**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Andréa Ferraz De Oliveira**

# SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ANÁLOGOS CÍCLICOS DE TRIPTOFILINA

**Dissertação de mestrado**

**Brasília - DF**

**2024/2**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Andréa Ferraz De Oliveira**

# SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ANÁLOGOS CÍCLICOS DE TRIPTOFILINA

Dissertação de mestrado em Química apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito de obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração "Química Orgânica" pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília.

Orientador(a): Dr. Guilherme Dotto Brand

**Brasília - DF**

**2024/2**

**Andréa Ferraz De Oliveira**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ANÁLOGOS CÍCLICOS DE TRIPTOFILINA**

Dissertação de mestrado em Química apresentada à banca examinadora em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração "Química Orgânica" pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília.

Brasília, 13 de Dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Orientador

_____
Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado
Membro Titular

_____
Prof. Dra. Paula Alexandra de Carvalho Gomes
Membro Titular

_____
Prof. Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães
Membro Suplente

“Um dia eu chegarei lá. Eu sei que chegarei, mesmo que isso me leve não nove, mas novecentas vidas.”

- The Cat Lady

**AGRADECIMENTOS**

Que jornada, não é mesmo? Quem diria que em dois anos tantas coisas podem acontecer. Quando eu disse “sim” para fazer um mestrado, não sabia o quanto essa decisão seria uma das melhores da minha vida até então. Sendo assim, aqui vão os meus agradecimentos para todos que compartilharam esta jornada comigo de alguma forma:

Vamos começar pela pessoa que tornou isso possível, meu orientador Guilherme Dotto Brand, que além de ser um ótimo professor, também é uma ótima pessoa, realmente merece o título de “pai científico”. Agradeço por toda a orientação ao longo destes anos e por ter me permitido trabalhar com coisas tão diferentes. Hoje em dia posso dizer que leio tanto um MS quanto um RMN, além de olhar para esse trabalho e me orgulhar do que ele acabou se tornando: rico em informações. Agradeço também pelas vezes que se preocupou com a minha pessoa e meu bem estar. O laboratório se tornou uma segunda casa para mim graças a essas pequenas ações que fazem toda a diferença.

E por falar no laboratório se tornar minha segunda casa, isso também se deve aos amigos que eu fiz: Lucas, Adriana, Amanda, Ana, Daniel, Luan, Samia, Felipe, Thaíssa, Víctor. Eu agradeço por todos os momentos que tivemos. Alguns de nós compartilhamos a tensão da orgânica avançada, outros de nós compartilhamos risadas, conhecimentos, fofocas. Até mesmo minhas lágrimas foram compartilhadas com vocês em diversas ocasiões. Eu agradeço por vocês terem feito uma pessoa como eu conseguir ter a experiência de possuir uma vida social. Hoje em dia já não sou mais aquela moça que ficava isolada no cantinho do laboratório. Desejo todo o sucesso para vocês.

Claro, também não podia deixar de citar aqueles com quem muitas vezes compartilhei a capela ou a bancada sintetizando “novos filhos” (os peptídeos, como gosto de os chamar): Fernanda, João Bueno, João Gabriel, Rafael, Amir, Ricardo, Miquéias. Alguns eu ajudei, outros me ajudaram, de toda forma, todos fizeram parte da minha jornada de alguma forma. Também não podia faltar nessa lista a Wanessa, que além de me ensinar o que eu sei sobre operar um HPLC, também cuidou dos “meus filhos” durante os períodos de liofilização. Obrigada por tudo.

Agradeço também a professora Aline Lima de Oliveira Paterno, que me ensinou a ler espectros de RMN para peptídeos, sempre muito solícita. Fico muito feliz e grata pela nossa troca.

Agradeço aos meus pais, André e Catiani, pelas muitas e muitas idas e vindas. Eu sei que, não importa o que aconteça, vocês sempre estão aqui por mim, nos momentos bons e nos momentos ruins.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram com este trabalho. Primeiramente, ao Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NUPMIA - FM-UnB), onde foram realizados os ensaios de avaliação de atividades antioxidante deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos nessas áreas, Andreanne Gomes e Daniel Moreira. Agradeço também à CAPES pela bolsa de mestrado (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001).

Espero ter agraciado a todos que fizeram parte da minha jornada com uma menção, mas caso tenha me falhado a memória, dedico os mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

O estresse oxidativo, ligado a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, decorre de um desbalanço na geração de radicais livres em detrimento da atenuação destes por antioxidantes. Peptídeos antioxidantes mostram-se uma boa alternativa para a prevenção deste distúrbio por conta de seus poucos efeitos colaterais. O peptídeo PaT-2, de estrutura primária FPPWL-$NH_2$, uma triptofilina encontrada na espécie de anuro *Pithecopus azureus*, mostrou atividade antioxidante quando testado em células microgliais induzidas ao estresse oxidativo. Em prol de potencializar o efeito deste peptídeo e estudar a relação de aspectos estruturais com sua atividade, análogos cíclicos da triptofilina foram sintetizados pela técnica de SPPS (Síntese de Peptídeos em Fase Sólida) e submetidos a diversas análises. A estrutura do análogo cíclico da molécula parental, cPaT-2 (CGFPPWLGC-$NH_2$), foi elucidada pela técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e, a partir das interações intramoleculares observadas, novos análogos foram sintetizados com algumas modificações em sua estrutura primária. Estes análogos foram oxidados por AAPH e suas estruturas pós-oxidação foram analisadas pela técnica de Espectrometria de Massa (MS). Além disso, suas atividades foram avaliadas pelo ensaio TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox). Resultados indicam que a atividade antioxidante dos peptídeos parece estar centrada no resíduo de aminoácido de triptofano presente em cada análogo. A estrutura de cPaT-2 obtida por RMN não evidenciou interações entre os resíduos aromáticos, embora tenha evidenciado interações entre o resíduo de triptofano e prolina. No entanto, a capacidade antioxidante de um destes análogos, em que um resíduo de fenilalanina foi substituído por um de tirosina, exibiu atividade significativamente maior que o análogo cíclico parental, indicando potencial sinergismo entre os resíduos de tirosina e triptofano. Estes análogos cíclicos não apenas buscam potencializar a atividade de moléculas para o uso em benefício humano, mas também se apresentam um bom modelo para o estudo das relações entre estrutura molecular e antioxidante de pequenos peptídeos cíclicos.



**Palavras-chave:** Peptídeos antioxidantes, triptofilinas, estrutura peptídica, espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (RMN).

## ABSTRACT

Oxidative stress, associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, results from an imbalance in the production of free radicals and their neutralization by antioxidants. Antioxidant peptides have proven to be a good alternative as a preventive approach for this condition due to their minimal side effects. The peptide PaT-2, with primary structure FPPWL-$NH_2$, a tryptophyllin found in the anuran species *Pithecopus azureus*, showed antioxidant activity when tested on microglial cells induced into oxidative stress. In order to enhance the effect of this peptide and study the relationship between structural aspects and its activity, cyclic analogs of this tryptophyllin were synthesized using the SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) technique and subjected to various analyses. The structure of the cyclic analog of the parent molecule, cPaT-2 (CGFPPWLGC-$NH_2$), was elucidated by NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and, based on the intramolecular interactions observed, new analogs were synthesized with modifications into their primary structure. These analogs were oxidized using AAPH and their post-oxidation structures were analyzed by Mass Spectrometry (MS). Additionally, their activities were evaluated through the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) assay. Results indicate that the antioxidant activity of the peptides appears to be centered on the tryptophan amino acid residue present in each analog. The structure of cPaT-2 obtained by NMR did not reveal interactions between the aromatic residues, although it did show interactions between the tryptophan and proline residues. However, the antioxidant capacity of one of these analogues, in which a phenylalanine residue was replaced by a tyrosine residue, exhibited significantly higher activity than the parental cyclic analog, indicating potential synergism between tyrosine and tryptophan residues. These cyclic analogs not only aim to enhance the activity of molecules for human benefit but also serve as valuable models for studying the relationships between molecular structure and antioxidant activity of small cyclic peptides.

**Keywords:** Antioxidant peptides, tryptophyllins, peptide structure, mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance (NMR).

**Lista de abreviaturas**

**AAPH –** 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dicloridrato

**ABTS –** 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

**ACN –** Acetonitrila

**ANOVA –** Análise de variância

**APS –** Ammonium persulfate, em português, Persulfato de amônio

**CID –** Collision Induced Dissociation, em português, Dissociação Induzida por Colisão

**COSY –** Correlated Spectroscopy

**DCM –** Diclorometano

**DIC –** 1,3-diisopropilcarbodiimida

**diOia –** Dioxindolilalanina

**DMF –** N,N-dimetilformamida

**DNA –** Ácido Desoxirribonucléico

**EDT –** 1,2-etanoditiol

**EDTA –** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ESI –** Electrospray Ionization, em português, Ionização por Electrospray

**ET –** Electron Transfer, em português, Transferência de Elétrons

**FID –** Free Induction Decay, em tradução livre Decaimento de Indução Livre

**Fmoc –** Fluorenilmetiloxicarbonil

**Fmoc-aa –** Fmoc-aminoácido

**HAT –** Hydrogen Atom Transfer, em tradução livre Transferência de Átomo de Hidrogênio

**HPLC –** High-performance Liquid Chromatography, em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**HSQC –** Heteronuclear Single Quantum Coherence

**$IC_{50}$ –** Inhibitory Concentration 50%, em português, Concentração Inibitória 50%

**Kyn –** Quinurenina

**LC-MS –** Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, em português, Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa

**MALDI –** Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, em português, Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz

**MS –** Mass Spectrometry, em português, Espectrometria de Massa

**NFK –** N-formilquinurenina

**NOESY –** Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

**ORAC –** Oxygen Radical Antioxidant Capacity, em português chamado de Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados

**PBS –** Phosphate-buffered Saline, em português, Tampão Fosfato-salino

**ROS –** Reactive oxygen species, em português, espécies reativas de oxigênio

**RMN –** Ressonância Magnética Nuclear

**RMSD –** Root Mean Square Deviation, em português, Desvio Quadrático Médio

**RNA –** Ácido Ribonucléico

**RNS –** Reactive nitrogen species, em português, espécies reativas de nitrogênio

**ROESY –** Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

**SPPS –** Solid Phase Peptide Synthesis, em português, Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

**PIC –** 3-hidroxipirroloindol

**tBu –** Terc-butila

**TEAC –** Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, em tradução livre, Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox

**TFA –** Ácido trifluoroacético

**TOCSY –** Total Correlation Spectroscopy

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** **1**

**2. OBJETIVO** **4**

2.1. Objetivo geral 4

2.2. Objetivos específicos 4

**3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** **6**

3.1. Peptídeos antioxidantes 6

3.2. Triptofilinas 8

3.3. Interações não covalentes entre pares aromáticos em peptídeos 11

3.4. Relações entre atividade antioxidante de peptídeos e suas estruturas moleculares 15

3.5. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS) 18

3.6. Sequenciamento de peptídeos por Espectrometria de Massa (MS) 21

3.7. Determinação da estrutura tridimensional de peptídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 23

3.8. Os ensaios ORAC e TEAC 29

**4. METODOLOGIA** **33**

4.1. Síntese dos peptídeos lineares por SPPS 33

4.1.1. Suporte sólido 33

4.1.2. Preparo da resina 33

4.1.3. Desproteção e lavagem 34

4.1.4. Teste de Kaiser 35

4.1.5. Acoplamento de aminoácidos 36

4.1.6. Clivagem 39

4.2. Oxidação dos resíduos de cisteína para formação da ligação dissulfeto 41

4.3. Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de Massa (MS) 42

4.4. Purificação dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) 42

4.5. Análise do cPaT-2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 43

4.6. Ensaio de inibição de hemólise 44

4.7. Análise estatística 45

4.8. Análises por LC-MS/MS dos peptídeos oxidados com AAPH 45

4.9. Avaliação de capacidade antioxidante por ABTS 46
**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 48**
5.1. Síntese do cPaT-2 linear e sua caracterização por MS 48
5.2. Oxidação do cPaT-2 e sua caracterização por MS 55
5.3. Purificação do cPaT-2 64
5.4. Caracterização estrutural do cPaT-2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 65
5.5. Ensaio de inibição de hemólise induzida por AAPH para o PaT-2 e o cPaT-2 87
5.6. Síntese e purificação dos análogos cíclicos advindos do cPaT-2 89
5.7. LC-MS/MS dos peptídeos submetidos a oxidação por AAPH 102
5.8. Ensaios de atividade antioxidante com ABTS 120
**6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 124**
**REFERÊNCIAS**
**ANEXOS**

## 1. INTRODUÇÃO

Nos organismos aeróbicos, as células produzem radicais livres por várias vias, muitos deles advindos da própria respiração. Estas espécies são necessárias para diversos processos fisiológicos, agindo como sinalizadores redox para expressão de genes, defensores imunológicos, relaxadores de vasos sanguíneos, dentre outras funções[1,2]. Em contrapartida aos radicais livres, os antioxidantes também são produzidos pelo corpo do indivíduo ou adquiridos por meios exógenos, sendo estes moléculas que atuam na redução de radicais livres presentes no organismo[3]. O balanço entre radicais livres e antioxidantes é fundamental para uma boa saúde, sendo o estresse oxidativo um desbalanço no organismo favorecendo a geração de radicais livres em detrimento a atenuação destes por antioxidantes[4].

