempenha este papel (MOODY; LOVERIDGE, 2014). Entretanto, a P450CLA utilizada neste trabalho não foi co-expressada juntamente a uma parceira redox, sendo assim, a imobilização desta proteína em um biosensor é uma estratégia utilizada para verificação da sua atividade em conformação nativa, além de direcionar a uma possível aplicação biotecnológica. A imobilização das CYP's em um eletrodo pode evitar a necessidade de doadores de elétron como NADPH e CPR, além das enzimas parceiras, uma vez que a CYP imobilizada aceita elétrons diretamente do eletrodo (SCHNEIDER; CLARK, 2012). O uso deste método proporciona o estudo de processos bioquímicos de sistemas *in vivo* e *in vitro* e auxilia na descoberta de novos fármacos com finalidades diversas (SUPRUN; SHUMYANTSEVA; ARCHAKOV, 2013).

A técnica de voltametria cíclica possibilita o fornecimento de elétrons a um eletrodo em que a proteína esteja imobilizada, possibilitando assim a P450CLA, em um processo periódico de redução e oxidação, exercer sua atividade na presença de um ligante apropriado. A voltametria cíclica é talvez a mais versátil técnica eletroanalítica para estudos de espécies eletroativas. Esta versatilidade aliada à facilidade de execução, resulta em aplicações em ramos da bioquímica, química inorgânica, química orgânica e eletroquímica. O voltamograma resultante é análogo a um espectro convencional em que a informação é extraída em função da energia varrida (KISSINGER, 1983). Os testes deste trabalho foram realizados em

colaboração com o aluno de doutorado em Química David Tatsuo Atique Sawazaki, do Laboratório de (Bio)sensores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, administrado pelo Prof. Dr. Zeki Naal.

A estratégia utilizada para imobilização da P450CLA no eletrodo foi a adsorção em um filme fino de polímero. Na **Figura 35** é exibido o voltamograma correspondente ao filme fino de polianilina, no caso, polímero utilizado para imobilização da proteína. Assim como na espectrometria, este voltamograma funciona como o valor “branco” da medida, demonstrando que nenhum processo redox acontece no filme depositado quando um potencial é aplicado ao eletrodo. Isso pode ser observado pela ausência de picos na curva quando o potencial é aplicado, denotando nenhum tipo de processo de redução ou oxidação foi desencadeado.

Figura 35: Voltametria Cíclica do Polímero Polianilina depositado sobre um eletrodo. O gráfico da corrente pelo potencial aplicado não identificou nenhum processo redox acontecendo devido à presença apenas do polímero.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Paralelamente, na **Figura 36** está apresentado o voltamograma do polímero depositado ao eletrodo com a adsorção da P450CLA. Quando o eletrodo é adicionado a uma solução tampão, sem a presença do ligante, um pico na região entre - 0,5 e - 0,4 V e outro entre -0,1 e 0,0 V aparecem como indícios de que um processo redox está acontecendo. Uma vez que já testamos o polímero nestes mesmos potenciais e nenhuma reação foi identificada, concluímos que estes picos são advindos do processo de redução da P450CLA. Ao recordarmos o mecanismo de catálise dos citocromos P450, podemos compará-los aos picos obtidos no voltamograma, em que é sugerido pelo primeiro pico como a aceitação do primeiro elétron e o segundo, a aceitação do segundo elétron para completar o mecanismo de ação.

Figura 36: Voltametria Cíclica do Polímero Polianilina com a P450CLA imobilizada. Os ciclos identificaram dois processos de redução ocorrendo. A linha preta representa apenas o ciclo para o polímero e a proteína sem a presença do ligante. O aumento gradativo da concentração de Diclofenaco de Sódio acentua e desloca o pico de redução

Fonte: Elaborada pelo autor.

Este panorama é complementado ao adicionarmos à solução uma concentração de 1 mM de Diclofenaco de Sódio, em que os picos se tornam mais intensos e levemente deslocados. Nota-se que o deslocamento e a intensidade do pico à esquerda aumentam gradativamente ao aumento da concentração de Diclofenaco de Sódio na solução, enquanto o primeiro permanece constante. Este resultado sugere a atuação da proteína sobre o ligante além de apenas interagir a ele, como identificado até aqui pelos métodos espectroscópicos. O paralelo com o mecanismo enzimático dos citocromos P450 esclarece o comportamento da curva obtida, uma vez que indica que o pico à direita possa referir-se à primeira redução do citocromo P450CLA na aceitação de um elétron e ligação com a molécula. Este passo resulta na forma da P450 ferrosa (Fe^{+2}), deixando a molécula reativa para aceitação da molécula de oxigênio. Em seguida, ocorre a aceitação do segundo elétron para a atuação final da enzima sobre o ligante, com quebra da molécula de O_2 e consequente inserção de um átomo de oxigênio no substrato da proteína, no caso, o Diclofenaco de Sódio. O aumento da intensidade do segundo pico com o gradativo aumento da disponibilidade de Diclofenaco de Sódio na solução, aparenta ter origem no aumento das proteínas reduzidas atuando sobre a molécula.

1.4.5 Ensaios de Cristalização da P450CLA

Diversos ensaios de cristalização foram realizados, de acordo com o mencionado na metodologia, a fim de se obter a estrutura cristalográfica da proteína P450CLA. A primeira varredura não resultou em nenhuma condição favorável a cristalização (**Figura 37**) e diversos testes de otimização seguiram-se para o estabelecimento da concentração ótima para os testes posteriores, sendo estabelecida entre 17 mg/ml e 20 mg/ml. Em estudos anteriores da literatura, verifica-se que condições de cristalização para os citocromos P450 foram alcançados apenas em altas concentrações proteicas (LI; POULOS, 2004), situação pela qual a proteína não apresentou agregação, mas tornou-se mais instável.

Figura 37: Ensaios de Cristalização da P450CLA na ausência de ligantes. Os primeiros ensaios apresentaram apenas precipitados amorfos que não chegaram a formar cristais da proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A alta flexibilidade inerente aos citocromos P450 exigiu que os testes fossem realizados em presença de um ligante que tornasse a proteína mais estável para favorecer o surgimento do cristal. Devido ao conhecido papel de interação das P450 com o Imidazol e evidências relatadas na literatura de condições cristalizantes na presença desta molécula, o inibidor foi escolhido para as primeiras varreduras com os kits comerciais. Os resultados iniciais foram promissores e diferentes dos atingidos para a proteína livre de ligantes, com um efetivo agrupamento protéico, entretanto, os resultados não apresentaram características cristalinas.

A partir do kit *Index 1* e 2 diversas condições nesta situação foram obtidas e algumas delas foram escolhidas para otimização com alteração de condições químicas, como mudança de pH, concentração de sal, componente tamponante, em soluções preparadas especificamente para os testes, sem a utilização dos kits. Variações de influências físicas também foram testadas, com ensaios em câmara fria a temperatura controlada de 4° C, alteração do volume da gota e do poço e adição de óleo para controle da velocidade de difusão. Estratégias de mudanças na clonagem e expressão da proteína também foram empregadas, com a troca do vetor de expressão, retirada da cauda de histidina com seguida repetição dos testes de variações químicas e físicas utilizados anteriormente, contudo, sem gerar nenhum efeito no resultado inicial obtido. As poucas condições (**Figura 38**) que resultaram em

aparente estrutura cristalina, foram submetidas à experimento de Difração de Raio-X, porém, nenhuma delas produziram resultados satisfatórios ou apenas comprovou-se que não eram cristalinas na realidade.

Figura 38: Ensaio de Cristalização da P450CLA complexado ao Imidazol. Os testes com Imidazol resultaram em um aparente precipitado cristalino e de pequenos cristais, no entanto, nenhuma das condições produziu um cristal proteico real.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, uma vez que as mudanças escolhidas juntamente ao Imidazol não eram alteradas, com a realização paralela dos testes espectroscópicos de interação proteína-ligante, observou-se que o Diclofenaco de Sódio produziu um efeito de estabilização melhor em relação a molécula de Imidazol. Desta forma, optou-se por implementar novamente todos os testes antes realizados para o Imidazol, entretanto, utilizando a molécula de Diclofenaco de Sódio. As modificações das condições foram evidentes, embora o Diclofenaco de Sódio também produzisse cristais, dificultando o reconhecimento entre o cristal do ligante e um possível cristal da proteína. Apesar disso, algumas condições produziram condições cristalinas (**Figura 39**) que chegaram a ser testadas em experimento de Difração de Raio-X. Os resultados foram de baixa resolução, indicando, entretanto, que condições cristalinas foram obtidas.

Figura 39: Ensaio de Cristalização da P450CLA complexada ao Diclofenaco de Sódio. Um cristal protéico foi obtido nestas condições, entretanto, o cristal difratou em baixa resolução, inviabilizando a resolução da estrutura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No atual estágio do estudo, será necessário repetir todos os passos de otimização afim de se obter um cristal com melhor padrão de difração para a sequência da análise dos resultados e consequente proposta de um modelo estrutural.

2.0 PEPTÍDEOS ATIVOS NA MEMBRANA

2.1 Introdução

Peptídeos são moléculas que desempenham importantes funções celulares com participação em vias de sinalização, transporte de fármacos, formação de sistemas moleculares complexos em membranas lipídicas, na formação de poros e/ou desestabilização do empacotamento lipídico (SAL-MAN; OREN; SHAI, 2002). Neste último caso, existem peptídeos que atuam sobre a membrana lipídica (MAP's - *membrane-active peptides*), representados por um enorme grupo de peptídeos com atividades antimicrobianas e tóxicas que agem no sistema de defesa de diversos organismos, abrangendo plantas e humanos. Estes peptídeos são capazes de lisar uma variedade de microrganismos e tipos específicos de células, incluindo bactérias, fungos e células cancerígenas. Em sua maioria, são peptídeos anfipáticos e carregados positivamente (SAL-MAN; OREN; SHAI, 2002).

MAP's são conhecidos por induzirem poros transmembrânicos que podem ser originados tanto por peptídeos amilóides ou antimicrobianos (LEE; CHEN; HUANG, 2004). Embora seus mecanismos de ação sejam diferentes, muitos desses peptídeos interagem e rompem a membrana carregada negativamente da bactéria, resultando em uma desorganização generalizada do empacotamento lipídico (PLANK; ZAUNER; WAGNER, 1998). Apesar das várias similaridades na estrutura destes peptídeos, muitos deles são ativos predominantemente em bactérias, alguns tanto em bactérias quanto fungos, enquanto outros apenas em células de mamíferos (SAL-MAN; OREN; SHAI, 2002).

A falta de conhecimento sobre como atuam os peptídeos MAP's é devida aos complexos mecanismos moleculares envolvidos, fortemente dependentes da composição lipídica das membranas estudadas. Alguns trabalhos sugerem que os diversos MAP's podem agir de forma análoga quando inseridos em um ambiente de membranas lipídicas. Desta forma, investigar os mecanismos de desorganização da

membrana pelos mais diversos tipos de peptídeos nas mais diferentes constituições de membranas lipídicas é essencial para encontrar um fator molecular em comum que potencialmente direciona a atividade dos MAP's. Decifrar os mecanismos de ação destes peptídeos em membranas celulares é, portanto, crucial para o desenvolvimento de terapias seguras e efetivas contra diversas doenças como diabetes do tipo II, câncer, Alzheimer, Parkinson e infecções virais (SUN; FORSMAN; WOODWARD, 2016).

Apesar das muitas características similares que os peptídeos MAP's possuem, devido às diversas funções que desempenham, podemos classificá-los em vários grupos e, a seguir, descrevemos os mais importantes.

2.1.1 Peptídeos Antimicrobianos (AMP)

Peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial peptides* - AMP) são pequenas proteínas produzidas por muitos tecidos e tipos celulares, em praticamente todos os organismos vivos, como invertebrados, plantas e animais. Em humanos, AMP's constituem uma parte integral do sistema imune e exibem uma ampla atividade contra bactérias, fungos, vírus e até mesmo contra células cancerígenas (GHOSH; HALDAR, 2015). De fato, peptídeos antimicrobianos são vistos como potentes antibióticos e fármacos anticâncer. Diferente dos antibióticos tradicionais, que agem direcionados a proteínas transmembrânicas específicas, peptídeos antimicrobianos causam a morte da bactéria através de uma perturbação não específica na membrana celular (SUN; FORSMAN; WOODWARD, 2016). Os peptídeos agem direcionados a membrana por possuírem características físicas que garantem uma afinidade maior pelos lipídios constituintes da bicamada em relação ao ambiente aquoso. Sua adsorção é determinada por interações hidrofóbicas e eletrostáticas que induzem mudanças estruturais tanto no peptídeo, quanto na membrana lipídica (SANI; SEPAROVIC, 2016).

Acredita-se que muitos peptídeos matam microrganismos por mecanismos que não são mediados por receptores. De forma geral, peptídeos antimicrobianos possuem, como principais características, carga positiva e uma significativa proporção de resíduos hidrofóbicos, sendo assim solúveis em água e capazes de se aproximarem de células livres em solução. Essas peculiaridades conferem uma estrutura anfifílica, o que explica a alta afinidade por bicamadas lipídicas. Na presença da membrana, as forças que dirigem a ligação são interações hidrofóbicas entre os aminoácidos não-polares e o núcleo hidrofóbico da membrana, e as interações eletrostáticas entre as cargas positivas do peptídeo e as cargas negativas dos lipídios. A característica anfifílica do peptídeo favorece este tipo de ligação na superfície da bicamada, preferência esta que pode ser predita por meio da sequência primária do peptídeo ou através da estrutura secundária, que tende a ser hidrofóbica de um lado e hidrofílica de outro (STRANDBERG; ULRICH, 2004).