Durante o estresse oxidativo, o organismo se torna um meio mais oxidante em vista do aumento da concentração de radicais livres, o que gera danos a várias biomoléculas essenciais para as células, causando o seu mau funcionamento, como alterações no DNA, nas proteínas e a peroxidação de lipídios que constituem as membranas celulares[5]. Biomarcadores de estresse oxidativo já foram associados a doenças em vários sistemas, como o cardiovascular, endócrino, respiratório, renal ou imunológico[6]. Além disso, o estresse oxidativo foi atrelado a doenças como Alzheimer, Parkinson e câncer[4].

Peptídeos antioxidantes são promissores na manutenção da homeostase redox do organismo e prevenção do estresse oxidativo, uma vez que apresentam poucos efeitos colaterais, algo nem sempre alcançado por fármacos sintéticos. Outras vantagens associadas ao uso de peptídeos antioxidantes está na sua versatilidade, uma vez que podem ser empregados como ingredientes em alimentos ou cosméticos[7], auxiliando também na conservação e aumentando o prazo de validade dos produtos, o que gera ganho econômico em vista do aumento de tempo em que podem ser vendidos[8].

A pele de anfíbios anuros possui uma variedade de peptídeos com diferentes atividades, como neurotóxicos, antivirais, analgésicos, vasodilatadores, antimicrobianos, dentre outros[9,10]. Partindo da hipótese de que a pele de um anuro precisa de uma nova proteção desde sua fase de transição larval para adulta, Barbosa et al. (2021) identificaram um novo peptídeo com capacidade antioxidante testada em

células microgliais que foram induzidas ao estresse oxidativo. Essa transição, marcada pela passagem de uma vida aquática para uma vida terrestre, expõe os animais a uma maior concentração de oxigênio e exposição a luz solar direta, resultando em um ambiente mais oxidante[11].

O peptídeo em questão, de estrutura primária FPPWL-$NH_2$ e nomeado PaT-2, faz parte da família das triptofilinas, uma família de peptídeos encontrados na secreção da pele de anuros caracterizada por apresentar resíduos de triptofano e prolina. As triptofilinas foram identificadas, pela primeira vez, a partir de um simples teste químico colorimétrico, não possuindo um hormônio correlato em mamíferos, o que tornou sua atividade biológica algo incerto até os dias atuais[11,12].

No trabalho de Barbosa et al. (2021), resultados do estudo *in silico* feito com o PaT-2 sugeriram que a atividade antioxidante deste peptídeo está centrada nos resíduos de fenilalanina e triptofano presentes em sua estrutura primária, atuando como centros reativos na presença de radicais livres[11]. Anéis aromáticos podem realizar interações não covalentes entre si, sendo a ocorrência dessa interação entre pares aromáticos triptofano-fenilalanina algo comprovado na análise de várias estruturas de proteínas obtidas em banco de dados[13,14]. Acredita-se que essas interações, além de outras, auxiliam na estabilização da estrutura tridimensional de proteínas e peptídeos[15]. A presença de resíduos de aminoácidos aromáticos também já foi sugerida como importante para a atividade antioxidante de peptídeos[7]. A partir dessas observações, surge a hipótese de que uma interação entre os resíduos aromáticos da triptofilina PaT-2 possam ter algum efeito na modulação de sua atividade antioxidante.

Com o objetivo de estudar a estrutura tridimensional do peptídeo e correlacioná-la com sua atividade, este trabalho buscou a síntese de um análogo cíclico da triptoflina, de forma a promover uma maior rigidez na estrutura da molécula e possibilitar sua análise pela técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear). A partir da estrutura gerada, a qual serve como modelo para compreender as interações presentes na molécula, novos análogos cíclicos foram projetados com mutações pontuais em sua estrutura primária, com a finalidade de aprimorar a atividade antioxidante da triptofilina e desenvolver versões ainda mais potentes do peptídeo.

O análogo cíclico do PaT-2, denominado cPaT-2, possui estrutura primária CGFPPWLGC-$NH_2$, no qual os resíduos de glicina foram inseridos para agirem como espaçadores entre a estrutura original da triptofilina e os resíduos de cisteínas, estes definidos para permitir a ciclização do peptídeo através de uma ligação dissulfeto. Este análogo já havia sido previamente concebido em um esforço anterior do nosso grupo, com sua estrutura inicialmente proposta por modelagem molecular utilizando a ferramenta PEP-FOLD2[16]. Contudo, sua estrutura em solução não foi determinada experimentalmente.

Após a síntese química do cPaT-2, sua estrutura tridimensional foi calculada com base nos sinais obtidos por espectros bidimensionais adquiridos por RMN. Essa técnica possibilita a identificação de interações entre átomos através de ligações e átomos próximos através do espaço. A estrutura obtida serviu como base para o desenvolvimento de novos análogos cíclicos com alterações pontuais em sua estrutura primária, nomeados cPaT-W (CGWPPWLGC-$NH_2$), cPaT-Y (CGYPPWLGC-$NH_2$) e cPaT-A (CGFAAWLGC-$NH_2$).

Todos os análogos cíclicos foram submetidos a análises visando identificar alterações estruturais após procedimento oxidativo e avaliar suas capacidades antioxidantes. Os peptídeos passaram por um processo de oxidação induzido por AAPH e, em seguida, foram analisados por Espectrometria de Massa (MS), sendo os dados obtidos utilizados para identificar as mudanças ocorridas nas moléculas após a oxidação. Além disso, suas atividades antioxidantes foram avaliadas e comparadas por meio do ensaio TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Sintetizar um análogo cíclico da triptofilina, nomeado cPaT-2, de estrutura primária CGFPPWLGC-$NH_2$, e determinar a sua estrutura tridimensional através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), buscando encontrar indícios de interações não covalentes entre os resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na triptofilina. Além disso, correlacionar aspectos estruturais da molécula com a atividade biológica diferencial de outros análogos cíclicos derivados do cPaT-2, bem como caracterizar suas mudanças estruturais pós-oxidação por Espectrometria de Massa (MS).

### 2.2. Objetivos específicos

1) Sintetizar o peptídeo linear cPaT-2 através do método Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS).

2) Promover a oxidação dos resíduos de cisteína presentes no peptídeo linear cPaT-2, formando um peptídeo cíclico através da ligação dissulfeto entre as cadeias laterais das cisteínas.

3) Realizar a caracterização e purificação do produto obtido através das técnicas de Espectrometria de Massa (MS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), respectivamente.

4) Analisar o peptídeo cPaT-2 purificado e caracterizado pela técnica de RMN a fim de elucidar sua estrutura tridimensional.

5) Avaliar a atividade antioxidante diferencial do cPaT-2 em relação ao PaT-2 em eritrócitos.

6) Realizar a síntese, caracterização e purificação dos análogos cíclicos derivados do cPaT-2: cPaT-W, cPaT-Y e cPaT-A, conforme os objetivos 1, 2 e 3 feitos para o cPaT-2.

7) Avaliar por LC-MS/MS as mudanças estruturais sofridas pelos peptídeos cíclicos após serem submetidos a processos oxidativos.

8) Avaliar e comparar a capacidade antioxidante entre os análogos cíclicos.

# 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1. Peptídeos antioxidantes

Antioxidantes estão presentes nos seres vivos como um meio de combate ao estresse oxidativo, mantendo a homeostase redox no ambiente intra e extracelular, sendo substâncias que previnem o dano oxidativo a outras moléculas[3]. O estresse oxidativo advém de um desbalanço no organismo favorecendo a geração de radicais livres em detrimento a sua atenuação por antioxidantes[4], sendo essa condição atrelada ao envelhecimento[17] e também a várias enfermidades, como Alzheimer, Parkinson, câncer e doenças cardiovasculares[4].

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado em sua camada de valência[2] e, por conta disso, são espécies instáveis e reativas, podendo doar um elétron para outra substância ou abstrair um elétron desta[17]. Os principais radicais livres formados no organismo são as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) e espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês “reactive nitrogen species”). Os ROS mais comuns são superóxido ($O_2$•-), radical hidroxila (•OH), radicais alcoxila (RO•), radicais peroxila (ROO•) e o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$). O último não é um radical livre, porém é um precursor importante de radicais livres de oxigênio e, portanto, acaba sendo posto na categoria de ROS. Os RNS mais comuns são o óxido nitroso (NO•) e o peroxinitrito (ONOO-). O segundo, assim como o $H_2O_2$, não é um radical livre, porém é formado a partir de radicais livres (NO• e $O_2$•-) e é nocivo a várias moléculas presentes nas células, como enzimas[5].

ROS e RNS são gerados por várias vias metabólicas, desempenhando funções importantes como sinalizadores redox[3]. O peróxido de hidrogênio, por exemplo, pode ser formado a partir da enzima superóxido dismutase utilizando como substrato o superóxido ($O_2$•-), que é originado na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria[2]. O $H_2O_2$ desempenha funções importantes como defensor imunológico contra bactérias, sinalizador para expressão de genes e a morte celular programada[1]. O óxido nitroso atua no relaxamento de células presentes nos vasos sanguíneos[2], podendo ser gerado a partir da enzima óxido nítrico sintase, ao qual usa como substrato a L-arginina[5].

Antioxidantes agem de várias formas para inibir a produção de radicais livres no organismo. Comumente, eles podem ser classificados em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes enzimáticos atuam na conversão de oxidantes nocivos para moléculas não nocivas, como a já citada superóxido dismutase em conjunto com a catalase (converte peróxido de hidrogênio em água) ou a glutationa peroxidase (converte hidroperóxidos em água e álcoois correspondentes, atuando no reparo de lipídios peroxidados). Antioxidantes não enzimáticos costumam ser moléculas de baixa massa molecular que agem na captura de radicais livres pela doação ou abstração de um elétron, transformando os radicais livres em moléculas não radicalares, enquanto o antioxidante em si adquire um elétron a mais, porém consegue estabilizá-lo. São exemplos de antioxidantes não enzimáticos as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides e a glutationa[5,17].

Antioxidantes também podem ser classificados por outros critérios, como solubilidade (solúveis em meio aquoso ou meio lipídico), tamanho (baixa ou alta massa molar) e origem (codificados por gene ou não)[5,9]. Outro grupo de antioxidantes que merece destaque são proteínas que se ligam a metais de transição. Os metais de transição podem gerar radicais hidroxila através de reações como a Fenton ou a Haber–Weiss (ambas com ferro), contudo, metais ligados a proteínas não estão livres no organismo para essas reações. A ferritina, por exemplo, é uma proteína que se liga ao ferro, atuando como reservatório deste metal no organismo e, por consequência, também agindo como um antioxidante[17].

Radicais livres e antioxidantes são produzidos e consumidos pelo organismo constantemente, sendo seu equilíbrio necessário para uma boa saúde. Quando um sistema biológico está passando pelo estresse oxidativo, a ocorrência de radicais livres torna-se exacerbada ao ponto destes reagirem com alvos não específicos, causando reações em cadeia que são danosas para várias biomoléculas[3]. O radical hidroxila, por exemplo, pode reagir com o DNA, mais especificamente nas bases nitrogenadas guanina ou nas desoxirriboses, causando mutações. Outro dano comum dos radicais livres é a geração de radicais lipídicos que, posteriormente, levam a peroxidação lipídica, que causa danos à membrana das células[5].

Dentre as possíveis moléculas para combater tais complicações, os peptídeos antioxidantes são cotados como uma boa alternativa para a prevenção do

estresse oxidativo em vista de suas origens naturais, tendo poucos efeitos colaterais em humanos, o que nem sempre pode ser alcançado por fármacos[7]. Além disso, eles podem ser aplicados de várias formas, sendo introduzidos como ingredientes em alimentos ou cosméticos, por exemplo. Outra aplicação está na conservação dos alimentos, pois aumentam a validade de produtos ao atrasar processos oxidativos que alteram suas propriedades organolépticas, o que mitiga perdas econômicas[8]. Vários peptídeos antioxidantes já foram encontrados originários de proteínas de plantas e frutos do mar, muitos presentes na alimentação humana como milho, arroz ou ostra. Tais peptídeos podem ser liberados *in vivo* na digestão ou produzidos *in vitro* através de hidrólise enzimática ou fermentação[7].

Peptídeos antioxidantes também já foram encontrados em extratos de glândulas presentes na pele de anfíbios[9,18], como mostra o trabalho de Yang et al. (2009), que encontrou na pele de apenas uma espécie 28 peptídeos antioxidantes diferentes, dos quais foram distribuídos em 11 grupos. Yang, inclusive, discute sobre a possibilidade de peptídeos antioxidantes serem uma classe específica de antioxidantes no organismo, uma vez que são codificadas por genes, porém não atuam como enzimas, mas sim como moléculas que capturam radicais livres, como os antioxidantes não enzimáticos (dos quais não são codificados por genes, sendo moléculas adquiridas na dieta ou produzidas por vias metabólicas)[9].

### 3.2. Triptofilinas

Triptofilinas são um grupo de peptídeos encontrados na secreção cutânea de anuros, sendo pela primeira vez isolados na secreção da espécie *Phyllomedusa rohdei*, encontrada na América do Sul, em 1985, por Pier Montecucchi[19]. As triptofilinas são caracterizadas por serem peptídeos pequenos (menos de 15 aminoácidos) e possuírem um resíduo de triptofano na posição 2 a partir do C-terminal e um ou dois resíduos de prolina nas posições 2 ou 3 a partir do N-terminal[20]. O avanço dos estudos das triptofilinas, no entanto, mostrou que essa família de peptídeos é muito diversificada e existem várias exceções à regra, de forma que peptídeos não enquadrados estritamente nessas definições sejam incluídos neste grupo[12].

A classificação das triptofilinas foi introduzida por Chen et al. (2004), que as dividiram em três grupos distintos com base nos resíduos de aminoácido conservados contidos nas suas cadeias peptídicas. O grupo T-1 inclui triptofilinas com 7 ou 8 resíduos de aminoácidos, possuindo 4 deles conservados: Lys1, Pro2, Trp5 e Pro7. O grupo T-2 abriga triptofilinas contendo de 4 a 7 aminoácidos, possuindo uma porção interna Pro-Trp. Por fim, o grupo T-3 contém triptofilinas com 13 resíduos de aminoácidos, sendo 9 deles conservados: pGlu1, Lys3, Pro4, Pro7, Pro8, Pro9, Ile10, Tyr11 e Pro12. O que mais chama atenção neste grupo é a alta conservação dos resíduos de prolina[21]. Posteriormente, Samgina et al. (2010) discorreram sobre a existência de triptofilinas que não se enquadram nessas três classificações, sendo estas compreendidas em um quarto grupo chamado “tryptophyllin-like peptides”, cuja tradução para português fica “peptídeos relacionados às triptofilinas”[12].

Diferente da maioria das famílias de peptídeos encontrados na secreção da pele de anuros, como bradicininas, taquicininas, dermorfinas, dentre outros, as triptofilinas não possuem algum correlato em mamíferos, sendo sua identificação atribuída a realização do teste colorimétrico de Ehrlich, o qual revelou a presença do indol do resíduo de triptofano[10,12]. O nome “triptofilina” (no inglês, tryptophyllin), inclusive, surgiu a partir da observação da presença do triptofano e da origem dos peptídeos (a espécie “*Phyll”omedusa rohdei*)[19]. Essas observações tornam as triptofilinas os primeiros peptídeos encontrados em sapos que foram identificados apenas por propriedades químicas, sendo a função dessa família de peptídeos no organismo, até os dias de hoje, algo incerto[21]. Vários estudos já foram realizados para diferentes possíveis atividades, existindo exemplos de testes positivos e também negativos, conforme mostra a Tabela 1. Triptofilinas já foram encontradas na espécie de sapo filogeneticamente mais antiga ainda existente, *Ascaphus truei*, mostrando que essa família de peptídeos não está contida em apenas um gênero ou família de anuros e que foi conservada para novas espécies ao longo do tempo[22].

Tabela 1: Triptofilinas e suas atividades

| Nome | Estrutura primária | Grupo | Atividade | Ano, referência |
|---|---|---|---|---|
| Met-5-TPH-amide | FPPWM-$NH_2$ | T-2 | Imunorreatividade em algumas células da adenohípofise de ratos (usando antissoro da triptofilina) | 1985, [23] |

Tabela 1: (Continuação)

| Nome | Estrutura primária | Grupo | Atividade | Ano, referência |
|---|---|---|---|---|
| L4 | pGlu-IPWFHR-$NH_2$ | T-2 | Atividade não encontrada, testada em músculo liso do íleo de porquinho da índia | 1994, [24] |
| PdT-1 | KP-Hyp-AWVP-$NH_2$ | T-1 | Relaxamento de músculo liso arterial e contração de músculo liso intestinal, ambos em ratos | 2004, [21] |
| PdT-2 | DMSPPWH-$NH_2$ | T-2 | Contração de músculo liso urinário de ratos | 2009, [25] |
| HaTL-5 | FLPFFP-$NH_2$ | TLP* | Atividade não encontrada, testada para agir como antibacteriano e inibitória de NO | 2010, [12] |
| PsT-1 | KPPPWVPW | T-1 | Inibição de bradicinina em músculo liso arterial de ratos e inibição da proliferação de células cancerosas da próstata | 2013, [26] |
| AcT-3 | pGlu-GKPYWPPPFLPE | TLP* | Inibição de bradicinina em músculo liso arterial de ratos, contração de músculo liso intestinal de ratos e inibição da proliferação de células cancerosas da próstata | 2015, [10] |
| Peptide 1.2 | FPWL-$NH_2$ | T-2 | Atividade antioxidante positiva (testado pelo método “ABTS Radical Scavenging Assay”, em tradução livre, “Ensaio de eliminação de radicais ABTS”) | 2021, [27] |

*TLP é a sigla para “tryptophyllin-like peptides” (peptídeos relacionados às triptofilinas)

Recentemente, Barbosa et al. (2021) identificaram uma nova triptofilina na secreção da pele de uma espécie de anuro (*Pithecopus azureus*) na sua etapa de transição de uma vida aquática (fase larval) para a terrestre (fase adulta). A triptofilina, de estrutura primária FPPWL-$NH_2$ e nomeada PaT-2, apresentou atividade antioxidante quando testada em células microgliais que foram induzidas a produzir ROS e RNS. A hipótese de que peptídeos antioxidantes poderiam ser encontrados na transição da fase aquática para terrestre de um anfíbio veio a partir da mudança de ambiente associada a essa transição. Em um ambiente terrestre, a pele do anfíbio

torna-se mais suscetível à incidência de sol e oxigênio, uma vez que a água serve como barreira para radiação ultravioleta e a concentração de oxigênio na água é menor do que a encontrada no ar. Portanto, quando o anuro passa de uma fase de vida aquática para uma terrestre, sua pele fica exposta a um ambiente mais oxidativo, sendo necessárias defesas no organismo para lidar com esses novos desafios, visto que a pele dos anfíbios é um órgão que desempenha funções fundamentais para a sobrevivência, como trocas gasosas ou proteção contra predadores. Além da atividade antioxidante, a triptofilina também apresentou baixa citotoxicidade, sendo uma boa candidata para mais estudos no campo dos peptídeos antioxidantes[11]. É importante salientar, contudo, que são inúmeras as modificações fisiológicas que acompanham essa transição, de forma que, mais uma vez, não se pode ter certeza da função biológica dos peptídeos desta família.

### 3.3. Interações não covalentes entre pares aromáticos em peptídeos

Interações não covalentes estão presentes na estruturação de peptídeos e proteínas, contribuindo para a estabilização de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. Tal estruturação ou as interações em si podem estar relacionadas com a atividade apresentada por essas moléculas[15]. Interações não covalentes envolvendo aminoácidos aromáticos são facilmente encontradas na natureza e facilitam processos biológicos, como a formação de complexos proteína/DNA ou proteína/RNA realizados nos processos de transcrição e tradução, etapas da biossíntese de peptídeos nas células[28].

No trabalho de Barbosa et al. (2021), estudos *in silico* foram realizados para avaliar o potencial redox da triptofilina PaT-2, sendo mostrado, através dos resultados, que a atividade antioxidante deste peptídeo está centrada nos resíduos de fenilalanina e triptofano existentes na cadeia peptídica, ambos atuando como centros reativos na presença de radicais livres[11]. A Figura 1 apresenta estes resultados.

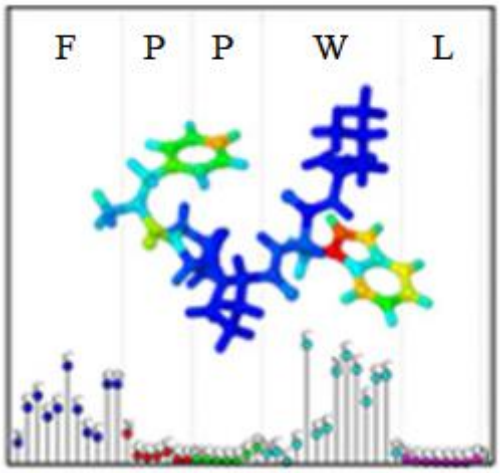



*Figura 1: Predição do perfil reacional do PaT-2 com radicais livres. As cores mais avermelhadas na representação estrutural indicam sítios muito reativos, enquanto as cores mais azuladas indicam sítios pouco reativos, ref. 11.*

Como revisto por Zou et al. (2016), resíduos de aminoácidos aromáticos contribuem significativamente para a atividade antioxidante de peptídeos, bem como a interação entre estes. O resíduo de triptofano chama atenção pela sua capacidade de doação de próton para uma espécie radicalar, além da estabilização do novo radical formado através do anel indólico. Também já foi mostrado que a atividade antioxidante total de um peptídeo depende dos resíduos de aminoácidos próximos ao aminoácido reativo[7]. No estudo de Thomas et al. (2002), um banco de dados de 593 proteínas foi analisado à procura de interações entre pares de resíduos de aminoácidos aromáticos. No caso das interações feitas com o triptofano, foi mostrado que a maioria dos pares encontrados foi com resíduos de fenilalanina[14].

Essas informações levam à hipótese de que os resíduos aromáticos na triptofilina PaT-2 possam interagir entre si e que essa interação pode ter algum efeito na atividade antioxidante encontrada neste peptídeo, como uma melhor estabilização da espécie radicalar formada após a reação com radicais livres. A estrutura molecular do cPaT-2 foi predita por meio da ferramenta PEP-FOLD2[16], como apresentado na Figura 2. A estrutura de menor energia obtida mostra as cadeias laterais dos resíduos de fenilalanina e triptofano próximas espacialmente. Contudo, somente este dado não pode informar se estas porções aromáticas estão, de fato, realizando uma interação não covalente entre os resíduos aromáticos.