Por tais razões, a ligação com a membrana pode ser afetada por sua composição lipídica. De fato, esta é uma situação esperada, uma vez que as cargas positivas do peptídeo preferirão se ligarem a lipídios carregados negativamente, o que é comum em membranas bacterianas, mas não nas eucarióticas. A superfície externa de bactérias Gram-negativas contém lipopolissacarídeos e as de bactérias Gram-positivas contém ácido polissacarídeo, que conferem o caráter negativo de cargas na superfície de ambos os tipos de bactérias (SHAI, 2002). Além disso, a face interior das membranas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são compostas por fosfolipídios carregados negativamente, diferente dos fosfolipídios que compõem as células eucarióticas, que são distribuídos de forma assimétrica. A face exterior destas membranas é composta predominantemente de fosfatidilcolina zwitteriônica (PC) e esfingomielina, enquanto que a face interna é composta de fosfatidilserinas carregadas negativamente. Desta forma, as forças hidrofóbicas que direcionam estas interações normalmente são muito fracas para provocar uma efetiva associação entre os peptídeos e os fosfolipídios zwitteriônicos (SHAI, 2002).

Portanto, as cargas positivas, uma característica preservada na maioria dos peptídeos antimicrobianos, permitem uma interação preferencial com a superfície

externa das membranas negativas das bactérias. Entretanto, esta forma de direcionamento não deve ser a única explicação para a seletividade dos AMP's, uma vez que a superfície externa de células epiteliais também possui carga negativa, sendo passíveis de interação com os peptídeos antimicrobianos, além de diversas outras toxinas não discriminatórias que apresentam altos níveis de carga líquida positiva (SHAI, 2002).

2.1.2 Peptídeos amilóides

Diversas proteínas ou peptídeos podem adotar um estado conformacional nativo falho. Geralmente esta situação é denominada “enovelamento defeituoso” e traz como consequência a formação de fibras amilóides que estão diretamente relacionadas a diversas doenças neurodegenerativas (MERLINI; BELLOTTI, 2003). Polipeptídeos defeituosos geram agregados protéicos tóxicos que se depositam de forma anormal nos tecidos, formando placas protéicas fibrosas que compartilham de propriedades físicas e estruturais semelhantes (MERLINI; BELLOTTI, 2003). Existem pelo menos cerca de 50 doenças com os mais diversos sintomas que são associadas a proteínas e peptídeos que normalmente são solúveis e funcionais, mas que se tornam agregados irreversíveis por falha no processo de enovelamento, compondo as fibras amilóides (KNOWLES; VENDRUSCOLO; DOBSON, 2014).

O termo amilóide foi proposto em 1854 pelo físico alemão Rudolph Virchow (SIPE; COHEN, 2000). Virchow se utilizou de iodo para marcar corpos amiláceos do tecido cerebral que apresentavam uma aparência macroscópica anormal. A aparência macroscópica do tecido cerebral era similar ao descrito para outros tecidos como os de fígado com alteração no tamanho ou esponjoso. Quando Virchow notou que os corpos amiláceos foram marcados de azul quando tratados com iodo e, subsequentemente, de violeta quando adicionado ácido sulfúrico, ele concluiu que a substância anormal no tecido era celulose e por isso denominou-a amilóide, palavra derivada do latim *amylum*. Naquele período ainda não havia uma diferenciação clara entre amido e celulose, por esta razão, apenas em 1859 Friedreich e Kekule

demonstraram a presença de proteína na massa dos amilóides, com uma aparente ausência de carboidratos (SIPE; COHEN, 2000).

O peptídeo amilóide é uma classe de proteínas caracterizada por sua habilidade de formar estruturas ricas e estáveis de folhas- β , conhecidas como fibras amilóides. Por conseguinte, são chamados de amilóides- β ou apenas A β . Proteínas amilóides agem em muitos processos biológicos, incluindo a formação de biofilmes e armazenamento de hormônios (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013). As proteínas amilóides não possuem uma estrutura primária (sequência de aminoácidos) homóloga entre si, mas dividem características estruturais semelhantes. Especificamente, estas proteínas são ricas em estruturas de folhas- β com o conjunto de peptídeos orientado perpendicularmente ao eixo da fibra (HAGAN; AZIMOV; AZIMOVA, 2004). As fibras são formadas por ligações de hidrogênio entre um grupo amida e um grupo carbonila, ao invés de interações específicas entre as cadeias laterais, o que normalmente dita a estrutura das proteínas globulares ativas (MERLINI; BELLOTTI, 2003).

Em geral, as fibras amilóides possuem de 5 a 15 nm de largura, não possuem ramificações e possuem microns de comprimento. As primeiras medidas das fibras por difração de raio-X revelaram que eram compostas de estruturas “ β cruzadas” (*cross- β*) em que as fitas constituintes das folhas- β se alinhavam perpendicularmente à direção de crescimento da fibra e as ligações de hidrogênio entre as fitas- β eram aproximadamente paralelas à direção de crescimento (TYCKO, 2015).

Diversos modelos mostram que a estrutura β cruzada ideal pode envolver tanto folhas- β paralelas quanto antiparalelas (TYCKO, 2015). Além disto, alguns exemplos demonstram camadas duplas, que podem existir em fibras formadas por peptídeos ou proteínas com dois segmentos de folhas- β separadas. Uma única fibra pode conter várias subunidades de peptídeos ou proteínas em estrutura β -cruzada, com uma ou mais camadas de folhas- β em cada subunidade. O espaçamento entre as fitas- β em uma folha- β é sempre de 0,46 a 0,48 nm, o que significa que um micron de

comprimento de uma fibra amilóide contém milhares de moléculas de proteínas ou peptídeos (TYCKO, 2015).

A fim de assumir uma estrutura conformacional fibrilar, todas as proteínas ou peptídeos amilóides sofrem uma profunda modificação tridimensional influenciada por quatro mecanismos diferentes que afetam a estrutura terciária da proteína. As proteínas que sofrem estes processos foram classificadas em quatro categorias: a) proteínas que sofrem mutação genética para tornarem-se amiloidogênicas, b) proteínas que possuem a tendência natural de se agregarem em fibras amilóides, c) proteínas que necessitam de modificações pós-traducionais a fim de gerar fragmentos amiloidogênicos, e d) proteínas que se tornam amiloidogênicas ao entrarem em contato com proteínas homólogas que já estejam em conformação amilóide (LORENZI et al., 2004).

Os peptídeos amilóides geralmente dividem as mesmas características físicas e estruturais com peptídeos que possuem atividade na membrana, como peptídeos antimicrobianos ou peptídeos célula-penetrantes. Geralmente estes peptídeos apresentam características de anfipaticidade, de serem facilmente solúveis, tanto em água quanto em ambientes com membrana e de serem pequenos, com menos de 50 aminoácidos. Tipicamente, não são estruturados em solução, mas ao se associarem com membranas, se enovelam em estruturas secundárias α -hélice ou folhas- β , geralmente anfipáticas por natureza. Esta característica permite aos peptídeos se ligarem à superfície da membrana, intercalando-se entre as cabeças do grupo lipídico (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

A informação estrutural a respeito de oligômeros amilóides é importante para um melhor entendimento do seu papel patológico e para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que bloqueiem esses oligômeros de se propagarem célula a célula, dissociando suas estruturas secundárias tóxicas. (BREYDO et al., 2016). Entretanto, este tipo de estudo enfrenta dificuldades devido à instabilidade estrutural

dos oligômeros, o que poderia ser auxiliado com a proposição de modelos que fornecessem informações suficientes a respeito da situação real.

2.1.3 Peptídeos anfipáticos modelo

Peptídeos anfipáticos são uma classe de moléculas que combinam características estruturais de surfactantes anfifílicos com funções bioativas de um peptídeo. Estes peptídeos são constituídos de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos alternados, com alta tendência a adotar uma estrutura em folha- β . Ao utilizar um motivo padrão do tipo que alterna resíduos polares e não-polares (XYXY, em que X é um resíduo polar e Y é um resíduo apolar) as cadeias laterais hidrofílicas e hidrofóbicas ficam segregadas a faces opostas, o que é estruturalmente favorável a estruturas em folha- β . Este tipo de laminação permite ainda que duas folhas possam se juntar devido ao arranjo sofrido pelas cadeias laterais. (LEE; BOWEMAN; NILSSON, 2013).

Quando duas fitas ou mais se agregam, o padrão de alternância entre resíduos polares e apolares traz como consequência uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. Peptídeos nessa conformação podem ser estruturalmente autocomplementares em um lado da folha, ou seja, podem formar interações intermoleculares eletrostáticas complementares, do tipo positivas e negativas, além de ligações de hidrogênio. Do outro lado, as interações hidrofóbicas dirigem a estrutura, de forma a proteger os grupos hidrofóbicos das cadeias laterais do solvente (ZHANG et al., 1994). Trabalhos descritos na literatura demonstraram que é possível criar um sistema fibroso com esse arranjo, sugerindo que este fenômeno pode ser utilizado como modelo para estudo de peptídeos insolúveis, como peptídeos amilóides encontrados em doenças neurodegenerativas (ULIJN; SMITH, 2008).

Além disso, a característica anfipática de muitos peptídeos antimicrobianos determina a espontaneidade de se ligarem às membranas para formação de poros transmembrânicos quando em determinadas concentrações. Os três modelos de poro

tipicamente associados à peptídeos anfipáticos antimicrobianos são: barril, carpete e poro-toroidal, sendo essa conformação do peptídeo ainda dependente da presença ou não de membranas, da composição da bicamada lipídica, da concentração de peptídeo, temperatura e pH (FILLION; VOYER; AUGER, 2014). Uma vez que um único peptídeo é incapaz de formar um poro em uma membrana lipídica, a tendência a se auto-associar é primordial para a atividade do peptídeo. De encontro com a membrana, os peptídeos podem se agregar ou então, ao atingir uma concentração crítica, inserir-se nela. As interações eletrostáticas geralmente proporcionam a interação superficial, enquanto que as interações hidrofóbicas dirigem os peptídeos para o interior do núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica (SANI; SEPAROVIC, 2016).

Peptídeos e proteínas que possuem essa característica têm despertado um enorme interesse, uma vez que a compatibilidade biológica destes sistemas, incluindo aqueles com arquitetura estruturalmente complexa, são mais vantajosas. Além disso, o desenvolvimento de fármacos baseados em peptídeos com estruturas em α -hélice é frequentemente limitado devido à alta liberdade conformacional de fragmentos curtos e com baixa estabilidade proteolítica *in vivo*. Para superar estes desafios, a construção de peptídeos bioativos com estrutura em folha- β é uma alternativa valiosa para investigar efetivamente estruturas, preferências conformacionais e propriedades físico-químicas destes sistemas (CABRELE et al., 2014).

2.2 OBJETIVOS GERAIS E JUSTIFICATIVA

O objetivo geral deste trabalho foi a identificação de parâmetros espectrais básicos de Dicroísmo Circular Orientado (*Oriented Circular Dichroism* - OCD) através do estudo de peptídeos anfipáticos modelo em estrutura de folha- β , que demonstram preferencialmente orientação paralela ou perpendicular (transmembrânica) na superfície de bicamadas lipídicas.

O Dicroísmo Circular Orientado é uma poderosa técnica que foi aplicada muitas vezes a peptídeos com estruturas em α -hélice (BÜRCK et al., 2008), existindo assim uma literatura limitada de trabalhos que analisaram estruturas em folha- β . Os tensores dos espectros de Dicroísmo Circular (CD) de estruturas em folha- β são muito mais complexos que os de α -hélice, uma vez que existem diversas formas em que estas estruturas podem se apresentar, como paralela, antiparalela, torcida, β cruzada e até mesmo β -hélice. Apenas alguns peptídeos antimicrobianos cíclicos em folha- β foram estudados utilizando OCD (BÜRCK et al., 2016). Porém, a atribuição orientacional retirada dos espectros destes trabalhos foi feita sem nenhuma base teórica profunda, apenas através de conclusões empíricas ou que, em vez disso, representavam peptídeos agregados sem qualquer orientação (BÜRCK et al., 2016).

A técnica de OCD se mostrou importante também em outros testes, como na identificação da conversão induzida por lipídio de peptídeos em α -hélice para estruturas em folha- β e na sua consequente agregação em fibras amilóides. O método também foi utilizado para estudos com peptídeos intencionalmente desenhados para terem propriedades anfifílicas e preditos para adotarem uma estrutura em folha- β . No entanto, estes ligaram-se apenas em baixas proporções, quando pela técnica foi constatado que em altas concentrações o peptídeo formava agregados do tipo amilóide (BÜRCK et al., 2016). A conformação apropriada da cadeia polipeptídica é crucial para sua função biológica, sendo assim, investigações estruturais de sequências padrão é uma estratégia promissora para se obter análogos que exibam propriedades de interesse medicinal e químico (CABRELE et al., 2014).

Além disso, para um completo panorama a respeito dos peptídeos modelo escolhidos, também foram objetivos específicos: caracterização estrutural, padrão de agregação na presença de membranas lipídicas, avaliação de possível atividade em membrana, dependência da atividade devido ao tamanho da cadeia polipeptídica anfifílica e estudo de perturbação da bicamada lipídica através de técnicas biofísicas adicionais.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Descrevemos a metodologia deste trabalho partindo dos critérios teóricos para escolha dos peptídeos anfipáticos modelo, síntese, obtenção e preparação de amostras, bem como os fundamentos e parâmetros das técnicas empregadas para a posterior análise dos dados obtidos.

2.3.1 Materiais utilizados

Todos os materiais aqui descritos foram utilizados para os passos dessa metodologia. Os aminoácidos protegidos para a síntese foram obtidos de Merck Biosciences (Darmstadt, Alemanha) e Iris Biotech (Marktretwitz, Alemanha). Os solventes para a síntese foram obtidos de Merck (Darmstadt, Alemanha) e Biosolve (Valkenswaard, Holanda), enquanto que os solventes para purificação em HPLC foram obtidos de Fischer Scientific (Geel, Bélgica).