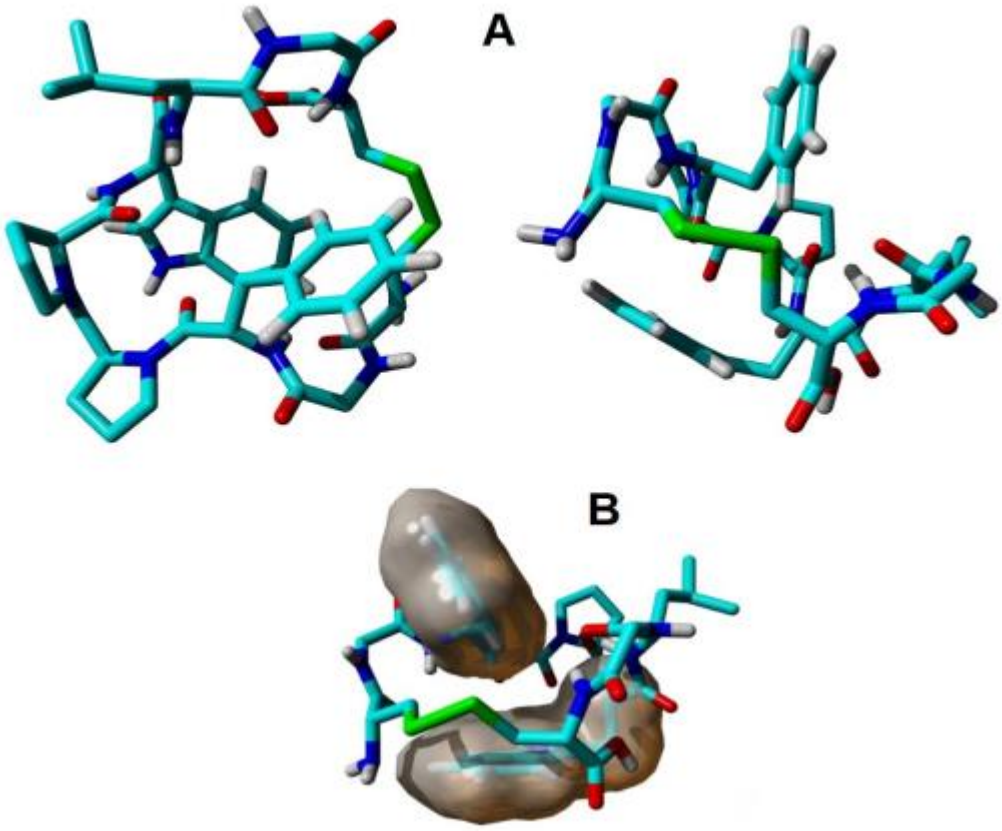



*Figura 2: A) Estrutura de menor energia obtida para o cPaT-2 através do PEP-FOLD2. B) Estruturas aromáticas em destaque englobadas pela nuvem marrom, ref. 16.*

O termo “π stacking” é comumente utilizado para designar interações não covalentes entre porções aromáticas de uma ou mais moléculas[13]. Como exemplo da importância das interações entre resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas está um estudo comparando dois homólogos de Subtilisina, uma serino protease, um deles adaptado para ambientes psicrofílicos e o outro para ambientes termofílicos. Foi observado que a Subtilisina termofílica continha 11 interações entre aromáticos a mais do que a Subtilisina psicrofílica, indicando que as interações aromáticas estabilizam a proteína para não desnaturar em ambientes mais quentes. A relação entre interações aromáticas e a formação de fibrilas amilóides também vem sendo estudada[28], uma vez que essas fibrilas estão relacionadas com doenças como Alzheimer e Parkinson[29]. A ocorrência de aminoácidos aromáticos na estrutura primária de proteínas, apesar de nem sempre indicar a formação de fibrilas amilóides, aumenta as chances de agregação[28].

Apesar deste tipo de interação entre aromáticos ser chamada de “π stacking”, aparentemente designando uma interação de face-centrada entre os

aromáticos, ou seja, um empilhamento de anéis aromáticos paralelamente alinhados e centrados no mesmo eixo vertical, este tipo de interação é um caso específico visto em pares de aromáticos onde um deles é rico em elétrons e o outro pobre em elétrons. Um termo mais apropriado para designar qualquer tipo de interação não covalente entre aromáticos poderia ser “interações aromático-aromático” ou “interações entre pares aromáticos”. No caso da maioria dos aromáticos, considerados ricos em elétrons, os elétrons π aromáticos geram uma densidade de carga que se assemelha a um momento quadrupolar, onde ocorre uma maior densidade de carga negativa nas faces superior e inferior do anel e uma maior densidade de carga positiva nas periferias do anel. Esse arranjo de densidade de carga favorece interações do tipo borda-face, onde os anéis estão arranjados perpendicularmente um ao outro, e interações do tipo paralelo-descentralizado, onde os anéis estão paralelos um ao outro, mas não centrados no mesmo eixo vertical[13]. Estes conceitos estão ilustrados na Figura 3.

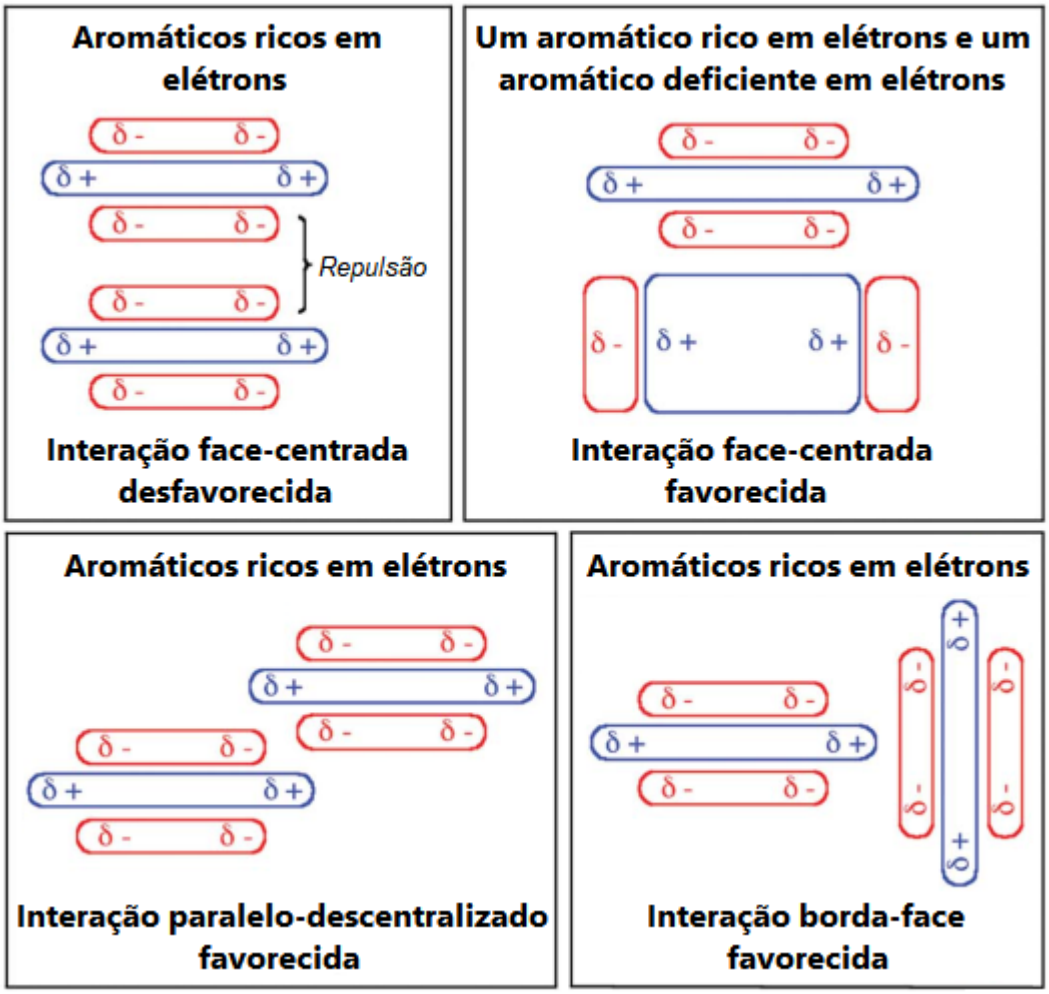



*Figura 3: Diferentes arranjos para interações do tipo aromático-aromático, adaptado ref. 13*

De encontro às formas pelas quais aromáticos podem interagir não-covalentemente, a interação entre pares de resíduos de triptofano e fenilalanina tendem a assumir arranjos perpendiculares segundo o estudo de Samanta, Tal e Chakrabarti (1999), onde foram analisadas mais de 600 pares de interações aromático-aromático vindas de proteínas presentes em um banco de dados. Na maioria dos casos, a face aromática do triptofano interage com a borda do aromático da fenilalanina. Também foram encontradas interações do tipo paralelo-descentralizado, embora em menor número[30]. Segundo a estrutura *in silico* do cPaT-2 apresentada na Figura 2, a orientação entre as porções aromáticas do triptofano e da fenilalanina estão de acordo com a maioria dos casos observados no estudo mencionado.

Em prol de estudar a relação entre a atividade antioxidante da triptofilina PaT-2 e uma possível interação entre os resíduos aromáticos encontrados no peptídeo, o presente trabalho buscou a síntese do análogo cíclico da triptofilina em questão, nomeado cPaT-2, para que tal possível interação aromático-aromático fosse favorecida. A estrutura primária do cPaT é CGFPPWLGC-$NH_2$ (estrutura aberta mostrada na Figura 4). Os resíduos de glicina são espaçadores entre a estrutura original da triptofilina e os dois resíduos de cisteína localizados no N-terminal e C-terminal, que servem para ciclizar o peptídeo através de uma ligação dissulfeto.

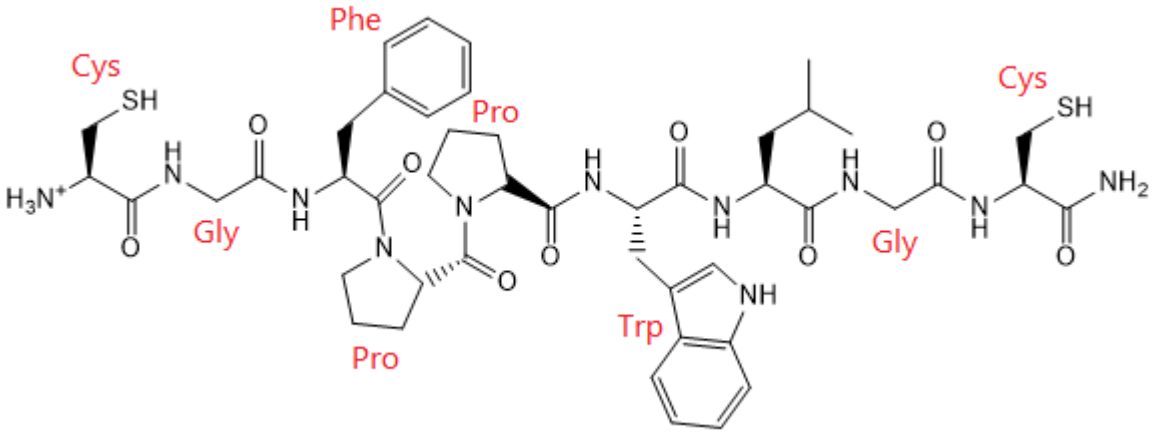



*Figura 4: Estrutura linear do peptídeo cPaT-2.*

### 3.4. Relações entre atividade antioxidante de peptídeos e suas estruturas moleculares

Peptídeos antioxidantes apresentam uma variedade ampla de estruturas primárias e compreender a relação entre aspectos estruturais e a função apresentada por essa classe de moléculas é fundamental para orientar a descoberta e aperfeiçoamento de novos compostos. Determinados elementos estruturais compartilhados, como massa molecular, presença de determinados aminoácidos e sequência, já foram identificados como fatores que influenciam a atividade antioxidante desses peptídeos. No entanto, as relações entre estrutura e atividade dessas moléculas permanecem não bem estabelecidas[31].

Quando o aspecto considerado é a massa molecular, peptídeos com massas menores tendem a apresentar melhor atividade antioxidante em comparação aos de maior massa molecular[8]. No estudo de Zou et al. (2016), a massa de 42 peptídeos antioxidantes avaliados variou entre aproximadamente 200 e 1500 Da[7]. No caso de peptídeos cujo mecanismo de ação se dá por captura de radicais, acredita-se que o desempenho superior dos peptídeos de menor massa esteja associado a um menor impedimento estérico e repulsão, facilitando sua interação com os radicais[8].

Quanto à presença de determinados aminoácidos, alguns são comumente mais citados como contribuintes para a atividade antioxidante de peptídeos. Resíduos de aminoácidos como triptofano, tirosina, histidina e cisteína podem atuar como doadores de hidrogênio, agindo na captura de radicais livres e desempenhando um papel importante em sua neutralização. A metionina também é considerada, uma vez que pode doar elétrons e ser oxidada a sulfóxido de metionina. Resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, valina, fenilalanina, alanina e prolina, também são ditos importantes, uma vez que melhoram a solubilidade em ambientes lipídicos, facilitando a interação dos peptídeos com a membrana plasmática e ácidos graxos. Além disso, resíduos aromáticos ou carregados podem atuar como quelantes de íons metálicos, inibindo a formação de radicais livres induzidos por estes[31]. A Figura 5 ilustra alguns destes aspectos.

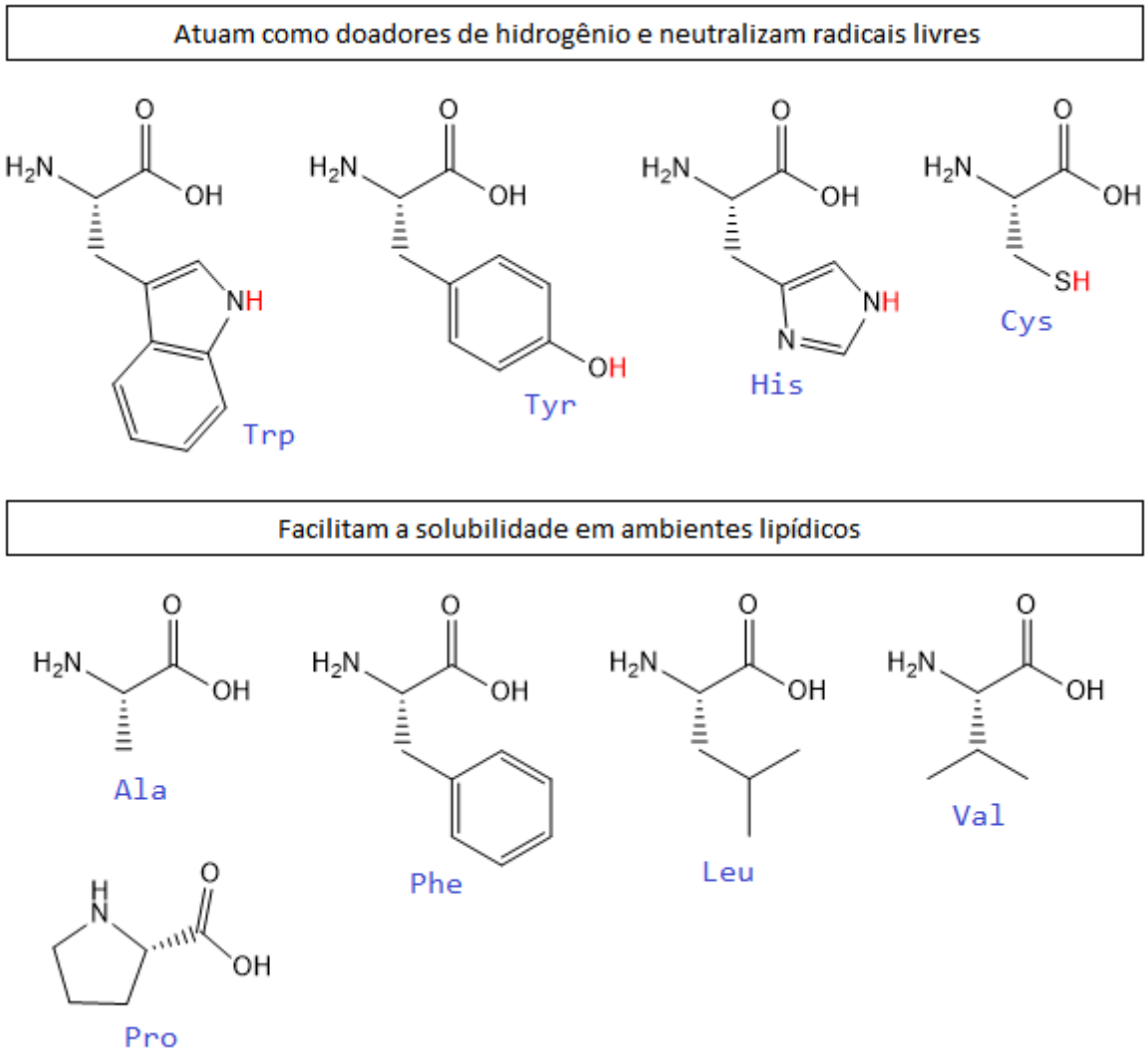



*Figura 5: Aminoácidos contribuintes para a atividade antioxidante de peptídeos de acordo com suas possíveis funções.*

O estudo de Yang et al. (2009) exemplifica a importância de certos aminoácidos para a atividade antioxidante de peptídeos. Em todos os 11 grupos de peptídeos antioxidantes encontrados no trabalho, os resíduos de prolina, metionina, cisteínas livres, tirosina e triptofano foram substituídos por resíduos de glicina. A troca de todos estes resíduos em um mesmo peptídeo anulou completamente a atividade antioxidante antes apresentada[9].

A sequência dos aminoácidos na cadeia peptídica também parece interferir na atividade antioxidante dos peptídeos, uma vez que a troca de posição afeta interações intramoleculares que podem facilitar ou não os mecanismos pelo qual determinado peptídeo realiza sua atividade antioxidante. Como exemplo, o resíduo de prolina tende a influenciar significativamente o ordenamento tridimensional de um peptídeo por conta de sua estrutura cíclica. A troca de sua posição na sequência pode

alterar esse ordenamento, interferindo positiva ou negativamente na atividade apresentada. Também já foi avaliado que determinados aminoácidos na posição N-terminal ou C-terminal podem afetar substancialmente o efeito antioxidante de peptídeos[7].

No estudo de Torkova et el. (2015), vários dipeptídeos contendo tirosina e outro aminoácido tiveram suas capacidades antioxidantes avaliadas trocando a posição do resíduo de tirosina entre o N-terminal e o C-terminal. Através dos resultados, foi observado que os dipeptídeos cujo resíduo de tirosina estava na posição N-terminal apresentaram uma maior atividade antioxidante[32]. Este mesmo padrão também foi notado com dipeptídeos contendo o resíduo de triptofano no estudo de Zheng et al. (2016)[33]. Além disso, também foi observado um efeito sinérgico no dipeptídeo Trp-Tyr quando submetido a avaliação de atividade antioxidante, atribuído a uma possível transferência intramolecular de um radical presente no anel fenólico da tirosina para o triptofano[32]. Esta sinergia entre triptofano e tirosina não necessariamente depende dos aminoácidos estarem adjacentes na cadeia peptídica, uma vez que esse tipo de atividade neutralizadora de radicais livres já foi observada em um peptídeo em que a tirosina ocupava a posição 5 da cadeia e o triptofano a posição 14, tendo uma distância média de 6 Å entre o oxigênio fenólico da tirosina e o nitrogênio indólico do triptofano na estrutura tridimensional calculada[34].

O peptídeo cPaT-2 apresenta uma massa molecular (976,21 Da) dentro da faixa considerada para os peptídeos antioxidantes. Ademais, contém aminoácidos centrais para a apresentação desta atividade, como o triptofano e a cisteína, além de resíduos hidrofóbicos como leucina, fenilalanina e triptofano. A condensação desses aminoácidos em uma estrutura cíclica pode favorecer interações intramoleculares entre os resíduos, tendo o potencial de aumentar a atividade do peptídeo. Outros análogos, como cPaT-Y e o cPaT-A, exploram outros resíduos de aminoácidos importantes, como tirosina e alanina. Estes aspectos fazem do cPaT-2 e seus análogos bons modelos para o estudo da relação entre estrutura e função dessa classe de moléculas.

### 3.5. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPPS)

A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (do inglês “Solid Phase Peptide Synthesis”, SPPS) é uma técnica de síntese de peptídeos introduzida por Bruce Merrifield em 1963[35]. Apesar de vários avanços terem sido realizados em relação aos reagentes utilizados por Merrifield, o conceito segue o mesmo e é o método mais comum para a síntese de peptídeos[36].

A técnica tem por base a síntese do peptídeo atrelado a um suporte sólido (no caso, uma resina), o que facilita processos de purificação em comparação com sínteses em solução, uma vez que basta realizar lavagem e filtração na resina para a retirada de reagentes e solventes. O método também reduz a perda física de produto, já que não é necessário o transporte de material de um recipiente para outro durante a síntese. Outra vantagem associada à SPPS é a possibilidade da utilização de reagentes em excesso, o que garante um melhor rendimento da reação[35], embora não possa ser negligenciado que isso representa mais gasto destes.

O princípio da SPPS segue alguns passos chave que estão ilustrados na Figura 6, começando pelo acoplamento do aminoácido C-terminal da cadeia peptídica, com sua porção amina protegida, no suporte sólido através de um “linker”, que varia entre resinas. Posteriormente, o grupo de proteção da amina é removido e o próximo aminoácido, também com sua porção amina protegida, é acoplado a cadeia. Este processo de desproteção e acoplamento é repetido para todos os aminoácidos da cadeia peptídica, seguindo o sentido C-terminal para N-terminal. Para as reações de acoplamento, a porção ácida do aminoácido precisa ser ativada, assim favorecendo a formação da ligação amídica. Com a obtenção da sequência desejada, o peptídeo formado é clivado da resina. Grupos funcionais reativos presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos são protegidos durante toda a síntese, sendo estes removidos junto a etapa da clivagem[37].

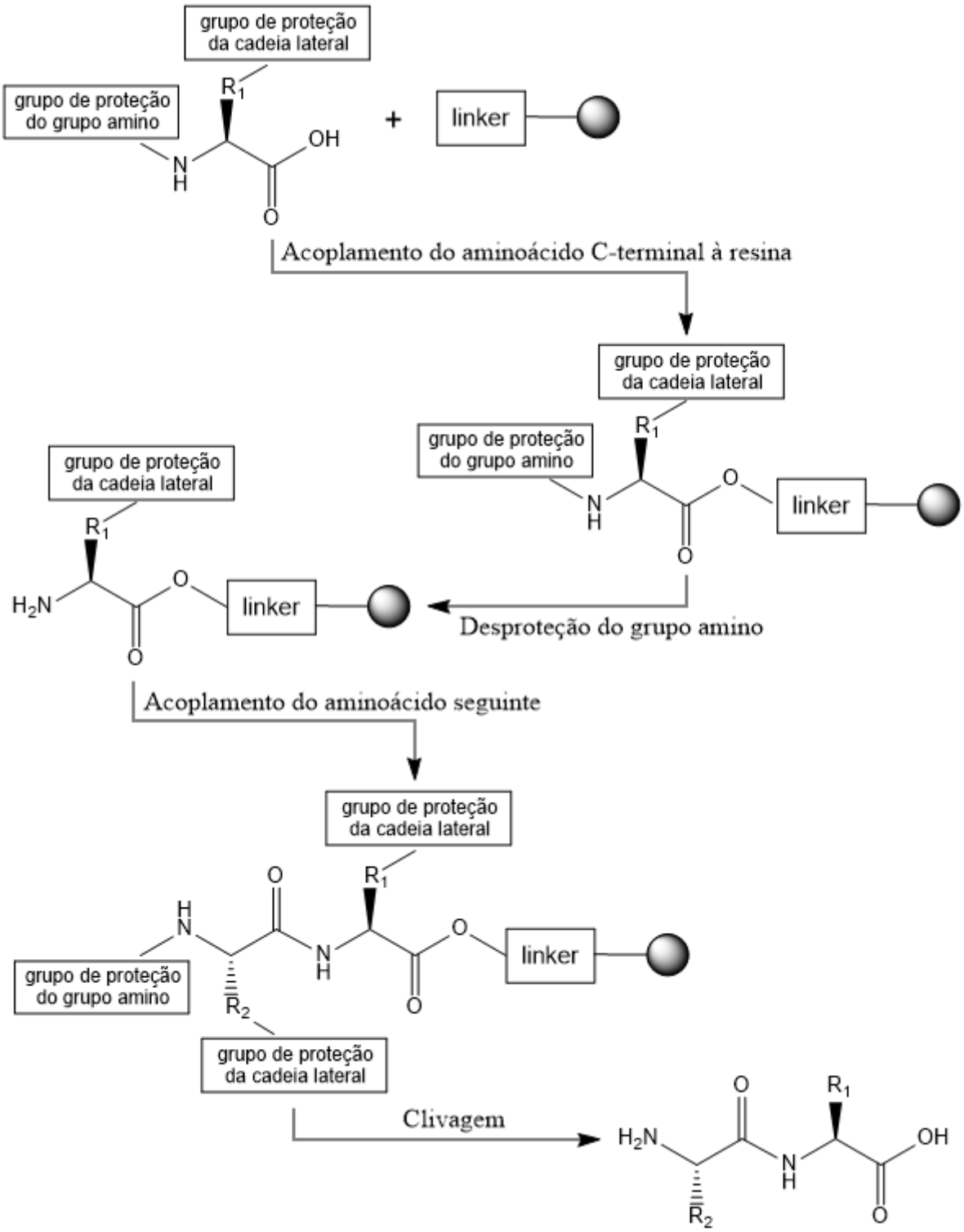



*Figura 6: Passos base para a síntese de um dipeptídeo através da SPPS.*

O método Fmoc/tBu é dito como uma metodologia ortogonal de SPPS, uma vez que seus grupos protetores são base e ácido lábeis. Neste método, o grupo protetor da porção amina do aminoácido é o Fmoc, que é base lábil, enquanto os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos são ácido lábeis, como o tBu.