Os lipídios: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG), 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina (POPC), 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) e 1-miristoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato (LMPC) foram todos obtidos de Avanti Polar *Lipids* (Alabaster, EUA). As sondas fluorescentes ácido 8-amino-naftaleno-1,3,6-trissulfônico (ANTS) e p-xileno-bis(N-piridina bromida) (DPX) foram obtidas da Invitrogen Sondas Moleculares (Karlsruhe, Alemanha).

2.3.2 Escolha do peptídeo anfipático modelo

Polímeros de aminoácidos alternados de Lisina (K) e Leucina (L) foram os peptídeos utilizados como modelo deste estudo. A escolha baseou-se no trabalho teórico de 1993 realizado por Woody, em que cálculos determinaram as componentes tensoriais do espectro de Dicroísmo Circular de estruturas planas infinitas de folhas- β

paralelas e antiparalelas. Os cálculos foram feitos a partir de peptídeos de poli(Leucina-Lisina), medidos experimentalmente pelo mesmo grupo em um trabalho de 1987 (WOODY, 1987). No entanto, polímeros de Leucina (L) e Lisina (K) apresentaram estrutura em folha- β apenas em condições de força iônica moderada. Quando colocados na presença de modelos de membrana, os peptídeos converteram sua estrutura em α -hélice, situação indesejada para o objetivo deste estudo (WOODY, 1987).

Diversos trabalhos na literatura relatam que polipeptídeos formados de aminoácidos alternantes, como os de poli-Valina-Lisina, poli-Leucina-Lisina, poli-Glutamina-Alanina, além de alguns oligopeptídeos como (Val-Glu-Val-Lis) e (Val-Glu-Val-Orn), preferencialmente adquirem estruturas em folha- β em soluções na presença de sais ou em diferentes pHs (ZHANG et al., 1994). Contudo, peptídeos com composição peptídica similar, mas que não alternavam a sequência de propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas de seus aminoácidos, não formaram folhas- β estáveis. Ao invés disso, os peptídeos adquiriram estruturas randômicas ou originaram α -hélices em vez de estrutura em folha- β (ZHANG et al., 1994).

De fato, mudanças nas posições destes aminoácidos podem influenciar na estabilidade e tipo de estrutura. Por esta razão, optou-se ao se planejar os peptídeos modelo por iniciar com um aminoácido de característica hidrofílica e terminar com um aminoácido hidrofóbico, a fim de preferencialmente se obter uma estrutura em fita- β pregueada com faces distintas, em que a face superior hidrofílica se voltasse para o solvente e a face inferior hidrofóbica interagisse com a bicamada lipídica, sem sofrer a interconversão para uma estrutura em hélice na presença dos lipídios.

2.3.3 Síntese dos peptídeos

Foram sintetizados 8 peptídeos de poli-lisina-leucina (KL)_n de diferentes tamanhos. Iniciou-se com um peptídeo de 6 resíduos aminoácidos, acrescentando-se 2 aminoácidos entre eles, de forma que o último peptídeo fosse constituído de 20

resíduos (**Tabela 2**). Respeitou-se a alternância das propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo as nomenclaturas utilizadas e as sequências primárias listadas na tabela abaixo:

Tabela 2 – Nomenclatura utilizada para identificação dos peptídeos, suas sequências, peso molecular e cargas.

Nomenclatura	Sequência	Massa molecular [g/mol]	Cargas
(KL)₆	KLKLKL-NH ₂	886,86324	+4
(KL)₈	KLKLKLKL-NH ₂	1164,6539	+5
(KL)₁₀	KLKLKLKLKL-NH ₂	1442,4446	+6
(KL)₁₂	KLKLKLKLKLKL-NH ₂	1720,2352	+7
(KL)₁₄	KLKLKLKLKLKLKL-NH ₂	1998,0260	+8
(KL)₁₆	KLKLKLKLKLKLKLKL-NH ₂	2275,8166	+9
(KL)₁₈	KLKLKLKLKLKLKLKLKL-NH ₂	2553,6073	+10
(KL)₂₀	KLKLKLKLKLKLKLKLKLKL-NH ₂	2831,3980	+11

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os peptídeos foram produzidos no Sintetizador de Peptídeos Múltiplo e Automatizado Syro II (MultiSyntech, Witten, Alemanha) usando protocolos padrão de síntese de peptídeos em fase sólida, conforme estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonil) (FIELDS; NOBLE, 1990). Os peptídeos obtidos da síntese foram purificados utilizando cromatografia de alta pressão (HPLC) usando coluna de fase reversa C₁₈ em gradientes de água/acetonitrila, cada um contendo 5 mM de HCl como agente pareante. A identidade dos peptídeos foi confirmada por sistema LC-MS equipado com um LC 1100 Series da Agilent (Santa Clara, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa ESI micro-TOF da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha).

2.3.4 Dicroísmo Circular (CD)

Os procedimentos descritos abaixo são válidos para todas as medidas realizadas por Dicroísmo Circular com membranas modelo.

Alíquotas adequadas dos estoques de DMPC, DMPG, POPC, POPG e LMPC em uma mistura de clorofórmio e metanol, 50/50 (v/v), em proporção de 1:2 (lipídios não-carregados para lipídios carregados negativamente), foram adicionadas em frascos de vidros e co-solubilizadas em volumes adequados da solução estoque de cada peptídeo em clorofórmio e metanol, 50/50 (v/v), e água 10% (m/v). Estas amostras foram submetidas a um fluxo suave de nitrogênio para remoção de solventes orgânicos até a consequente formação de filme fino nas paredes dos frascos. Em seguida, para a completa remoção de traços dos solventes, os frascos foram deixados sob vácuo por 3 horas e meia. O filme formado foi então hidratado pela adição de quantidade pertinente de tampão 10 mM de fosfato de potássio, pH 7,0. Imediatamente os volumes foram homogeneizados submetendo-se os frascos cuidadosamente ao vortex por 5 minutos e posteriormente, a 10 ciclos de congelamento e descongelamento (*freeze-thaw*), seguidos por vortex de 1 minuto a cada ciclo. Depois, as vesículas multilamelares (MLV, *multilamellar vesicles*) deram origem às vesículas unilamelares pequenas (SUV, *small unilamellar vesicles*) ao serem sonicadas por 16 minutos em banho ultrassônico à temperatura de 30°C (UTR 200, Hielscher, Alemanha).

Para as amostras contendo apenas peptídeos, volumes adequados das soluções estoques de cada peptídeo diluído em água foram solubilizados a uma concentração final de 0,1mg/ml em: água, pH 4,5; tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0; solução 50/50 (v/v) de tampão fosfato de potássio 10 mM e TFE; tampão MES 10 mM, pH 6,5 e tampão HEPES, pH 7,5.

Os estudos por dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 (Gross-Umstadt, Alemanha) com controle de temperatura. As amostras foram adicionadas a uma cubeta de quartzo (Suprasil, Hellma, Müllheim, Alemanha) de caminho óptico de 1 mm e os espectros obtidos pela média de três acumulações entre os comprimentos de onda de 185 a 260 nm em intervalos de 0,1 nm. A velocidade de varredura foi de 10 nm/min, com largura de banda de 1 nm, com tempo de resposta de 8 s para cada amostra e linha de base correspondente sem a presença dos peptídeos. As temperaturas utilizadas foram de 25°C para experimentos

apenas com os peptídeos em solução tamponante e de 30°C de peptídeos em suspensão de vesículas, ou seja, acima da temperatura de transição de fase dos lipídios utilizados.

Os dados obtidos foram analisados através de *software* próprio CDCalc, programado pelo engenheiro Siegmur Roth, e pelo programa *Spectra Analysis* (Jasco, version 1.50.00 [Build 2]). Todos os espectros foram zerados no comprimento de onda de 260 nm, tiveram as contribuições vindas do solvente subtraídas e receberam correções de *Smoothing*. As unidades de cada espectro foram convertidas para elipticidade molar média por resíduo $[\theta]_{\text{MRE}}$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), de acordo com a equação 1 abaixo:

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 0,1 \cdot MM}{n-1} \cdot c \cdot l \quad (1)$$

em que θ é a elipticidade coletada, MM é a massa molecular em daltons da proteína, n o número de resíduos, c a concentração utilizada na medida e l é o caminho óptico em cm da cubeta.

Após a finalização do tratamento de dados, os espectros foram submetidos ao *software* de bioinformática BestSel (*Best Structure Selection*) para análise da estrutura secundária de peptídeos e proteínas com base em espectros de dicroísmo circular (MICSONAI et al., 2015).

2.3.5 Dicroísmo Circular Orientado (OCD)

Inicialmente, descreveremos algumas considerações a respeito da técnica de Dicroísmo Circular Orientado, a fim de deixar claro posteriormente a preparação das amostras e análise dos dados.

2.3.5.1 Considerações teóricas

Vários métodos são utilizados para determinar características estruturais de proteínas e peptídeos e suas interações em membrana, como Ressonância Magnética Nuclear de estado sólido (ssNMR), Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Dicroísmo Circular (CD). Estes experimentos são convenientemente realizados sob condições quase nativas que usam amostras de lipídios macroscopicamente orientadas, produzindo parâmetros anisotrópicos dos quais o comportamento estrutural de peptídeos e lipídios podem ser deduzidos. Contudo, enquanto técnicas como ssNMR e EPR requerem marcadores isótopos ou espécies paramagnéticas, OCD e FTIR não necessitam de nenhuma modificação e são cômodos para uma análise direta da atividade de peptídeos em membrana, por exemplo (BÜRCK et al., 2016).

Apesar destes dois métodos não oferecerem resolução atômica, eles são perfeitamente complementares ao ssNMR. Quando utilizados previamente nas mesmas amostras orientadas, rapidamente diferentes condições experimentais podem ser varridas antes de um estudo de ressonância magnética mais elaborado. Em favor do uso de técnicas como OCD temos a necessidade de pouco material (tipicamente de 3 a 10 µg de peptídeo por amostra), a dispensabilidade do uso de marcadores, proporcionando medidas em estado selvagem, e ainda demonstra se marcadores de NMR, EPR ou outras mutações causam qualquer perturbação estrutural, já que a função biológica de tais análogos apenas é preservada quando a estrutura secundária e o caráter anfipático do peptídeo permanecem (BÜRCK et al., 2016).

Análises feitas por OCD foram inicialmente descritas por Olah e Huang em trabalho de 1990 (WU; OLAH; HUANG, 1990). OCD é uma técnica valiosa para se obter uma visão global da conformação, orientação e comportamento de agregação de biopolímeros ativos na membrana incorporados em modelos de bicamadas lipídicas anisotrópicas (BÜRCK et al., 2016). Esta abordagem tem sido usada principalmente para peptídeos com estruturas em α -hélice, analisando os resultados

pela teoria de Moffit (BÜRCK et al., 2016). Ela prediz que os momentos de dipolo (μ) das transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ do esqueleto de ligações amida em polipeptídeos helicoidais são polarizados paralelamente, ou perpendicularmente ao eixo da hélice. Esta transição divide os níveis de energia em 3 componentes, cada uma com seu momento de dipolo correspondente. A interação do vetor campo elétrico (E) da luz circularmente polarizada com estas transições resulta em um espectro de OCD característico de peptídeos em hélice ligados a membrana, cujo formato da linha reflete o ângulo entre o eixo da hélice e o vetor normal (N) da bicamada (BÜRCK et al., 2016).

Uma dessas transições é polarizada paralelamente ao eixo da hélice produz uma banda Gaussiana negativa por volta de 208 nm, enquanto as outras duas possuem polarização perpendicular ao eixo da hélice e a posição de suas bandas no espectro de CD dependem do ângulo entre o eixo da hélice e o vetor campo elétrico (E) do feixe de luz circularmente polarizado, que tem direção perpendicular à sua propagação (k). Para ângulos de 0° e 90°, as componentes perpendiculares produzirão linhas similares a uma Gaussiana em bandas positivas próximas de 190 nm e por serem degeneradas, levam a um deslocamento para o azul. Além disso, a transição $n \rightarrow \pi^*$ que resulta em uma banda negativa por volta de 220 nm mostrará uma redução de sua intensidade e um leve deslocamento para o vermelho quando houver mudanças do ângulo no intervalo entre 0° e 90°. Desta forma, se a hélice estiver paralela à superfície da membrana, o vetor campo elétrico irá interagir fortemente com a transição paralelo-polarizada e a banda negativa de CD por volta de 208 nm será mais intensa. Por outro, se a hélice estiver inserida totalmente na membrana, em estado transmembrânico e alinhada perpendicularmente a E, as interações entre o vetor campo elétrico e o momento de dipolo paralelo serão reduzidas e a banda de 208 nm desaparece (BÜRCK et al., 2016).

Portanto, as linhas do espectro de OCD de peptídeos helicoidais ligados a uma membrana orientada podem revelar seu ângulo de inclinação em relação ao vetor normal (N) da bicamada, dado que a intensidade e a posição das diferentes bandas do espectro de OCD dependem de sua orientação molecular. A banda por volta de

208 nm é a que representa com maior destaque a orientação de hélices em membrana, sendo utilizada como parâmetro de classificação de cada estado da seguinte forma: i) um alinhamento paralelo da hélice em relação a membrana é chamado de *Surface State* (*S-state*), e a banda em 208 nm é intensa e definida; ii) em um alinhamento da hélice inclinada obliquamente com relação a normal (N) da bicamada, temos o estado chamado *Tilted State* (*T-state*), e a banda em 208 nm é de fraca intensidade e pouco definida; iii) para uma hélice inserida totalmente na membrana, ou seja, com orientação transmembrânica, a elipticidade em 208 nm diminui drasticamente, aproximando-se do zero devido a diminuição das interações entre o vetor campo elétrico e o momento de dipolo, sendo assim conhecido como *Transmembrane State* (*I-state*) (BÜRCK et al., 2016).