Desta forma, a desproteção da porção amina, realizada por base, não afeta a proteção das cadeias laterais, que serão desprotegidas apenas na etapa da clivagem, onde se é utilizada condições ácidas[36]. O método Fmoc/tBu é amplamente utilizado na síntese de peptídeos, sendo a metodologia empregada nas sínteses deste trabalho.

### 3.6. Sequenciamento de peptídeos por Espectrometria de Massa (MS)

A Espectrometria de Massa é uma técnica analítica capaz de medir a razão entre massa e carga (m/z) de átomos e moléculas. Sua aplicação é vasta, como determinação de abundância isotópica, datação ou análise de moléculas orgânicas e produtos naturais[38]. Uma das principais aplicações é a análise proteômica. Por meio da Espectrometria de Massa é possível determinar a massa de uma proteína ou peptídeo, bem como, no caso do último, induzir a sua fragmentação e, a partir dos íons formados, elucidar sua estrutura primária[39].

Um espectrômetro de massas é formado, em geral, por quatro componentes principais: uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema para a aquisição de dados, conforme mostra a Figura 7. A fonte de íons é responsável por volatilizar e ionizar a amostra, para que então os íons formados sejam levados até o analisador de massas, que irá filtrá-los em relação a sua razão m/z. O detector é encarregado de fazer a contagem dos íons para cada valor de m/z, enquanto, por fim, o sistema de aquisição de dados (o computador) converte os dados adquiridos para a geração do espectro de massas. Também é necessário algum dispositivo para a injeção da amostra na fonte de íons, onde pode ser acoplado ao espectrômetro um cromatógrafo gasoso ou líquido. O espectro de massas é um gráfico que apresenta, no eixo das abcissas, os valores de m/z, e no eixo das ordenadas a contagem de íons, podendo também ser expressa em abundância relativa[38].

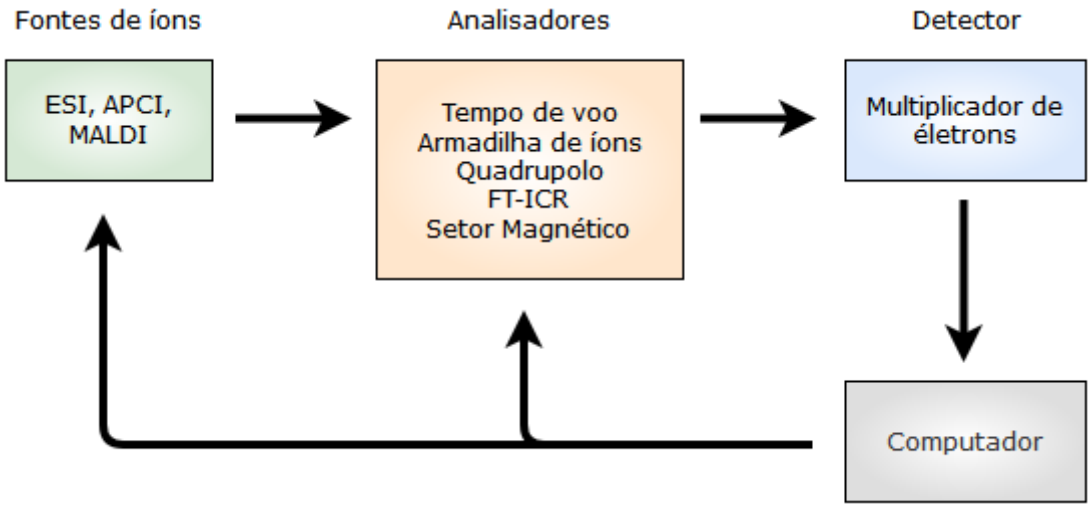



*Figura 7: Esquema básico dos componentes de um espectrômetro de massa citando alguns exemplos. Siglas: ESI – Ionização por electrospray (do inglês: "electrospray ionization"), APCI – Ionização química por pressão atmosférica (do inglês: "atmospheric-pressure chemical ionization"), MALDI – Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (do inglês: "'matrix-assisted laser desorption/ionization"), FT-ICR – Ressonância de íon ciclotron com transformação de Fourier (do inglês: "Fourier-transform ion-cyclotron resonance"), adaptado ref. 40.*

Para uma análise proteômica, é necessário que a ionização da amostra seja feita de forma suave, assim preservando a integridade estrutural do peptídeo ou proteína a ser analisada. Duas técnicas de ionização são comumente empregadas neste caso: a ESI ("Electrospray Ionization", em português, Ionização por Electrospray) ou a MALDI ("Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, em português, Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz)[39]. Na ionização por electrospray, um aerossol de partículas carregadas é gerado através de um capilar, que apresenta uma diferença de potencial, por onde a amostra passa. Essas partículas carregadas, eventualmente, liberam íons dessolvatados da amostra, aos quais são acelerados na direção do analisador de massas. No MALDI, a amostra é co-cristalizada em uma matriz sólida que recebe a incidência de um laser cujo comprimento de onda é absorvido pela matriz. A incidência do laser causa a ejeção de íons da amostra e da matriz, que são acelerados na direção do analisador de massas[38].

A elucidação da estrutura primária de um determinado peptídeo é alcançada através da espectrometria de massa sequencial (MS/MS)[39]. A espectrometria de massa sequencial é realizada em equipamentos que possuem mais de um analisador de massas (no caso tandem-in-space) ou em equipamentos que possuem um analisador de massas capaz de manter os íons presos, liberando-os paulatinamente (no caso tandem-in-time)[40]. Para o sequenciamento de peptídeos, o

método de MS/MS mais utilizado é o chamado “íon precursor isolado”, ao qual está esquematizado na Figura 8. Neste método, em um primeiro estágio de MS são encontrados os íons com valor m/z correspondentes à massa do peptídeo analisado, sendo usualmente encontrados na forma de adutos de hidrogênio ou sódio ($[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$, respectivamente). Estes íons, chamados de íons precursores, são selecionados no primeiro analisador de massas para a próxima etapa, onde serão induzidos a fragmentação. A técnica de fragmentação mais comum é a CID (“Collision Induced Dissociation”, em português, Dissociação Induzida por Colisão), onde os íons são submetidos a colisão com moléculas de um gás inerte, o que aumenta energia interna dos íons e promove a sua fragmentação. Os íons fragmentos, posteriormente, são enviados ao segundo analisador de massas, onde serão separados em relação a sua razão m/z e enviados ao detector, gerando um espectro de fragmentação do tipo MS/MS, este que é utilizado para o sequenciamento do peptídeo[41].

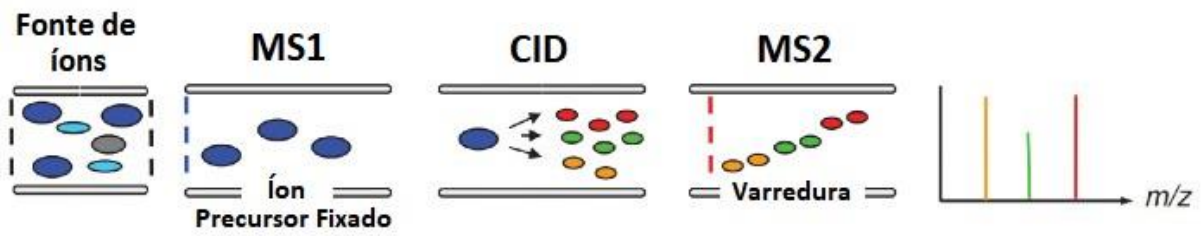



*Figura 8: Esquema da espectrometria de massa tandem (MS/MS) para um íon precursor isolado, adaptado ref. 41.*

Considerando que as ligações menos energéticas em um peptídeo são as ligações peptídicas, o aumento da energia interna da molécula após a CID faz com que os fragmentos gerados, em sua maioria, sejam advindos da quebra da ligação peptídica, o que gera um padrão de fragmentação análogo aos resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo, que pode ser utilizado para o seu sequenciamento[39].

### 3.7. Determinação da estrutura tridimensional de peptídeos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Atualmente, as duas principais técnicas para a elucidação de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas são a Difração por Raio-X e a Ressonância

Magnética Nuclear (RMN)[42]. A Difração por Raio-X foi pioneira nesse aspecto, sendo por um tempo a única técnica empregada, contudo, como toda técnica analítica, ela possui desvantagens[43]. O principal limitador da Difração por Raio-X aplicada a peptídeos e proteínas trata-se da obtenção de monocristais de alta pureza, algo que nem sempre pode ser alcançado. Outra desvantagem está no fato da estrutura tridimensional ser elucidada através de um sólido, não necessariamente sendo fiel a estrutura encontrada em meio biológico[44].

A técnica de RMN passou a ser empregada na elucidação de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas após algumas evoluções tecnológicas no meio, como o uso de campos magnéticos de alta intensidade[42] e o desenvolvimento do RMN bidimensional (2D)[45]. Além disso, avanços de métodos computacionais também contribuíram, tornando-os mais eficientes na interpretação dos dados obtidos[46]. O uso do RMN permitiu a análise de peptídeos e proteínas em fase líquida, contornando as desvantagens encontradas na Difração por Raio-X. As duas técnicas, nos dias de hoje, agem de forma complementar, uma vez que a análise de biomoléculas grandes por RMN torna-se difícil[44].

A Ressonância Magnética Nuclear é uma técnica analítica onde a amostra absorve radiação eletromagnética, sendo essa absorção dependente dos diferentes átomos presentes na molécula. Cada núcleo de um átomo pode ou não possuir um momento magnético, em caso positivo esse momento magnético pode ser descrito como um spin nuclear, cujos valores são calculados através da mecânica quântica. Núcleos cujos spins nucleares possuem valores diferentes de zero são detectáveis por RMN, como o caso do $^{1}H$, $^{13}C$ ou $^{15}N$[46], estes sendo os mais utilizados na determinação estrutural de peptídeos e proteínas[44].

Na técnica de RMN, a amostra é submetida a um campo magnético externo de alta intensidade, que faz com que os diferentes núcleos detectáveis se orientem em estados energéticos. Posteriormente, é aplicado um pulso de radiofrequência que excita estes núcleos de um estado de menor energia para um de maior energia. Quando os núcleos retornam ao equilíbrio, é emitido um decaimento de magnetização, cuja detecção fornece um sinal FID (Free Induction Decay, em tradução livre Decaimento de Indução Livre). Através do uso da Transformada de Fourier, o sinal FID é convertido para o domínio da frequência, gerando um espectro de RMN que

pode ser lido e analisado. O espectro de RMN trata-se de uma série de sinais plotadas sobre um eixo de frequências em valores de deslocamentos químicos (ppm)[46].

O espectro de RMN unidimensional (1D) de $^{1}H$ de um peptídeo possui regiões de deslocamentos químicos referentes a determinados tipos de hidrogênios encontrados nos aminoácidos, como mostra a Figura 9. Os hidrogênios amídicos usualmente são encontrados na faixa de 9 até 7 ppm. Os hidrogênios α das cadeias laterais encontram-se geralmente entre 6 e 3,5 ppm, enquanto hidrogênios β ou demais hidrogênios numa cadeia alifática podem ser encontrados na região de 3,5 até 1 ppm. Hidrogênios metílicos de cadeias alifáticas podem ser vistos em regiões abaixo de 1 ppm (com exceção do presente na metionina)[44]. Prótons aromáticos são vistos aproximadamente na faixa de 6 até 8 ppm, existindo exceções, como o caso do hidrogênio ligado ao nitrogênio presente no anel indol do triptofano, que encontra-se próximo ao valor de 10 ppm[47].