2.3.5.2 OCD em peptídeos de folha- β

Como descrito na seção anterior, vimos a importância da intensidade das bandas em determinadas posições para se classificar a orientação de peptídeos helicoidais em relação à membrana. Através da mesma estratégia, em um trabalho teórico, Woody (1993) calculou as componentes de tensores para folhas- β planas infinitas paralelas e antiparalelas. Através desta abordagem foi predito qual a magnitude dos deslocamentos e mudanças na intensidade dos comprimentos de onda de folha- β em relação às suas bandas negativas e positivas características no espectro de CD e OCD. Sabemos que proteínas e peptídeos com estruturas do tipo β bem definidas apresentam uma banda negativa em 218 nm e uma banda positiva próximo do comprimento de onda 195 nm em seu espectro de CD e de OCD (GREENFIELD, 2007).

Se observarmos a **Figura 40**, ao analisarmos a intensidade relativa do espectro de CD entre a banda negativa e a banda positiva, tanto no caso experimental quanto no caso teórico, a intensidade da banda negativa é praticamente a mesma da intensidade da banda positiva, resultando em um fator de proporção entre as duas de praticamente 1,0. Entretanto, ao analisarmos o caso de espectro de OCD, verificamos que acontece uma mudança ao compararmos a relação entre as intensidades da

banda positiva e negativa. Assim como para o caso de hélices orientadas, nota-se uma diminuição da banda negativa e acentuação da banda positiva, resultando em uma razão 4,0 entre as intensidades, tanto no caso teórico, quanto no experimental.

Figura 40: Espectro de CD (A) e OCD (B) do trabalho de Woody (1993). Segundo seus cálculos de previsão, no espectro de CD a razão $\theta_{200}/\theta_{218} \sim 1$, enquanto para OCD $\theta_{200}/\theta_{218} \sim 4$, evidenciando o aumento da banda positiva em relação à negativa.

Fonte: Adaptação de (CRAVO, 2017) a partir de WOODY, R.W., 1993, p. 535).

Dessa forma, Woody concluiu que, assim como no caso da orientação de hélices, folhas- β alinhadas à superfície da bicamada (*S-state*) terão um espectro de OCD com a banda negativa mais intensa que a banda positiva. Por outro lado, quanto mais o peptídeo em folha- β se inserir na membrana, a elipticidade da banda negativa tenderá a diminuir até seu aparente desaparecimento, enquanto a acentuação da banda positiva tenderá a aumentar. Maiores detalhes a respeito dos cálculos dos tensores que comandam estas mudanças podem ser acessados no trabalho publicado por Woody (1993).

2.3.5.3 Preparação das amostras e Medidas

Uma quantidade apropriada de solução de peptídeo mais lipídios foi depositada em um vidro circular de quartzo de 20 mm de diâmetro (Suprasil QS, Hellma Optik, Jena, Alemanha), que serviu de célula transparente para as medidas de OCD. Antes do uso, os vidros foram limpos em ácido nítrico concentrado e lavados

completamente, repetidamente com água destilada e, por fim, etanol. Depois, os vidros foram secos em estufa a 60° durante a noite.

As soluções estoques de lipídios liofilizados de DMPC, DMPG, POPG, POPC e LMPC foram preparadas em concentrações adequadas em uma mistura 50/50 (v/v) de clorofórmio e metanol. Os estoques de cada peptídeo foram preparados em mistura idêntica de solventes, no entanto, com adição de 10% de água primeiro para facilitar a solubilização. Logo após, alíquotas adequadas de lipídio e peptídeos foram misturadas em frascos de vidro a fim de se obter a proporção molar P:L (Peptídeo:Lipídio) desejada e cuidadosamente submetidas ao vortex para homogeneização. Volumes de 15 a 80 μ L, dependendo da proporção P:L das misturas dissolvidas foram depositadas nos vidros de quartzo usando seringas de vidro e a solução permaneceu em temperatura ambiente até que a amostra parecesse seca. Em seguida, os vidros são colocados em um dessecador sob vácuo por no mínimo 3 horas e meia para assegurar a remoção completa de solventes orgânicos. Por fim, os vidros com as amostras secas são colocados em suportes para serem hidratados por aproximadamente 15 horas a 30° C a uma humidade relativa de 97%, condição obtida utilizando-se solução saturada de K_2SO_4 em um ambiente fechado com os vidros no suporte. Desta forma, os lipídios espontaneamente se alinham em uma bicamada bem orientada. A quantidade de lipídio e peptídeo depositadas no vidro de quartzo foi mantida abaixo de 0,2 mg e 20 μ g respectivamente, resultando em filmes finos para evitar dicroísmo linear de artefatos.

As medidas foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco, Tóquio, Japão) entre os comprimentos de onda de 260 e 180 nm a 0,1 nm de intervalo. Para todas as amostras foram feitas 3 médias de acumulação, a uma velocidade de varredura de 10 nm/min, com tempo de resposta de 4 s e largura de banda de 1 nm, a cada 45° de rotação da célula a temperatura de 30° C. O tempo total de medida para todos os ângulos era de aproximadamente 3 horas e meia. O espectro do lipídio puro também era medido com os mesmos parâmetros.

Os oito espectros das medidas sucessivas a cada ângulo de 45° foram inicialmente tratados pelo *software* próprio, desenvolvido pelo engenheiro Siegmur Roth, OCDCalc. Através dele os espectros foram zerados no comprimento de onda de 260 nm e calculado o espectro médio entre eles. Todas as contribuições vindas dos lipídios foram subtraídas pelo programa *Spectra Analysis* (Jasco, version 1.50.00 [Build 2]). Com o *software* Origin 8.0 os espectros foram normalizados pelo valor máximo da maior banda para posterior análise.

2.3.6 Ressonância Magnética Nuclear de Estado Sólido - ssNMR

As amostras orientadas de NMR foram preparadas pela co-solubilização dos lipídios DMPC, DMPG, POPC, POPG e LMPC com cada peptídeo, a partir de volumes adequados de estoques em clorofórmio e metanol, 2:1 (v/v). Um volume apropriado de cada amostra, de acordo com a proporção P:L, foi espalhado em 12 lamínulas retangulares de vidro (Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Alemanha), previamente limpas em banho de clorofórmio e metanol. As amostras foram deixadas para secar por 1 hora e, em seguida, submetidas ao dessecador a vácuo, durante toda a noite, para completa remoção de traços de solventes orgânicos. Posteriormente, empilharam-se as lamínulas em conjunto para serem hidratadas em um recipiente fechado, na presença de solução saturada de K₂SO₄, a umidade relativa de 96%, temperatura de 45° C, por no mínimo 15 horas. Ao fim da hidratação, as lamínulas foram envolvidas em parafilme e plástico filme para as medidas.

As medidas de NMR ³¹P foram realizadas a 202,5 MHz em um espectrômetro de NMR (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanha) com magneto de frequência 500 MHz, usando sequência de eco Hahn (M. Rance, R.A. Byrd, Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic) com pulso de 90° de 5 µs e 30 µs de tempo de eco, com desacoplamento ¹H SPINAL64 (B.M. Fung, A.K. Khitrin, K. Ermolaev, An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids) durante a aquisição. O tempo de aquisição foi de 10 ms e em média foram medidos de 2000 a 5000 scans.

2.3.7 Experimento de Vazamento de Vesícula por Espectroscopia de Fluorescência

As vesículas para o experimento de vazamento foram preparadas em um frasco de vidro com tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 contendo 12,5 mM do fluoróforo ANTS, 45 mM do quencher DPX. Os lipossomos foram preparados co-solubilizando o pó liofilizado de POPC e POPG em proporção de 1:2 (mol:mol) em clorofórmio e metanol 3:1 (v/v), juntamente com 10^{-2} mol% de Rhod-PE que é retirado durante a preparação por extrusão e gel filtração. Coloca-se a mistura para secar sob fluxo leve de nitrogênio e, em seguida, em dessecador a vácuo de um dia para o outro. O filme fino obtido é hidratado com tampão contendo o fluoróforo e o *quencher*, submetendo a mistura à homogeneização em vortex, formando-se as MLVs. Em seguida, fez-se 10 ciclos de congelamento e descongelamento (*freeze-thaw*). As vesículas unilamelares grandes (LUV's - *Large unilamellar vesicles*) foram obtidas por 21 ciclos de extrusão (Avanti Mini Extruder, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) dos lipossomos através de uma membrana policarbonada Nuclepore com poro tamanho 100 nm (Whatman - GE Healthcare Europe, Freiburg, Alemanha) a uma temperatura de 20° C, acima da temperatura de transição dos lipídios. O corante não encapsulado foi removido por filtração em gel usando centrifugação em colunas preenchidas com Sephacryl 100-HR (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanha) e equilibrada com um tampão de eluição 10 mM de fosfato de potássio, pH 7,0.

O vazamento do ANTS encapsulado foi monitorado por medidas de fluorescência realizadas em uma cubeta de quartzo com um agitador constante a uma temperatura de 25° C em tampão fosfato de potássio, pH 7,0, utilizando o espectrofluorímetro FluoroMax2 (HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching, Alemanha) configurando para a emissão do ANTS em 510 nm (fenda de 5 nm) e sua excitação em 355 nm (fenda de 5 nm). A uma concentração final de vesículas a 100 μ M, o volume apropriado de solução estoque de cada peptídeo dissolvido em água foi adicionado para a proporção P:L a ser testada. O nível 100% de fluorescência obtida pelo vazamento correspondeu à adição de 0,25 vol% de Triton X-100 depois de 5 minutos.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Análise estrutural por Dicroísmo Circular

Uma vez que este trabalho partiu do desenho de peptídeos modelo com características em sua sequência primária que conduzissem à aquisição de uma estrutura secundária do tipo β e propriedades anfipáticas, nossa primeira investigação foi observar o comportamento dos peptídeos $(KL)_n$ ($n = 6$ ao 20) apenas em água, a fim de constatar não somente se havia algum nível de enovelamento por estarem em solução, mas também sua solubilidade e comportamento de agregação. Os espectros podem ser vistos na **Figura 41**.

Figura 41: Espectros de CD dos na região do UV distante peptídeos $(KL)_n$ em água, pH 4,5. As linhas apresentam características de estrutura desordenada caracterizada pelo mínimo em 198 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O perfil para todos os peptídeos apresentou uma pequena banda negativa na região de 230 nm, fraca banda positiva na região entre 215 a 220 nm, e com maior e

proeminente banda negativa em torno de 200 nm. Tal espectro é consistente com aqueles observados em outros estudos acerca de peptídeos nessa situação (KRIMM; TIFFANY, 1974), e indicam suas estruturas como desordenadas, ou seja, os polímeros carregados apresentaram-se em uma estrutura relativamente estendida em soluções sem a presença de íons e sais e não apresentaram padrão de repetição estrutural ao longo de sua cadeia. Situação caracterizada principalmente pela banda de intensa elipticidade negativa na região abaixo de 200 nm (KRIMM; TIFFANY, 1974).

Diferentemente do evidenciado em água, o estudo dos polímeros de KL em tampão fosfato de potássio 10 mM resultou em estruturação de alguns dos peptídeos modelo, dependendo do tamanho da cadeia (**Figura 42**).

Figura 42: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos (KL)_n em tampão fosfato de potássio, pH 7,0. O perfil característico de estruturas em folha- β (10 a 20) com mínimo em 218 nm e máximo na região de 200 nm. Os peptídeos (KL)₆ e (KL)₈ mantiveram estrutura desordenada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por certo, assim como previsto no desenho das sequências primárias, os peptídeos (KL)₁₀ a (KL)₂₀ exibiram padrão estrutural de folhas- β . Os perfis dos

espectros apresentaram banda de elipticidade negativa próxima da região entre 215 e 220 nm e intensa banda positiva na região entre 200 e 195 nm, consequentes das transições do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, respectivamente, típicas de espectros na conformação de folha- β (GREENFIELD, 2007). Entretanto, os peptídeos (KL)₆ e (KL)₈ não apresentaram o mesmo perfil, mantendo a acentuada banda negativa na região próxima a 198 nm, indicando que a presença do sal e mudança do pH não foram suficientes para induzir a estruturação desses peptídeos. O intenso pico de elipticidade negativa sugere uma estrutura desordenada, do tipo não-canônica, ou seja, de difícil classificação de acordo com os parâmetros conhecidos de ordenação.

Uma vez que diversos fatores são responsáveis pela estruturação e estabilidade de peptídeos e proteínas em solução, por exemplo interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas (JELESAROV et al., 1998), foi necessário investigar qual o fator determinante para a estruturação observada dos peptídeos em folhas- β , se a presença de qualquer sal ou a variação de pH na solução. Por esta razão, apenas como demonstração, (KL)₁₀ foi escolhido como amostragem de um peptídeo de tamanho médio, enquanto (KL)₂₀ foi escolhido para o maior deles. Ambos foram diluídos em diferentes solventes: água, pH 4,5; tampão MES 10 mM pH 6,5; tampão HEPES, pH 7,5 e tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0.

Figura 43: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos (KL)₁₀ e (KL)₂₀ em diferentes tampões. A influência do sal e do pH da solução tampão na estrutura dos peptídeos (KL)₁₀ e (KL)₂₀.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros da **Figura 43** ilustram claramente o efeito do íon fosfato na estrutura. Evidenciamos que os peptídeos diluídos tanto em MES (linha verde) quanto em HEPES (linha preta) seguiram o mesmo comportamento dos polímeros diluídos em água (linha azul). A banda de elipticidade negativa na região abaixo de 200 nm continua intensa nestas situações e seguem os mesmos perfis em ambos os peptídeos, praticamente se sobrepondo. Os espectros ainda sugerem que o efeito não é dependente do pH, uma vez que juntamente à variação de sal, também variamos o valor do pH indo de uma região mais ácida a uma mais neutra e os peptídeos permaneceram desordenados. Isto é diferente da situação em tampão fosfato de potássio, em que como analisado anteriormente, os peptídeos se estruturaram. Dado que os peptídeos modelo foram desenhados para serem carregados positivamente, cargas negativas dos íons fosfato podem atuar nas interações eletrostáticas que dirigem os processos de enovelamento dos peptídeos, de forma a favorecer a estruturação do tipo β , como havia sido planejado. Para os casos dos peptídeos menores, como (KL)₆ e (KL)₈ acreditamos que o tamanho pequeno da cadeia polipeptídica seja o principal motivo para o não enovelamento, mesmo na presença de íons que auxiliem na sua estruturação.

A fim de assegurarmos que os peptídeos preferencialmente se enovelam em estruturas do tipo β em tampão fosfato de potássio, testes dos $(KL)_n$ diluídos em uma mistura 50/50 (v/v) de tampão fosfato de potássio e TFE (2,2,2-trifluoretanol) foram realizados. O reagente TFE é um estabilizador de estruturas helicoidais, amplamente utilizado em solução aquosa na presença de peptídeos (LUO; BALDWIN, 1997), sendo assim, esperamos que as cadeias $(KL)_n$ convertam suas estruturas do tipo β apresentada em tampão fosfato para estruturas do tipo hélice.

Figura 44: Espectro de CD na região do UV distante dos peptídeos $(KL)_n$ em tampão fosfato de potássio e TFE 50/50 (v/v). Os espectros de CD demonstram que a presença do indutor helicoidal TFE causa a conversão de estrutura apenas em alguns peptídeos, sendo que outros mantêm a estrutura do tipo β .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Espectros de CD dos polímeros $(KL)_n$ (**Figura 44**) demonstram que apesar da presença indutora do TFE, a maioria dos peptídeos não se converteu em uma estrutura helicoidal, apresentando um perfil majoritário de estruturação do tipo β , com alargamento e diminuição da intensidade das bandas, o que sugere uma possível perda de estrutura. Apenas os peptídeos $(KL)_6$ e $(KL)_8$, que não haviam se estruturado adequadamente em folha- β anteriormente, apresentaram bandas características de estruturas ordenadas do tipo α -hélice. Entretanto, as bandas negativas das regiões

entre 202 e 207 nm e entre 220 e 222 nm são largas e não definidas, o que indica pequenas regiões de hélice. Especificamente, dois peptídeos tiveram perfis espectrais típicos definidos, um de cada estado. O (KL)₁₄ apresentou uma linha espectral com bandas intensas de elipticidade negativa na região próxima a 221 nm e 207 nm, próprias de estruturas em α -hélice. Apenas o polímero (KL)₁₀ manteve o perfil de sua curva peculiar a estruturas do tipo β , com uma banda de elipticidade negativa próxima a 218 nm e a banda positiva na região de 200 nm.

Figura 45: Espectros de CD na região do UV distante obtidos dos peptídeos (KL)_n em POPC:POPG e DMPC. Em (A) são mostrados os espectros dos peptídeos na presença de POPC:POPG (1:2) a razão P:L = 1:20; (B) espectros de CD dos peptídeos na presença de vesículas de DMPC (1:2) a razão P:L = 1:20.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, investigamos como a presença de membranas modelo poderia afetar o enovelamento e se elas poderiam promover uma possível interconversão para uma estrutura helicoidal. Para isto, montamos dois sistemas em que a ausência e a presença de cargas negativas nas membranas foram consideradas. No segundo caso, utilizamos vesículas de DMPC a uma proporção proteína:lipídio (P:L) de 1:20. No primeiro caso, foram utilizadas vesículas da mistura lipídica de POPC:POPG em proporção 1:2, a uma proporção P:L de 1:20, sendo escolhido este valor para que as

cargas nas membranas estivessem em excesso em relação à carga dos peptídeos (como mostrado na **tabela 2**).

Em ambas as situações é demonstrado pela **Figura 45** que a conformação em folha- β permaneceu, sendo que a presença ou não de cargas nas membranas não afetou o tipo de conformação que os peptídeos adquirem. As bandas negativas e positivas do espectro ainda permanecem, respectivamente, nas regiões de 218 nm e 200 nm, como esperado para estruturas do tipo β . As maiores variações ocorreram apenas com os peptídeos (KL)₆ e (KL)₈ na presença das cargas negativas. Em vesículas de DMPC, os peptídeos continuam com estrutura desordenada, assim como em água e tampão fosfato de potássio, contudo, quando na presença das vesículas da mistura lipídica de POPC:POPG, ou seja, em ambientes com porções hidrofóbicas e de cargas negativas disponíveis, o peptídeo (KL)₆ perde totalmente qualquer contribuição estrutural, enquanto que o (KL)₈ adquire estrutura em folha- β , sugerindo, neste caso, que para obter esta estrutura as contribuições eletrostáticas não são suficientes para estabilizar sua estrutura, necessitando ainda de interações hidrofóbicas para auxiliar no processo de enovelamento.

Com este resultado, temos fortes evidências de que os peptídeos modelo desenhados para este trabalho possuem enorme preferência a adquirirem estruturas em folha- β e que poucas influências externas interferem na sua estruturação. Desta maneira, resta-nos saber em qual o tipo de folhas- β que os peptídeos se enovelam. Para isso, utilizamos o programa de bioinformática *BestSel* para desconvolução dos dados de nossos experimentos (MICSONAI et al., 2015). Este é um programa específico para determinação da estrutura secundária de folhas- β através de espectros obtidos por CD, sendo capaz de distinguir entre folhas paralelas e antiparalelas de diferentes torções.

Assim, ao analisarmos os espectros de todos os peptídeos em tampão fosfato de potássio e também os dos peptídeos na presença da mistura lipídica de POPC:POPG, com exceção do (KL)₆ que aparentemente não exibiu estrutura nestas

situações, as estruturas antiparalelas corresponderam a maior porcentagem das estruturas em tampão fosfato de potássio (PB) e mais que 50% em presença da mistura lipídica, como mostrado na **Tabela 3**, sugerindo que esta seja a estrutura preferencial desse tipo de polímero. Destacamos a porcentagem correspondente ao peptídeo (KL)₁₀, que apesar do seu tamanho médio, apresentou a maior porcentagem para a estrutura antiparalela, sugerindo assim, ser o mais estável neste tipo de conformação.

Em uma análise mais detalhada, vemos que a construção das folhas pelas fitas antiparalelas somente é possível se elas estiverem deslocadas levemente uma em relação à outra, uma vez que outras conformações possíveis não seriam favoráveis energeticamente. Entretanto, esta investigação ainda não foi realizada e será abordada em estudos futuros de metilação das cadeias laterais dos peptídeos.

Tabela 3 - Resultados da desconvolução dos espectros de CD dos peptídeos (KL)_n

Peptídeo	Porcentagem de Estrutura Secundária Estimada (%)									
	Hélice		Folha β Antiparalela		Folha β Paralela		Voltas		Outros	
	PB	POPC: POPG	PB	POPC: POPG	PB	POPC: POPG	PB	POPC: POPG	PB	POPC: POPG
KL6	0,0	6,1	34,2	21,4	0,0	2,3	17,3	23,9	48,4	46,2
KL8	0,0	0,0	33,4	56,7	0,0	15,6	17,3	6,4	49,3	21,3
KL10	0,0	0,0	82,3	73,3	17,7	14,2	0,0	0,8	0,0	11,7
KL12	0,0	0,0	29,1	57,7	36,9	10,1	4,0	6,5	30,1	25,7
KL14	0,0	0,0	33,4	64,8	18,1	5,7	7,6	5,2	40,8	24,3
KL16	0,8	0,0	32,5	61,8	34,4	2,1	1,8	7,7	30,5	28,4
KL18	0,0	0,0	60,9	54,4	12,7	0,0	5,9	11,4	20,4	34,2
KL20	0,0	0,3	72,5	55,0	0,0	0,0	13,4	11,0	14,0	33,6

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.4.2 Estudo da orientação de folhas- β em membranas modelo por Dicroísmo Circular Orientado

Os experimentos de OCD foram realizados inicialmente selecionando os sistemas de lipídios a serem testados, de acordo com o trabalho publicado por Strandberg e Ulrich (2015), no que se refere à inserção de proteínas

transmembrânicas do tipo β em bicamadas lipídicas e a relação com a geometria dos lipídios que constituem estas membranas.

De acordo com o referido artigo, existe influência da curvatura espontânea dos lipídios, não só no enovelamento de peptídeos e proteínas, como também na inserção destes em membranas. Foi demonstrado que peptídeos catiônicos anfifílicos geralmente ligam-se à superfície da bicamada, ou seja, são paralelos ao plano da membrana, quando esta é constituída de lipídios com curvatura espontânea negativa, como POPC. No caso de lipídios DMPC e LMPC, que possuem curvatura espontânea positiva, estes peptídeos podem inserir-se parcialmente ou totalmente na membrana, respectivamente, de forma a estarem em posição oblíqua na porção hidrofóbica ou em estado transmembrânico total.

Essas situações dependem da minimização da geometria das estruturas químicas dos lipídios, utilizando o conceito que foca nos seus formatos. Lipídios como POPC, que possuem uma área seccional transversal da cabeça do lipídio de mesmo tamanho que a área das cadeias acila são descritos como tendo formato de um cilindro. (STRANDBERG; ULRICH, 2015). Aqueles que possuem a área da seção transversal da cabeça grande, mas uma pequena área da cadeia acila, como DMPC, são considerados cones invertidos moderados. E os lipídios com área da seção transversal da cabeça grande, mas com volume pequeno da cadeia acila, são considerados cones invertidos, representados por lipídios Liso-PC (STRANDBERG; ULRICH, 2015). As representações das geométricas podem ser melhor visualizadas pela **Figura 46**.

Figura 46: Representação Geométrica da curvatura de fosfolipídeos. (A) Geometria cone invertida de lipídeos Liso-PC, (B) geometria cone moderada de lipídeos DMPC e (C) geometria cilíndrica.

Fonte: Adaptação de (CRAVO, 2017) a partir de (STRANDBERG, E., ULRICH, A.S., 2015, p. 1947).

Desta forma, realizamos as medidas de OCD considerando estes conceitos de geometria dos lipídios, a fim de garantir que os peptídeos interagissem com a membrana em 3 situações desejadas: i) permanecessem na superfície da membrana, paralelos ao plano; ii) tivessem acesso limitado ao núcleo hidrofóbico para se inserirem parcialmente na bicamada e iii) pudessem se introduzir mais a fundo na membrana, a fim de ficarem completamente ou o máximo possível em um estado transmembrânico. Estas condições são garantidas pelo tipo de lipídio escolhido e o formato das geometrias que possuem. No caso do POPC e POPG, devido à geometria do tipo cilíndrica, a formação da membrana é mais compacta, uma vez que geometricamente os cilindros podem se encaixar facilmente, sem deixar espaços vazios, o que forma uma bicamada compacta e com acesso dificultado pelo encaixe justo. As moléculas de DMPC e DMPG, com formato em cone moderado, tendem a manter o seu formato, o que resulta em “espaços vazios” na região das cadeias acila. Assim, peptídeos podem se inserirem facilmente na região hidrofóbica da membrana. Já lipídios com formato de cone invertido, do tipo do LMPC, preferem formar micelas, contudo, ao serem usados em misturas lipídicas juntamente com DMPC, podem originar membranas com espaços entre a região da cabeça e das cadeias acila, o que favorece a uma melhor inserção de peptídeos nessas regiões (STRANDBERG; ULRICH, 2015).

Na **Figura 47** estão os espectros dos peptídeos na presença de modelos de membrana diferentes, de acordo com o conceito de formato das moléculas. No primeiro sistema, temos a mistura lipídica POPC:POPG, 1:2, na razão molar P:L = 1:20 (**Figura 47 A**) e 1:100 (**Figura 47 B**). As figuras C e D correspondem ao sistema em DMPC (razão molar P:L = 1:100) e em mistura lipídica na razão de 1:2, DMPC:DMPG, razão molar P:L = 1:20. Por fim, temos um espectro (**Figura 47 E**) com a mistura de LMPC:DMPC, 1:2, a razão molar P:L, 1:20.

Figura 47: Espectros de OCD dos peptídeos (KL)_n na presença de membranas de diferentes composições lipídicas. (A) POPC:POPG P:L 1:20, (B) POPC:POPG P:L 1:100, (C) DMPC P:L 1:100, (D) DMPC:DMPG P:L 1:20 e (E) LMPC:DMPC P:L 1:20.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente percebemos que, independente da composição lipídica escolhida, do ponto de vista estrutural, quase todos espectros permanecem característicos de folha- β , com bandas negativas em 218 nm e banda positiva na região de 200 nm. A exceção encontra-se nos resultados para o (KL)₆, que apresentava estruturação desordenada ou não canônica, de difícil identificação pelo perfil das linhas do espectro. Contudo, na presença das cargas negativas e do próprio DMPC:DMPG, o perfil característico do espectro sugere a formação de folha- β , assim como para as cadeias maiores. Atribuímos este comportamento ao efeito das cargas negativas e ao efeito hidrofóbico devido à presença das vesículas. Sabemos pelos espectros de CD que os peptídeos modelo foram afetados pelas cargas negativas da membrana lipídica. Entretanto, apenas com este experimento constatamos melhor o efeito hidrofóbico quando levamos em consideração o conceito de formato geométrico uma vez que os peptídeos possuem acesso “facilitado” ao núcleo hidrofóbico da bicamada. A hipótese é de que como agora podem acessar a região hidrofóbica das vesículas e por serem pequenos, seu enovelamento foi favorecido.

Do ponto de vista da orientação dos peptídeos na membrana, precisamos analisar os espectros com relação a mudanças de intensidade nas bandas de 218 nm e de 200 nm, correspondentes às transições características de estruturas do tipo β . Se nos remetermos aos estudos teóricos de Woody (1981), é necessário que ocorram aumento na intensidade na banda positiva com o consequente enfraquecimento e/ou desaparecimento da banda negativa, com discreto deslocamento das bandas para a direita, sendo possível também, um paralelo as características já utilizadas para definir orientação de estruturas helicoidais em estudos anteriores de OCD.

Para esta verificação, optamos por normalizar os espectros de OCD e fazer a razão entre a elipticidade dos comprimentos de onda 200 e 218 nm ($\theta_{200}/\theta_{218}$), cujos valores são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Razão $\theta_{200}/\theta_{218}$ das intensidades máximas e mínimas dos espectros de OCD.