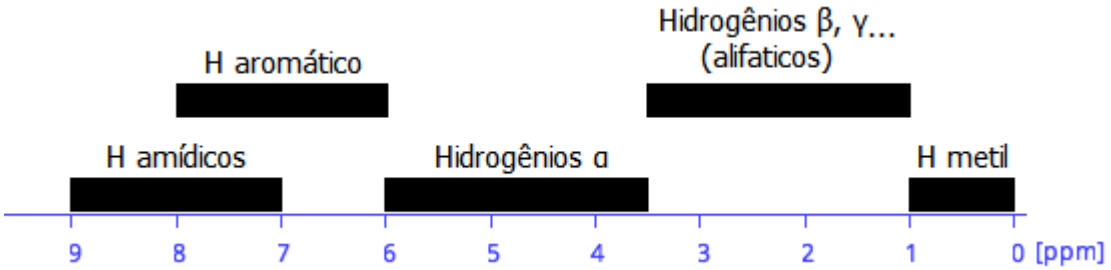



*Figura 9: Regiões de deslocamentos químicos referentes a tipos de hidrogênios encontrados em aminoácidos.*

No caso de peptídeos e proteínas, a grande quantidade de hidrogênios faz com que vários sinais se sobreponham no espectro unidimensional de RMN de $^{1}H$, problema que pode ser superado pela obtenção de espectros bidimensionais[43]. Os espectros bidimensionais apresentam dois eixos de deslocamentos químicos, podendo ser referentes a um mesmo núcleo (homonucleares) ou diferentes núcleos (heteronucleares)[48]. Os experimentos bidimensionais mais comuns encontrados na elucidação de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas são o COSY (Correlated Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) e ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)[44].

A elucidação de estruturas tridimensionais de peptídeos e proteínas segue um protocolo amplamente utilizado pela comunidade científica. Inicialmente é feito um

espectro unidimensional de $^{1}H$ para verificar a nitidez do espectro, indicando se a amostra foi bem preparada e os parâmetros bem escolhidos (como temperatura e pH)[42]. Verificada a nitidez do espectro unidimensional, os experimentos bidimensionais podem ser feitos. TOCSY e NOESY (ou ROESY) são experimentos essenciais, uma vez que eles permitem a visualização de sinais vindos de interações através de ligações e através de espaço, respectivamente, permitindo que atribuições de ressonância para cada átomo possam ser feitas. O espectro de TOCSY permite atribuições para átomos em um mesmo resíduo de aminoácido, uma vez que cada aminoácido possui um padrão de sinais TOCSY relacionados ao seu hidrogênio amídico. Os sinais vistos no TOCSY são entre prótons presentes na mesma cadeia de prótons acoplados (mesmo sistema de spin), dessa forma, tais acoplamentos não ultrapassam a ligação peptídica, gerando um conjunto de sinais separados para cada resíduo de aminoácido que pode ser correlacionado ao padrão de sinais de um aminoácido específico. Alguns resíduos de aminoácidos possuem padrões TOCSY parecidos, podendo essa ambiguidade ser ultrapassada com o uso do NOESY. Como os sinais NOESY provém de interações através do espaço, é possível inferir através deles a proximidade entre aminoácidos consecutivos se a sequência primária do peptídeo ou proteína for conhecida[42,44]. Cuidado deve ser tomado, no entanto, uma vez que a estrutura tridimensional de peptídeo ou proteína permite interações através do espaço entre aminoácidos distantes na cadeia peptídica, sendo este fato, inclusive, um dos motivos pelo qual é possível a elucidação de estruturas tridimensionais pela técnica de RMN[45].

Uma vez que todos os sinais obtidos tenham sido atribuídos aos seus respectivos átomos na cadeia peptídica, os sinais adquiridos no NOESY podem ser integrados e convertidos em valores aproximados de distância entre os átomos, pois a intensidade dos sinais é dependente da distância entre os átomos que geraram o respectivo sinal. Essas distâncias entre os átomos tornam-se restrições a serem utilizadas em métodos computacionais que calculam a estrutura tridimensional do peptídeo. Quanto mais restrições obtidas, mais chances de encontrar a elucidação de uma estrutura 3D legítima. Outros tipos de informações também podem ser adicionados como restrições, como valores de constantes de acoplamento de determinadas ligações ou ligações de hidrogênio observadas, ambos podendo ser obtidos por espectros de RMN[42,44].

Sucessivos cálculos são realizados apresentando uma série de estruturas, esses realizados até que essas estruturas convirjam entre si e não apresentem qualquer violação em relação as restrições utilizadas. Entre cada cálculo a estrutura é refinada com modificações nessas restrições ou nos demais parâmetros utilizados. Ao encontrar uma estrutura que satisfaça tais condições, esta passa por um processo de validação, ao qual confirmará a precisão do cálculo[38,41]. A Figura 10 esquematiza um protocolo geral para a elucidação da estrutura tridimensional de um peptídeo.

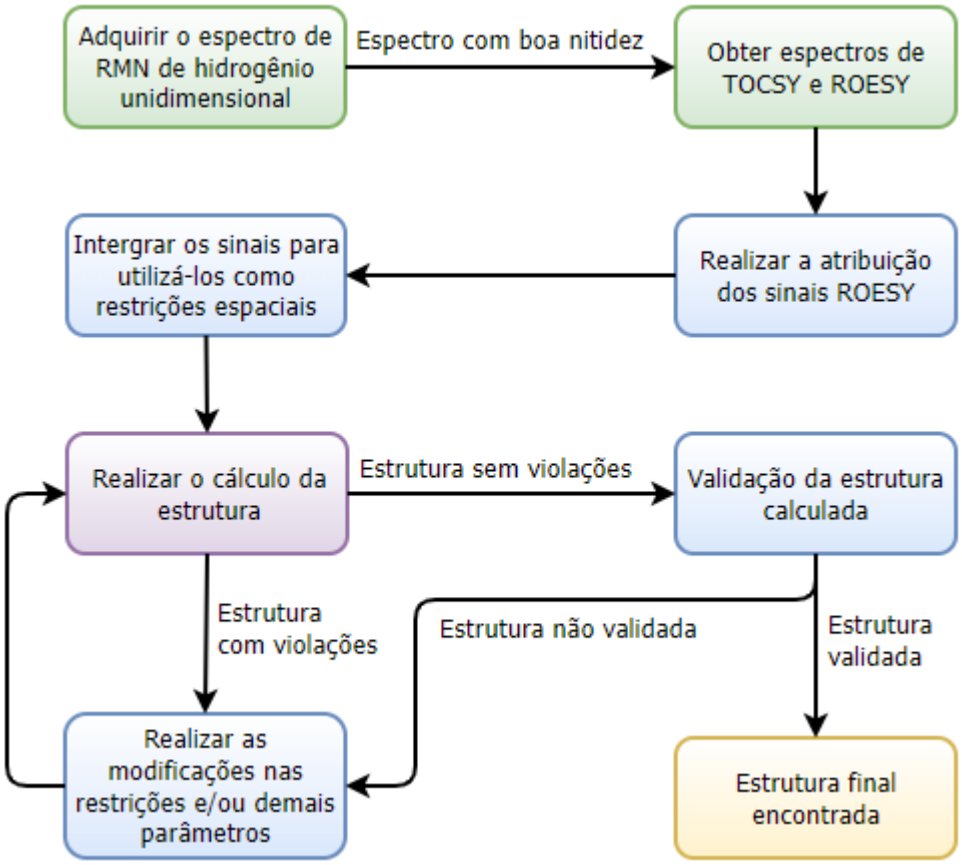



*Figura 10: Fluxograma do protocolo geral utilizado para a elucidação da estrutura tridimensional de um peptídeo.*

A validação de uma estrutura tridimensional calculada costuma ser feita através do uso do Gráfico de Ramachandran[43]. A estrutura tridimensional de uma cadeia polipeptídica pode ser entendida através dos três ângulos existentes nas ligações da "espinha dorsal" da cadeia: ω (ômega), presente entre a ligação amídica, φ (phi), presente entre a ligação do nitrogênio e do carbono α de um mesmo resíduo de aminoácido, e ψ (psi), presente entre a ligação do carbono α e do carbono carbonílico de um mesmo resíduo de aminoácido. Como a ligação amídica,

compreendida pelo ângulo ω, tem um caráter parcial de ligações dupla por conta de sua ressonância, este ângulo torna-se restrito. Sendo assim, a estrutura tridimensional fica a caráter das rotações existentes entre os ângulos φ e ψ, como mostra a Figura 11[49].

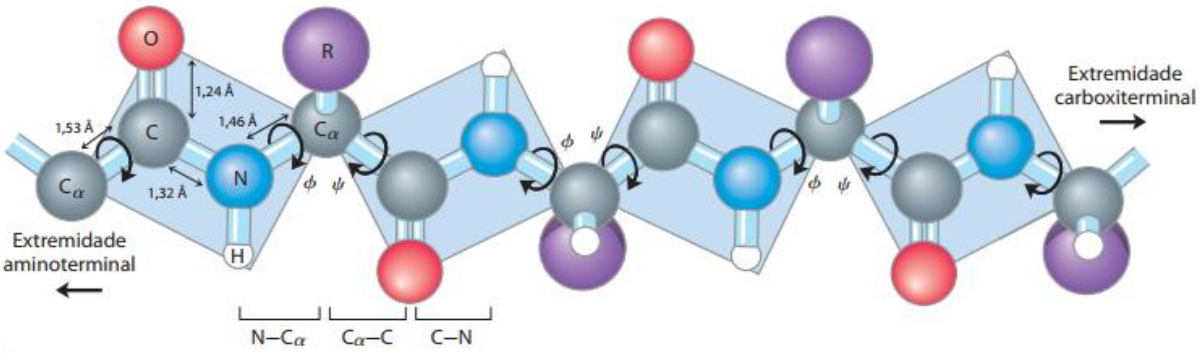



*Figura 11: "Espinha dorsal" de uma cadeia peptídica evidenciando distâncias entre átomos e os ângulos φ e ψ. Na posição do ângulo ω, um plano é representado, indicando que tal ângulo não apresenta livre rotação, ref. 49.*

O Gráfico de Ramachandran relaciona valores de ângulos φ e ψ cuja existência é permitida em cadeias polipeptídicas, uma vez que várias combinações de valores não seriam factíveis por conta de efeitos estéricos entre cadeias laterais e a "espinha dorsal"[49]. Através do Gráfico de Ramachandran é possível validar um cálculo de estrutura tridimensional de um peptídeo ou proteína relacionando os valores dos ângulos φ e ψ com os valores do gráfico, indicando se os ângulos calculados estão em regiões favoráveis, desfavoráveis ou não permitidas[44].

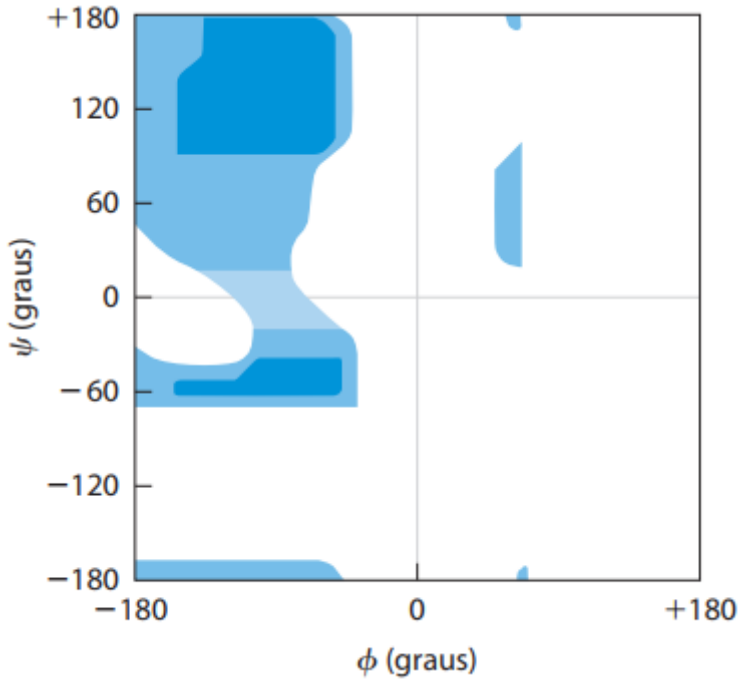



*Figura 12: Gráfico de Ramachandran para resíduos de L-alanina. Áreas em azul-escuro indicam regiões favoráveis. Áreas em azul-médio indicam regiões favoráveis, mas menores que a anterior. Áreas em azul-claro indicam regiões desfavoráveis. Áreas em branco indicam regiões não permitidas, ref. 49.*

As aplicações na elucidação de estruturas tridimensionais por RMN são incontáveis. O complexo decapeptídeo gramicidina S é dito como o primeiro a ser estudado com mais detalhes utilizando o RMN, isso antes de 1970[50]. Novas estruturas de peptídeos e proteínas são elucidadas até os dias atuais utilizando essa técnica, embora maiores esforços ultimamente estejam sendo direcionados para a formação de fibras amiloides geradas por proteínas intrinsecamente desordenadas ou complexos entre peptídeos/proteínas ou proteínas com outras moléculas menores[44]. A despeito disso, artigos são dedicados para a importância do RMN no estudo de estruturas tridimensionais em vários campos, como toxinas peptídicas e suas funções[51], caracterização de proteínas intrinsecamente desordenadas contendo funções mesmo não assumindo uma estrutura ordenada[52] e peptídeos antimicrobianos encontrados em anfíbios e a correlação entre sua função e estruturas[53].