Composição Lipídica	POPC:POPG (P:L = 1:20)	POPC:POPG (P:L = 1:100)	DMPC (P:L = 1:100)	DMPC:DMPG (P:L = 1:20)	LMPC:DMPC (P:L = 1:20)
Razão $\theta_{200}/\theta_{218}$	~ 1,5	~1,5	~2,0-3,0	~2,0-3,0	~4,0-7,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dado que peptídeos que interagem com sistema formado por lipídios de POPC/POPG tendem a se alinhar paralelamente à superfície da bicamada (GRAU-CAMPISTAMY et al., 2015), definimos este estado como valor referência para quantificar as mudanças nas razões entre as intensidades das bandas negativas e positivas dos espectros de OCD. Lembrando que, de acordo com o trabalho de Woody (1993), esperamos observar a banda de elipticidade negativa mais acentuada quando os peptídeos estão na superfície da membrana, com gradativa diminuição da sua intensidade com a acentuação da elipticidade positiva em 200 nm, à medida que o peptídeo se insere mais na membrana, até o estado de inserção total, perpendicular ao plano normal (N) da bicamada.

Portanto, analisando a **Tabela 4** constatamos claramente o aumento do fator encontrado das razões $\theta_{200}/\theta_{218}$ para as diferentes composições lipídicas. Este resultado advém da intensificação da banda positiva em 200 nm, enquanto diminui a intensidade da banda negativa em 218 nm, conforme previsto pelos cálculos de Woody (1993). Quando correlacionamos o sentido do crescimento dos valores, com os tipos de interação que os peptídeos modelo poderiam ter devido à geometria de suas cadeias lipídicas, percebemos que ele corresponde ao grau de acessibilidade dos peptídeos ao interior da bicamada. De fato, baseados nas condições descritas no trabalho de Strandberg e Ulrich (2015), em relação a situação referência de POPC/POPG (em que esperávamos os peptídeos paralelos à superfície da bicamada), percebemos um pequeno aumento da razão ao analisarmos o mesmo fator quando a composição lipídica é de DMPC/DMPG (para a qual é descrito uma inserção limitada ao núcleo hidrofóbico). Por fim, em relação a situação referência, a maior imersão proporcionada pela mistura DMPC/LMPC resultou em um acréscimo maior à razão entre as bandas 200 e 218 nm, sugerindo que os peptídeos modelo tiveram acesso ainda mais profundo à membrana. Esta tendência pode ser vista pela **Figura 48**.

Figura 48: Espectros de OCD dos peptídeos (KL)_n na presença de vesículas de diferentes composições lipídicas. Os espectros separados por peptídeos, em (A) (KL)₆; (B) (KL)₈; (C) (KL)₁₀; (D) (KL)₁₂; (E) (KL)₁₄; (F) (KL)₁₆; (G) (KL)₁₈; (H) (KL)₂₀, evidenciam o provável grau de orientação na membrana, demonstrado pelo gradativo aumento da banda positiva, partindo do estado paralelo à superfície (POPC:POPG, em preto) para o mais inserido na bicamada lipídica (LMPC:DMPC, em vermelho), para a maioria dos casos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.4.3 Perturbação da bicamada lipídica por ssNMR

Os estudos realizados por NMR de estado sólido do fósforo 31 (^{31}P), além de serem motivados pela procura de maiores evidências da inserção dos peptídeos modelo na membrana lipídica, também foram motivados pelos resultados de ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) que avaliou a atividade antimicrobiana dos peptídeos modelo.

2.4.3.1 Atividade antimicrobiana

Por padrão, testes de atividade contra agentes microbianos foram realizados para os peptídeos modelo. Os ensaios foram feitos no próprio laboratório do Departamento de Biofísica Molecular (IBG-2), do Instituto de Tecnologia de Karlsruhe, Alemanha, pela técnica Kerstin Scheubeck e, surpreendentemente, foram positivos. Por serem considerados apenas peptídeos modelo com a finalidade de estudo dos mecanismos de orientação na membrana, não se esperava que eles pudessem apresentar boa atividade contra microrganismos, contudo, os resultados dos ensaios de concentração inibitória foram promissores para alguns peptídeos (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Teste de concentração inibitória contra microrganismos

Peptídeo	<i>E. coli</i> DSM1116	<i>E. helveticus</i> DSM 18390	<i>B. subtilis</i>	<i>S. xylosus</i> DSM 20287
(KL)6	>256	256	>256	256
(KL)8	32	16	16	8
(KL)10	8	4	8	2
(KL)12	64	32	32	32
(KL)14	256	128	128	64
(KL)16	>256	256	256	128
(KL)18	256	>256	256	128
(KL)20	256	256	256	128
(KL)22	256	128	128	64
(KL)24	64	64	64	32
(KL)26	128	128	64	64
PGLa WT	64	16	4	4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim como o esperado, a maioria dos peptídeos (KL)_n não atuaram bem como agentes antimicrobianos. Porém, o polímero (KL)₁₀ apresentou efeito de inibição melhor que o peptídeo controle PGLaWT, com níveis menores de concentração para apresentar atividade. O peptídeo PGLa é um peptídeo isolado da pele de sapo, descoberto na década de 80 com atividade antimicrobiana comparável a peptídeos *magainin* 2. Estes peptídeos são positivamente carregados e formam hélices anfifílicas que são capazes de se ligarem às bicamadas lipídicas afetando sua permeabilidade, sugerindo que possam atuar como detergentes ou formadores de canais helicoidais (WILLIAMS et al., 1990). Apesar de não possuírem a mesma eficiência, os peptídeos (KL)₈, (KL)₁₂ e (KL)₂₄ também foram eficientes, o que direcionou o estudo a também analisar se existia uma dependência entre o nível de perturbação na membrana e o tamanho das cadeias polipeptídicas.

2.4.3.2 Estudos de ssNMR ³¹P

O núcleo do átomo de fósforo é uma sonda natural dos eventos que ocorrem na superfície da membrana lipídica, justamente pela sua localização na cabeça polar dos fosfolipídios. Por esta razão, NMR ³¹P é uma técnica convidativa para investigação de polipeptídeos associados com bicamadas lipídicas, uma vez que dos vários núcleos presentes em membranas biológicas, o fósforo 31 tem vantagens particulares. Os grupos da cabeça de fosfolipídios de membrana possuem um spin isolado igual a ½ que está sujeito somente ao deslocamento químico anisotrópico e a interações dipolar próton-fósforo, sendo assim, uma sonda intrínseca bem definida para análise de movimento e estrutura. (DUFOURC et al., 1992). Além disso, a forma da linha é um indicador de difusão rotacional na bicamada e consequentemente, de propriedades macroscópicas da membrana (VERLY et al., 2009).

A escolha dos sistemas lipídicos a serem medidos por NMR ³¹P seguiram a ideia estabelecida para os experimentos de OCD, contudo, levando-se em conta agora a existência de atividade antimicrobiana do peptídeo (KL)₁₀, dando um enfoque especial às suas interações com a bicamada. Posto que (KL)₁₀ é o polímero com maior ação contra microrganismos, os primeiros testes procuraram identificar quais as

concentrações ótimas em que nenhuma ou alguma perturbação na membrana acontecesse, a fim de verificarmos se nestas mesmas concentrações os outros peptídeos modelo de cadeias diferentes causavam os mesmos efeitos na bicamada.

A **Figura 49** do trabalho de Afonin e colaboradores (2008) exemplifica espectros típicos de RMN ^{31}P de amostras de DMPC:DMPG alinhadas ao campo aplicado, em diversas temperaturas. Pela figura podemos observar a dependência da forma da linha em relação a fase do lipídio. Notamos que o pico tende a se tornar mais fino à medida que a temperatura aumenta e se aproxima da temperatura de transição. Sabemos que esta temperatura, tanto para o DMPC quanto de DMPG, é por volta de 24°C , sendo que a partir deste valor, a forma da linha parece se estabilizar, mantendo o mesmo formato apesar do aumento da temperatura. Assim, percebemos que a partir da temperatura de transição os lipídios tornam-se bem orientados e a partir deste ponto, possíveis deformações na linha não são influenciadas pela temperatura (AFONIN et al., 2008).

Figura 49: Espectros de NMR ^{31}P da mistura de DMPC:DMPG em função da variação da temperatura. Nota-se o estreitamento do pico do espectro com estabilização a partir de 25°C , valor acima da temperatura de transição.

Fonte: Adaptação de (CRAVO, 2017) a partir de (AFONIN et al., 2008).

Iniciamos os testes pelas misturas lipídicas de POPC:POPG (1:2) e DMPC:DMPG (1:2), variando a razão molar P:L, nas seguintes concentrações, para ambos os sistemas: 0:1, 1:200, 1:100, 1:50, 1:25 e 1:12. A **Figura 50** mostra os espectros de NMR obtidos nestas séries. Tanto para o caso em POPC:POPG, quanto para DMPC:DMPG, sem a presença do peptídeo (0:1), os espectros apresentaram pico intenso e fino próximo a região de 30 ppm, o que indica uma boa orientação dos fosfolípidios na membrana (AFONIN et al., 2008). Para os dois casos, entre as concentrações de 1:200 a 1:50, a presença do peptídeo (KL)₁₀ não provocou perturbações significativas na membrana, evidenciado pela ausência de um pico na região próxima a -15 ppm, que geralmente corresponde a presença de lipídios não orientados (ZAMORA-CARRERAS et al., 2016).

Contudo, em POPC:POPG, a partir da razão P:L= 1:25, observamos o surgimento de um pico de alta intensidade na região de -15 ppm, indicando que a perturbação na membrana pelo peptídeo (KL)₁₀ é extremamente efetiva nesta concentração. Para P:L= 1:12, entretanto, a perturbação é demasiada e, na realidade, provoca a destruição total da bicamada dando origem a micelas, fato este sugerido pelo desaparecimento do pico em 30 ppm que indicava a orientação dos fosfolípidios (ZAMORA-CARRERAS et al., 2016).

Figura 50: Espectros de RMN de ^{31}P com variação da razão molar do peptídeo (KL) $_{10}$ na presença de POPC:POPG e DMPC:DMPG. (A) Variação da razão molar do peptídeo (KL) $_{10}$ partindo de P:L = 0:1 a 1:12 em POPC:POPG, a temperatura de 30° C. (B) Variação da razão molar do peptídeo (KL) $_{10}$ partindo de P:L = 0:1 a 1:12 em DMPC:DMPG, a temperatura de 30° C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diferentemente da situação anterior, para DMPC:DMPG, à concentração de 1:25 ainda não vemos praticamente nenhum efeito do peptídeo (KL) $_{10}$ na bicamada, apesar do pico ser um pouco mais intenso que nas concentrações anteriores. A perturbação ocorre de fato apenas na concentração 1:12, em que, como para o caso da razão 1:25 de POPC:POPG, o pico em -15 ppm torna-se intenso, indicando ser

esta a concentração ótima para perturbação na bicamada pelo polímero (KL)₁₀ em uma composição de DMPC:DMPG. Assim, estipulamos que a razão P:L = 1:25 corresponde a uma concentração média de perturbação para os diversos sistemas lipídicos, enquanto que em concentrações mais baixas, como 1:200, espera-se que nenhum efeito seja detectado.

Figura 51: Espectros de RMN de ³¹P - Perturbação dos peptídeos (KL)_n em presença POPC:POPG (1:2). (A) Peptídeos (KL)_n em concentração P:L = 1:200, em POPC:POPG (1:2). (B) Peptídeos (KL)_n em concentração P:L = 1:12, em POPC:POPG (1:2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para avaliar a influência do tamanho da cadeia polipeptídica na perturbação da bicamada, realizamos então os mesmos testes em POPC:POPG (1:2) e DMPC:DMPG (1:2) com os outros peptídeos modelo, porém, fixando em duas razões: a de perturbação P:L = 1:25 e a que nenhuma desordenação ocorreria, P:L = 1:200. A **Figura 51** mostra os espectros obtidos de POPC:POPG, em A, na concentração 1:200 e em B, na concentração 1:25. O primeiro espectro, assim como anteriormente, demonstra a situação da membrana sem a presença dos peptídeos (P:L = 0:1), com pico fino e intenso na região 30 ppm, demonstrando a boa orientação dos fosfolípidios na amostra. Para os outros espectros da **Figura 51 A**, na concentração P:L = 1:200, assim como esperado, nenhum dos peptídeos provocou grandes perturbações na membrana. Existe um pico de intensidade baixa na região de desordenação, no entanto, não significativo para nenhum dos polímeros (KL)_n. Na **Figura 51 B**, percebemos que não somente o peptídeo (KL)₁₀ perturba a bicamada, mas também os outros peptídeos de tamanhos diferentes, mesmo que minimamente, como vemos para o peptídeo (KL)₆. Pela variação do pico na região -15 ppm, notamos uma tendência no grau de perturbação, que começa baixo para os (KL)₆ e (KL)₈, com um máximo para o (KL)₁₀. A partir do (KL)₁₂ a perturbação volta a diminuir, crescendo à medida que o tamanho da cadeia polimérica também aumenta, exibindo um máximo de intenso distúrbio para o peptídeo (KL)₂₀.

A mesma situação, porém, não ocorre no sistema de DMPC:DMPG (1:2), como verificamos pelos espectros na **Figura 52 A e B**. Na **Figura 52 A**, em que temos baixa concentração de peptídeos, vemos que os espectros são praticamente semelhantes à situação sem a presença dos peptídeos, ou seja, um pico intenso na região 30 ppm indicando a boa orientação dos fosfolípidios e a baixa intensidade do pico próximo a -15 ppm possui uma perturbação não significativa. Do mesmo modo, para a razão P:L = 1:25, observamos que o distúrbio na bicamada, embora um pouco mais intenso na concentração anterior, ainda é baixo, ocorrendo apenas do peptídeo (KL)₆ ao (KL)₁₄ e tornando-se praticamente inexistente do (KL)₁₆ ao (KL)₂₀.

Figura 52: Espectros de RMN de ^{31}P - Perturbação dos peptídeos $(\text{KL})_n$ em presença DMPC:DMPG (1:2). (A) Peptídeos $(\text{KL})_n$ em concentração P:L = 1:200, em DMPC:DMPG (1:2). (B) Peptídeos $(\text{KL})_n$ em concentração P:L = 1:12, em DMPC:DMPG (1:2).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, como último teste de perturbação, realizamos novamente uma série de variação da concentração do peptídeo $(\text{KL})_{10}$ (P:L, de 1:200 a 1:12), no entanto, apenas contra uma membrana zwitteriônica, composta pelos fosfolipídios LMPC:DMPC (1:2). A **Figura 53** exibe os espectros obtidos, e como na situação com membranas carregadas negativamente, temos fosfolipídios bem orientados, como

exibido pelos dois picos na região 30 ppm e nenhum distúrbio ocorre até a razão P:L = 1:50. Uma discreta perturbação é iniciada em P:L = 1:25, mas quando mais concentrado, com P:L = 1:12, a desorganização total acontece, sugerindo que uma concentração ótima estaria entre estes dois valores.

Figura 53: Espectros de RMN de ^{31}P - **Teste de concentração do peptídeo (KL)₁₀ na presença LMPC:DMPC (1:2).** Teste de concentração para o peptídeo (KL)₁₀ (de P:L = 1:200 a 1:12) em LMPC:DMPC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de NMR relacionam-se aos encontrados para OCD, sugerindo que para os sistemas lipídicos escolhidos os peptídeos (KL)_n estão se ligando à

membrana e, de alguma forma, inserindo-se na bicamada, tanto por influência de interações eletrostáticas, devido à presença das cargas negativas dos lipídios PG, bem como pelo efeito hidrofóbico, como evidenciado pelo aumento da banda positiva no espectro de OCD e a intensa perturbação causada no experimento de ssNMR na mistura lipídica de LMPC:DMPC.

2.4.3.3 Ensaio de Vazamento de Vesículas por Fluorescência

Com o objetivo de compreender melhor a atividade dos peptídeos modelo contra agentes microbianos, em particular, a alta eficiência da atividade do peptídeo (KL)₁₀, optamos por estudar a interação destes peptídeos com membrana por espectroscopia de fluorescência. A permeabilização da membrana por peptídeos antimicrobianos é um importante aspecto a se estudar das interações que proteínas e outras moléculas podem ter com bicamadas lipídicas. A morte celular por vazamento induzido do conteúdo é um dos mecanismos de ação mais utilizados por peptídeos antimicrobianos, substâncias citotóxicas ou métodos de defesa do hospedeiro. A técnica utiliza vesículas que são preenchidas com marcadores fluorescentes que têm suas propriedades alteradas ao serem liberados (LADOKHIN; WIMLEY; WHITE, 1995).

Para o caso estudado, iniciamos o estudo com um sistema de mistura lipídica, POPC:POPG, a razão P:L = 1:25, a fim de em um primeiro momento, analisar o comportamento dos peptídeos por esta técnica. Os resultados podem ser observados na **Figura 54**.

O gráfico demonstra a fração de vesículas que deixaram escapar seu conteúdo em relação ao total presente na solução. Verificamos que o comportamento da curva vista na **Figura 54 A** está de acordo com os espectros de ssNMR para a mistura POPC:POPG. Como naquele caso, percebemos aqui que a eficiência contra a membrana cresce até a um ponto máximo no ponto do polímero (KL)₁₀, decrescendo a partir do (KL)₁₂ e com mínimo para o (KL)₁₆, demonstrando tendência a aumentar

pelo comportamento dos pontos do (KL)₁₈ e (KL)₂₀. A mesma situação é observada nos níveis de perturbação detectados por ssNMR e nos resultados dos ensaios de inibição. Entretanto, a porcentagem de vesículas afetadas apresentou-se abaixo do esperado, uma vez que pelos testes de atividade presumia-se que as o número de vesículas afetadas pelos peptídeos, principalmente pelo (KL)₁₀, seria maior.

Desta forma, sabendo-se que tanto os íons fosfato, como as membranas, possuíam influências significativas sobre a estrutura dos peptídeos, realizou-se o mesmo teste trocando o tampão utilizado, ao invés de fosfato de potássio para PIPES. O resultado é visto na **Figura 54 B**. Como suspeitado, a porcentagem de vesículas que vazam aumentou com a troca do tampão, mudando o comportamento constatado anteriormente, em que com exceção do (KL)₆, todos os outros peptídeos apresentaram alta atividade contra a membrana, reforçando ainda mais a ideia de que o tampão fosfato de potássio atua fortemente na estruturação dos peptídeos modelo deste trabalho.

Um teste de eficiência focado apenas no peptídeo (KL)₁₀, visto que em outros testes foi o que apresentou melhor atividade, é visto no gráfico de barras da **Figura 54 C**. Nele observamos que, quando o peptídeo (KL)₁₀ é solubilizado em tampão fosfato de potássio e colocado em presença de membranas no mesmo tampão, a interação é baixa. Quando o peptídeo é solubilizado em água, mas as medidas de vazamento são feitas em tampão fosfato, o efeito aumenta. Mas, a porcentagem de vesículas vazadas aumenta de forma significativa sem a presença de tampão fosfato, sugerindo que neste caso, a presença das vesículas possui maior influência no enovelamento do peptídeo e por consequência, em sua atividade.

Figura 54: Vazamento de vesícula por Fluorescência. Em (A) é demonstrada a eficiência de perturbação dos peptídeos $(KL)_n$ em tampão Fosfato de Potássio. (B) demonstra a eficiência de perturbação de bicamada lipídica dos peptídeos $(KL)_n$ em tampão PIPES. (C) Efeito da variação de tampão na atividade do peptídeo $(KL)_{10}$.

KL10 - Efeito do Tampão Fosfato de Potássio

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.0 CONCLUSÕES

Neste trabalho exploramos diversas técnicas espectroscópicas, aplicando-as tanto a um sistema complexo como a proteína P450CLA, quanto a um considerado mais simples, como os dos peptídeos anfipáticos em suas interações com membrana, utilizando principalmente das propriedades intrínsecas dos objetos de estudo a nosso favor para obtenção dos resultados. Na primeira parte do trabalho, a expressão e purificação da P450CLA foi satisfatória e proporcionou a continuidade dos estudos posteriores. Constatamos através dos estudos de caracterização que a proteína está estruturada, é estável a temperatura ambiente e é sintetizada com o grupamento heme, como esperado.

O estudo de interação com ligantes *decoys* sugeriu que apenas a análise espectral por UV/vis é insuficiente para determinar se uma molécula interage com o sítio ativo da proteína e como ela interage. O paradigma de tipos do espectro da diferença é um bom método de varredura inicial de classificação entre substratos e inibidores, contudo, ainda apresenta imprecisões em seus critérios e apenas quando auxiliado por outras técnicas que forneçam informações detalhadas sobre a vizinhança do heme e do estado de coordenação do ferro, que é possível chegar a uma possibilidade de classificação da interação com a molécula.

Dentre todas as moléculas selecionadas, o Diclofenaco de Sódio foi a que mostrou maior afinidade com a P450CLA. Os resultados de UV/vis e EPR sugeriram uma forte interação com o heme, com perturbações significativas no espectro. Os estudos termodinâmicos por DSC concordam com este resultado, quando evidenciamos o aumento da temperatura de transição da enzima, de 43° para 52° C, o que significa uma maior estabilidade estrutural. Esse fato vem de encontro aos indícios de cristalização da proteína, conseguidos apenas quando ensaios foram realizados na presença da molécula. Testes iniciais da proteína sem ligante ou na presença de outra molécula, apenas resultou em condições com precipitado amorfo. Por fim, os resultados preliminares da Voltametria Cíclica indicaram uma potencial aplicação biotecnológica para a enzima, na construção de biosensores para detecção de Diclofenaco de Sódio. Este resultado ainda demonstra que a proteína está ativa e

pode ser utilizada em estudos com novos ligantes, dada a sua característica “promíscua” de interação com moléculas.

Nos estudos realizados com os peptídeos anfipáticos (KL)_n foi possível identificar que estas moléculas possuem forte tendência a se estruturar em folhas- β antiparalelas, com leve deslocamento entre as fitas, uma vez que este demonstrou ser o arranjo estrutural mais favorável. A tendência a esta estruturação é tão marcante nestes peptídeos, que mesmo na presença de TFE, agente indutor de estruturas helicoidais, poucos foram os peptídeos que se converteram a estrutura de α -hélice ou tiveram sua estrutura parcialmente modificada, mantendo em sua maioria o padrão de folha- β .

Os experimentos de CD identificaram que o tampão fosfato de potássio é um fator determinante para a estruturação dos peptídeos, uma vez que modificação do sal constituinte da solução tamponante, ou mesmo a variação do pH, não foram capazes de induzir a estruturação dos peptídeos como na presença do íon fosfato. Contudo, a alteração da solução tamponante demonstrou influenciar na atividade antimicrobiana do peptídeo, visto que os experimentos de vazamento de vesícula constataram um aumento da eficiência quando substituímos o tampão fosfato de potássio por PIPES.

Através dos experimentos de OCD verificamos que os peptídeos podem ser usados para maiores estudos de orientação, dado que, de acordo com a teoria de Woody (1992), os espectros sugeriram que os peptídeos (KL)_n tenderam mudar suas orientações do estado paralelo a superfície da membrana para o parcialmente inserido na membrana. Além disso, observamos que estes peptídeos não somente podem ser usados como modelos para estudos de orientação, mas também como modelos de peptídeos antimicrobianos, dado os resultados dos testes de atividade antimicrobiana e os resultados de perturbação da bicamada lipídica por RMN ³¹P. Em particular, o peptídeo (KL)₁₀ possui alguma característica diferencial que o torna mais ativo e eficiente na perturbação de bicamadas lipídicas, o que sugere que há uma relação de dependência entre o comprimento, estrutura e a atividade dos peptídeos.

4.0 REFERÊNCIAS

AFONIN, Sergii et al. Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state ^{19}F NMR spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 49, p. 16512-16514, 2008.

ANZENBACHER, Pavel; HUDEČEK, Jiří; STRUŽINSKÝ, Rudolf. Study of thermal stability of cytochrome P450 by differential scanning calorimetry. **FEBS Letters**, v. 149, n. 2, p. 208-210, 1982.

BERNHARDT, Rita. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. **Journal of biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 128-145, 2006.

BERNHARDT, Rita; URLACHER, Vlada B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 14, p. 6185-6203, 2014.

BISCHOF, John C.; HE, Xiaoming. Thermal stability of proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, n. 1, p. 12-33, 2006.

BOIVIN, Stephane; KOZAK, Sandra; MEIJERS, Rob. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein expression and purification**, v. 91, n. 2, p. 192-206, 2013.

BREYDO, Leonid et al. Structural differences between amyloid beta oligomers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 700-705, 2016.

BRUYLANTS, Gilles; WOUTERS, Johan; MICHAUX, Catherine. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 12, n. 17, p. 2011-2020, 2005.

BÜRCK, Jochen et al. Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. **Biophysical journal**, v. 95, n. 8, p. 3872-3881, 2008.

BÜRCK, Jochen et al. Oriented circular dichroism: a method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. **Accounts of chemical research**, v. 49, n. 2, p. 184-192, 2016.

CABRELE, Chiara et al. Peptides containing β -amino acid patterns: challenges and successes in medicinal chemistry. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 23, p. 9718-9739, 2014.

CELEJ, M. Soledad et al. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. **Analytical biochemistry**, v. 350, n. 2, p. 277-284, 2006.

CHEESMAN, Myles Richard; GREENWOOD, Colin; THOMSON, Andrew J. Magnetic circular dichroism of hemoproteins. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 36, p. 201-255, 1991.

CHI, Eva Y. et al. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. **Pharmaceutical research**, v. 20, n. 9, p. 1325-1336, 2003.

CHUN, Young-Jin et al. A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis. **Cancer Research**, v. 61, n. 22, p. 8164-8170, 2001.

CONNER, Kip P. et al. Drug Modulation of Water–Heme Interactions in Low-Spin P450 Complexes of CYP2C9d and CYP125A1. **Biochemistry**, v. 54, n. 5, p. 1198-1207, 2015.

CONNER, Kip Patrick. **A Biophysical Rationalization of Type II and Reverse Type I Inhibitor Interactions in CYP450 with Implications for Enzyme Function**. 2013. Tese de Doutorado.

CRUCE, Alex A.; LOCKART, Molly; BOWMAN, Michael K. Chapter Twelve-Pulsed EPR in the Study of Drug Binding in Cytochrome P450 and NOS. **Methods in enzymology**, v. 563, p. 311-340, 2015.

DAWSON, John H.; ANDERSSON, L. A. A.; SONO, Masanori. Spectroscopic investigations of ferric cytochrome P-450-CAM ligand complexes. Identification of the ligand trans to cysteinate in the native enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, p. 3606-3617, 1982.

DAYER, Mohammad R.; MOOSAVI-MOVAHEDI, Ali Akbar; DAYER, Mohammad Saaid. Band assignment in hemoglobin porphyrin ring spectrum: Using four-orbital model of Gouterman. **Protein and peptide letters**, v. 17, n. 4, p. 473-479, 2010.

DE MONTELLANO, Paul R. Ortiz. **Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry**. Springer Science & Business Media, 2005

DUFOURC, Erick J. et al. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. **Biophysical journal**, v. 61, n. 1, p. 42-57, 1992.

FIELDS, Peter A. Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 129, n. 2, p. 417-431, 2001.

FILLION, Matthieu et al. Investigation of the mechanism of action of novel amphipathic peptides: insights from solid-state NMR studies of oriented lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 9, p. 2173-2179, 2014.

FITTIPALDI, M. et al. A multi-frequency pulse EPR and ENDOR approach to study strongly coupled nuclei in frozen solutions of high-spin ferric heme proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 12, p. 3859-3870, 2008.

GARCIA, Assuero Faria. **Thi1, uma proteína envolvida na síntese de tiamina em Arabidopsis thaliana: análises estruturais do mutante Thi1 (A140V)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GHOSH, Chandradhish; HALDAR, Jayanta. Membrane-Active Small Molecules: Designs Inspired by Antimicrobial Peptides. **ChemMedChem**, v. 10, n. 10, p. 1606-1624, 2015.

GOETZ, H. et al. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 60, n. 3, p. 281-293, 2004.

GOUTERMAN, Martin. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 6, p. 138-163, 1961.

GOTO, L. S., HOKKA, C. O., LIMA, J. F., PRIETO, T., ARAUJO, A. P. U., NANTES, I. L., NASCIMENTO, O. R. **Structure and peroxidase activity of ferric Streptomyces clavuligerus orf10-encoded protein P450CLA**: UV-visible, CD, MCD and EPR spectroscopic characterization. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 23, 2012.

GRAHAM, Sandra E.; PETERSON, Julian A. How similar are P450s and what can their differences teach us?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 1, p. 24-29, 1999.

GRAU-CAMPISTANY, Ariadna et al. Hydrophobic mismatch demonstrated for membranolytic peptides, and their use as molecular rulers to measure bilayer thickness in native cells. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

HATANO, M.; NOZAWA, T. Magnetic circular dichroism approach to hemoprotein analyses. **Advances in biophysics**, v. 11, p. 95-149, 1977.

HOFFMAN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, Keith; WALKER, John (Ed.). **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. Cambridge university press, 2010. p. 477-521.

IBARRA-MOLERO, Beatriz et al. Chapter Twelve-Modern Analysis of Protein Folding by Differential Scanning Calorimetry. **Methods in enzymology**, v. 567, p. 281-318, 2016.

JELESAROV, Ilian et al. Salt effects on hydrophobic interaction and charge screening in the folding of a negatively charged peptide to a coiled coil (leucine zipper). **Biochemistry**, v. 37, n. 20, p. 7539-7550, 1998.

JEONG, Hyo-Geun; CHOI, Myung-Seok. Design and Properties of Porphyrin-based Singlet Oxygen Generator. **Israel Journal of Chemistry**, v. 56, n. 2-3, p. 110-118, 2016.

KAGAN, B. L.; AZIMOV, R.; AZIMOVA, R. Amyloid peptide channels. **The Journal of membrane biology**, v. 202, n. 1, p. 1-10, 2004.

KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; PRICE, Nicholas C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KISSINGER, Peter T.; HEINEMAN, William R. Cyclic voltammetry. **J. Chem. Educ**, v. 60, n. 9, p. 702, 1983.

KNOWLES, Tuomas PJ; VENDRUSCOLO, Michele; DOBSON, Christopher M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 6, p. 384-396, 2014.

KRIMM, S.; TIFFANY, M. Lois. The circular dichroism spectrum and structure of unordered polypeptides and proteins. **Israel Journal of Chemistry**, v. 12, n. 1-2, p. 189-200, 1974.

LADOKHIN, Alexey S.; WIMLEY, William C.; WHITE, Stephen H. Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence quenquenching. **Biophysical journal**, v. 69, n. 5, p. 1964-1971, 1995.

LAST, Nicholas B.; SCHLAMADINGER, Diana E.; MIRANKER, Andrew D. A common landscape for membrane-active peptides. **Protein Science**, v. 22, n. 7, p. 870-882, 2013.

LEE, Ming-Tao; CHEN, Fang-Yu; HUANG, Huey W. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. **Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 3590-3599, 2004.

LEE, Naomi R.; BOWERMAN, Charles J.; NILSSON, Bradley L. Effects of varied sequence pattern on the self-assembly of amphipathic peptides. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 9, p. 3267-3277, 2013.

LEWIS, David FV; WISEMAN, Alan. A selective review of bacterial forms of cytochrome P450 enzymes. **Enzyme and microbial technology**, v. 36, n. 4, p. 377-384, 2005.

LI, Huiying; POULOS, Thomas L. Crystallization of cytochromes P450 and substrate-enzyme interactions. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 4, n. 16, p. 1789-1802, 2004.

LI, Rongfeng; KHALEELI, Nusrat; TOWNSEND, Craig A. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 4087-4095, 2000.

LOCUSON, Charles W.; HUTZLER, J. Matthew; TRACY, Timothy S. Visible spectra of type II cytochrome P450-drug complexes: evidence that “incomplete” heme coordination is common. **Drug metabolism and disposition**, v. 35, n. 4, p. 614-622, 2007.

LORENZI, Ersilia D. et al. Pharmaceutical strategies against amyloidosis: old and new drugs in targeting a “protein misfolding disease”. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1065-1084, 2004.

LUO, Peizhi; BALDWIN, Robert L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. **Biochemistry**, v. 36, n. 27, p. 8413-8421, 1997.

LUTHRA, Abhinav; DENISOV, Ilia G.; SLIGAR, Stephen G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 507, n. 1, p. 26-35, 2011.

MAST, Natalia; LIN, Joseph B.; PIKULEVA, Irina A. Marketed Drugs Can Inhibit Cytochrome P450 27A1 (CYP27A1), a Potential New Target for Breast Cancer Adjuvant Therapy. **Molecular pharmacology**, p. mol. 115.099598, 2015.

MCMASTER, Jonathan; OGANESYAN, Vasily S. Magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the structures of the metal sites in metalloproteins. **Current opinion in structural biology**, v. 20, n. 5, p. 615-622, 2010.

MERLINI, Giampaolo; BELLOTTI, Vittorio. Molecular mechanisms of amyloidosis. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 583-596, 2003.

MICSONAI, András et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 24, p. E3095-E3103, 2015.

MOODY, Suzy C.; LOVERIDGE, E. Joel. CYP105—diverse structures, functions and roles in an intriguing family of enzymes in *Streptomyces*. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 6, p. 1549-1563, 2014.

NICKERSON, D. P.; WONG, L. L. The dimerization of *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: practical consequences and engineering of a monomeric enzyme. **Protein engineering**, v. 10, n. 12, p. 1357-1361, 1997.

NIESEN, Frank H.; BERGLUND, Helena; VEDADI, Masoud. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212-2221, 2007.

OMURA, Tsuneo. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *Journal of biochemistry*, v. 147, n. 3, p. 297-306, 2010.

PATEL, Rajan; KUMARI, Meena; KHAN, Abbul Bashar. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3701-3720, 2014.

PLANK, Christian; ZAUNER, Wolfgang; WAGNER, Ernst. Application of membrane-active peptides for drug and gene delivery across cellular membranes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 34, n. 1, p. 21-35, 1998.

PLOTNIKOV, Valerian et al. An Autosampling Differential Scanning Calorimeter for Study of Biomolecular Interactions. **Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences**, p. 241-251, 2005.

POCHAPSKY, Thomas C.; KAZANIS, Sophia; DANG, Marina. Conformational plasticity and structure/function relationships in cytochromes P450. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 8, p. 1273-1296, 2010.

POULOS, Thomas L.; JOHNSON, Eric F. Structures of cytochrome P450 enzymes. In: **Cytochrome P450**. Springer US, 2005. p. 87-114.

PRISNER, Thomas; ROHRER, Martin; MACMILLAN, Fraser. Pulsed EPR spectroscopy: biological applications. **Annual review of physical chemistry**, v. 52, n. 1, p. 279-313, 2001.

PRUSHAN, M. Absorption and Fluorescence Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin and Metallo-Tetraphenylporphyrin. 2005.

PYLYPENKO, Olena; SCHLICHTING, Ilme. Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 991-1018, 2004.

RANCE, Mark; BYRD, R. Andrew. Obtaining high-fidelity spin-12 powder spectra in anisotropic media: Phase-cycled Hahn echo spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 52, n. 2, p. 221-240, 1983.

ROBERT, Faith O.; PANDHAL, Jagroop; WRIGHT, Phillip C. Exploiting cyanobacterial P450 pathways. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 301-306, 2010.

SAL-MAN, Neta; OREN, Ziv; SHAI, Yechiel. Preassembly of membrane-active peptides is an important factor in their selectivity toward target cells. **Biochemistry**, v. 41, n. 39, p. 11921-11930, 2002.

SANI, Marc-Antoine; SEPAROVIC, Frances. How membrane-active peptides get into lipid membranes. **Accounts of chemical research**, v. 49, n. 6, p. 1130-1138, 2016.

SCHENKMAN, John B.; JANSSEN, Ingela. Spectral analyses of cytochromes P450. **Cytochrome P450 protocols**, p. 11-18, 2006.

SCHENKMAN, John B.; SLIGAR, Stephen G.; CINTI, Dominick L. Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacology & therapeutics*, v. 12, n. 1, p. 43-71, 1981.

SCHNEIDER, Elizabeth; CLARK, Douglas S. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 1-13, 2013.

SCHULER, Mary A.; SLIGAR, Stephen G. Diversities and similarities in P450 systems: an introduction. **The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins: Metal Ions in Life Sciences**, v. 3, p. 1-26, 2007.

SCHULTZ, Thomas. Spectroscopic methods for biology and medicine. In: VORLESUNG 21344: SPEKTROSKOPIE IN BIOLOGIE UND MEDIZIN, 2012, Berlin. Disponível em: < http://staff.mbi-berlin.de/schultz/biomed/script_1.pdf >. Acesso em: 13 fev. 2017.

SEWARD, Harriet E. et al. Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis P450 CYP121-fluconazole complex reveals new azole drug-P450 binding mode. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39437-39443, 2006.

SHAI, Yechiel. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 66, n. 4, p. 236-248, 2002.

SHOJI, Osami et al. Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 26, p. 6606-6610, 2013.

SIGEL, Astrid; SIGEL, Helmut; SIGEL, Roland KO (Ed.). **The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins: metal ions in life sciences**. John Wiley & Sons, 2007.

SIPE, Jean D.; COHEN, Alan S. History of the amyloid fibril. **Journal of structural biology**, v. 130, n. 2-3, p. 88-98, 2000.

STRANDBERG, Erik; ULRICH, Anne S. AMPs and OMPs: Is the folding and bilayer insertion of β -stranded outer membrane proteins governed by the same biophysical principles as for α -helical antimicrobial peptides?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 9, p. 1944-1954, 2015.

STRANDBERG, Erik; ULRICH, Anne S. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 23, n. 2, p. 89-120, 2004.

SUN, Delin; FORSMAN, Jan; E WOODWARD, Clifford. Current understanding of the mechanisms by which membrane-active peptides permeate and disrupt model lipid membranes. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 16, n. 2, p. 170-186, 2016.

SUPRUN, Elena V.; SHUMYANTSEVA, Victoria V.; ARCHAKOV, Alexander I. Protein electrochemistry: application in medicine. A review. **Electrochimica Acta**, v. 140, p. 72-82, 2014.

TSAI, R. et al. Spin-state changes in cytochrome P-450cam on binding of specific substrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1157-1163, 1970.

TYCKO, Robert. Amyloid polymorphism: structural basis and neurobiological relevance. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 632-645, 2015.

UDIT, Andrew K.; CONTAKES, Stephen M.; GRAY, Harry B. P450 electron transfer reactions. **Metal ions in life sciences. vol. 3. The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins**, p. 157-185, 2007.

ULIJN, Rein V.; SMITH, Andrew M. Designing peptide based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 4, p. 664-675, 2008.

URLACHER, Vlada B.; GIRHARD, Marco. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 26-36, 2012.

VERLY, Rodrigo M. et al. Structure and membrane interactions of the antibiotic peptide dermadistinctin K by multidimensional solution and oriented ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical journal**, v. 96, n. 6, p. 2194-2203, 2009.

VERRAS, Andreas; ALIAN, Akram; DE MONTELLANO, Paul R. Ortiz. Cytochrome P450 active site plasticity: attenuation of imidazole binding in cytochrome P450cam by an L244A mutation. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 19, n. 11, p. 491-496, 2006.

XU, Lian-Hua et al. Structural basis for the 4'-hydroxylation of diclofenac by a microbial cytochrome P450 monooxygenase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3081-3091, 2015.

WARRILOW, Andrew GS et al. Azole binding properties of Candida albicans sterol 14- α demethylase (CaCYP51). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4235-4245, 2010.

WESTERMARK, Per et al. Parti Nomenclature of amyloid fibril proteins: Report from the meeting of the International Nomenclature Committee on Amyloidosis, August 8-9, 1998: Editorial. 1999.

WILLIAMS, Robert W. et al. Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa. **Biochemistry**, v. 29, n. 18, p. 4490-4496, 1990.

WOODY, Robert W. Circular dichroism and conformation of unordered polypeptides. **Adv. Biophys. Chem**, v. 2, p. 37-79, 1992.

WU, Yili; HUANG, Huey W.; OLAH, Glenn A. Method of oriented circular dichroism. **Biophysical journal**, v. 57, n. 4, p. 797-806, 1990.

ZAMORA-CARRERAS, Héctor et al. Alanine scan and ²H NMR analysis of the membrane-active peptide BP100 point to a distinct carpet mechanism of

action. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 6, p. 1328-1338, 2016.

ZHANG, Li. **HEME BIOLOGY: The Secret Life of Heme in Regulating Diverse Biological Processes**. World Scientific, 2011.

ZHANG, Shuguang et al. Unusually stable β -sheet formation in an ionic self-complementary oligopeptide. **Biopolymers**, v. 34, n. 5, p. 663-672, 1994.

ZHAO, Bin et al. Structural analysis of cytochrome P450 105N1 involved in the biosynthesis of the zincophore, coelibactin. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8500-8513, 2012.

ZHAO, Jing et al. Resonance localized surface plasmon spectroscopy: sensing substrate and inhibitor binding to cytochrome P450. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 34, p. 13084-13088, 2008.