### 3.8. Os ensaios ORAC e TEAC

Os ensaios ORAC (do inglês “oxygen radical antioxidant capacity”, em português chamado de “capacidade de absorção dos radicais oxigenados”) e TEAC (do inglês “trolox equivalent antioxidant capacity, em tradução livre “capacidade antioxidante equivalente ao trolox”) são dois ensaios *in vitro* com objetivo de verificar a capacidade antioxidante de um determinado analito. Estes dois métodos são os mais populares ao se avaliar a capacidade antioxidante de uma substância pelo mecanismo HAT (do inglês “hydrogen atom transfer”, em tradução livre “transferência de átomo de hidrogênio”) e pelo mecanismo ET (do inglês “electron transfer”, em tradução livre “transferência de elétron”, respectivamente[54].

No ensaio ORAC, radicais peróxido são gerados por um iniciador radicalar, os quais induzem modificações danosas em uma proteína fluorescente que, por alteração de sua conformação através dos danos sofridos, perde sua capacidade fluorescente, algo que pode ser medido. Uma vez que uma substância com possível atividade antioxidante é incubada junto a proteína fluorescente, uma competição entre qual molécula captura mais radicais peróxido se estabelece, essa captura na maioria dos casos acontecendo pelo mecanismo HAT. No caso de a substância testada ter uma boa atividade antioxidante, os radicais peróxido serão capturados por ela e não causarão danos à proteína fluorescente, portanto, a fluorescência medida não irá decair[54].

Neste trabalho, o ensaio de inibição de hemólise por AAPH foi utilizado, ao qual vale-se da geração de radicais peróxido por um iniciador radicalar como no ensaio ORAC. No ensaio de inibição de hemólise por AAPH, os radicais peróxido são produzidos pelo composto 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dicloridrato (AAPH) que, sob leve aquecimento, dissocia-se em dois radicais alquílicos que, posteriormente, reagem com oxigênio presente no ar[55]. Os radicais peróxido formados podem também se decompor e formar radicais alcóxi, ainda mais reativos que os primeiros[56]. Estes radicais reagem com a membrana celular de hemácias, causando a peroxidação lipídica que danifica a membrana e causa a sua lise, liberando hemoglobina no meio extracelular que pode ser medida através de espectroscopia UV-Vis. Uma vez que as hemácias são incubadas junto de uma substância antioxidante, esta captura os radicais peróxido, impedindo que estes danifiquem a membrana celular da hemácia e, portanto, previnem sua lise, causando uma

diminuição da hemoglobina medida no meio extracelular[55]. A Figura 13 condensa as reações ocorridas neste ensaio.

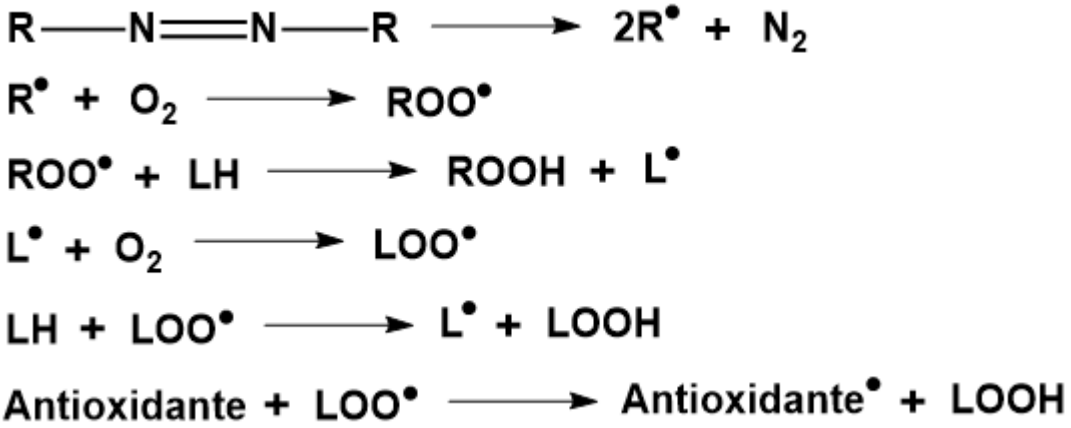



*Figura 13: Reações ocorridas no ensaio de inibição de hemólise por AAPH. Legenda: R = cadeia alquílica, L = lipídios presentes na membrana celular da hemácia.*

No ensaio TEAC é utilizado o radical ABTS, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ao qual absorve luz na faixa do visível, apresentando uma coloração verde em solução. Quando o radical ABTS é colocado em solução com uma substância antioxidante teste, o mesmo pode ser reduzido através de uma transferência de elétrons direta com o antioxidante. A molécula de ABTS reduzida é incolor em solução, de forma que a absorbância do ABTS radical pode ser medida. Assim, quanto mais decair a absorbância medida para o radical ABTS, maior é a capacidade antioxidante da substância teste frente a este ensaio. Os resultados para a molécula teste são comparados com os obtidos para o Trolox, uma molécula análoga à vitamina E, que possui ação antioxidante[54]. A Figura 14 apresenta a estrutura do ABTS em sua forma neutra e cátion radicalar. Assim como o ensaio de inibição de hemólise por AAPH, o ensaio TEAC foi utilizado neste trabalho.

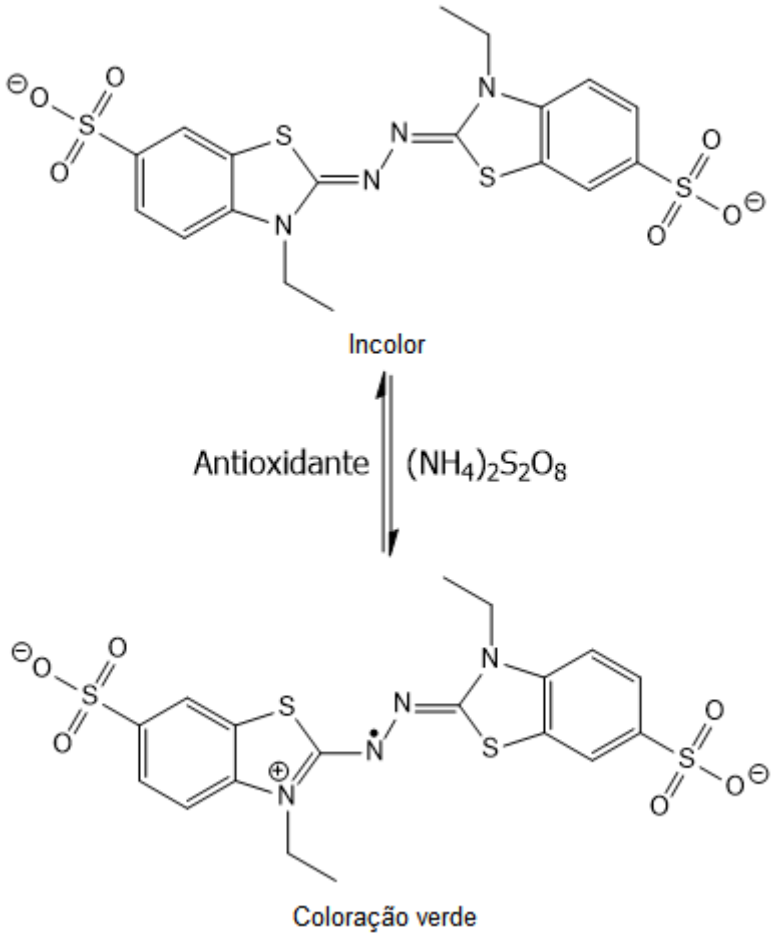



*Figura 14: Equilíbrio entre o ABTS em sua forma neutra (incolor) e em sua forma cátion radicalar (coloração verde).*

# 4. METODOLOGIA

## 4.1. Síntese dos peptídeos lineares por SPPS

Para a síntese do cPaT-2 e demais análogos (cPaT-W, cPaT-Y e cPaT-A), em suas formas lineares, foi utilizado o método Fmoc/tBu para SPPS, sintetizado manualmente, com o passo a passo sendo descrito de forma mais detalhada nos subitens a seguir, usando por base a metodologia descrita por Chan e White (2000)[35].

### 4.1.1. Suporte sólido

O suporte sólido escolhido para a síntese dos peptídeos foi a resina Rink Amide (MDHA), cuja matriz polimérica é um copolímero de estireno-1% divinilbenzeno (100-200 mesh) e cujo linker, representado na Figura 15, permite a clivagem de peptídeos com o C-terminal amidado.

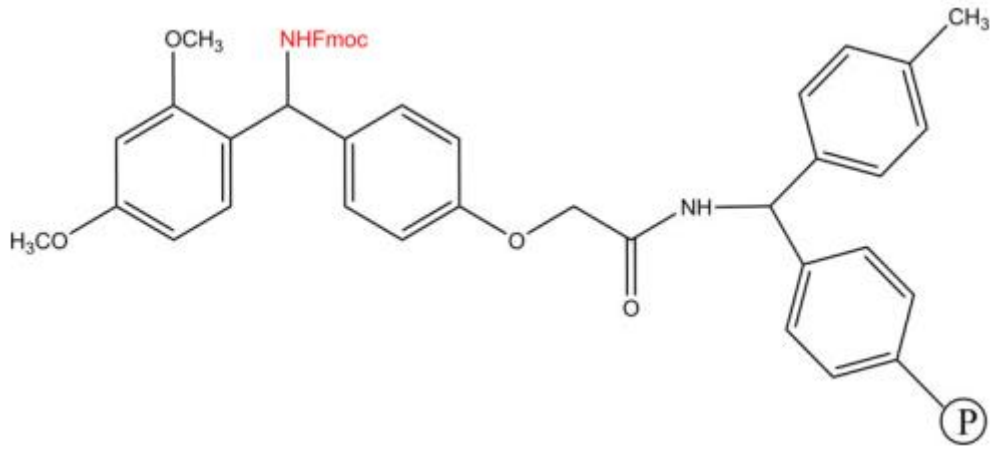



*Figura 15: Estrutura da resina Rink Amide (MDHA). Em vermelho está o grupo amino protegido pelo Fmoc e o P representa a cadeia polimérica atrelada a resina, ref. 57.*

A síntese foi feita numa seringa de polipropileno com um filtro sinterizado poroso, cortado e posicionado na seringa de forma a reter o suporte sólido, mas permitir a passagem dos demais reagentes utilizados na síntese durante os processos de filtração.

### 4.1.2. Preparo da resina

Foi pesada uma quantidade de resina suficiente para produzir aproximadamente 0,15 mmol de peptídeo, dessa forma, foram utilizados 242 mg de resina (grau de substituição 0,62 mmol/g).

Após pesada, a resina foi introduzida no interior da seringa com filtro e inchada com 2 mL de diclorometano (DCM) por 30 minutos sob agitação. O inchaço da resina permite uma melhor difusão dos reagentes a serem adicionados no decorrer da síntese, uma vez que a maioria dos sítios ativos se encontra no interior das contas da resina[36]. Após este tempo, o DCM foi removido da seringa por filtração com auxílio de uma bomba de vácuo.

### 4.1.3. Desproteção e lavagem

A resina Rink Amide possui, de forma análoga aos aminoácidos a serem inseridos, um grupo protetor 9-fluorenilmetil carbonila (Fmoc) ligado a amina presente no linker, seu sítio reativo. Para a desproteção desta amina, foi utilizada uma solução básica de 20% (v/v) de 4-metil-piperidina em dimetilformamida (DMF), em dois ciclos de 15 minutos, de forma que toda a resina ficasse solúvel na solução.

O grupo Fmoc é base lábil em vista da formação de uma base conjugada estabilizada por ressonância após a remoção de seu hidrogênio ácido. No mecanismo de desproteção de uma amina ligada ao Fmoc, esta base conjugada, após formada, rapidamente sofre um processo de eliminação de $CO_2$, deixando a amina livre[57]. A Figura 16 mostra o mecanismo da desproteção de um Fmoc-aminoácido (Fmoc-aa) já ligado à resina.

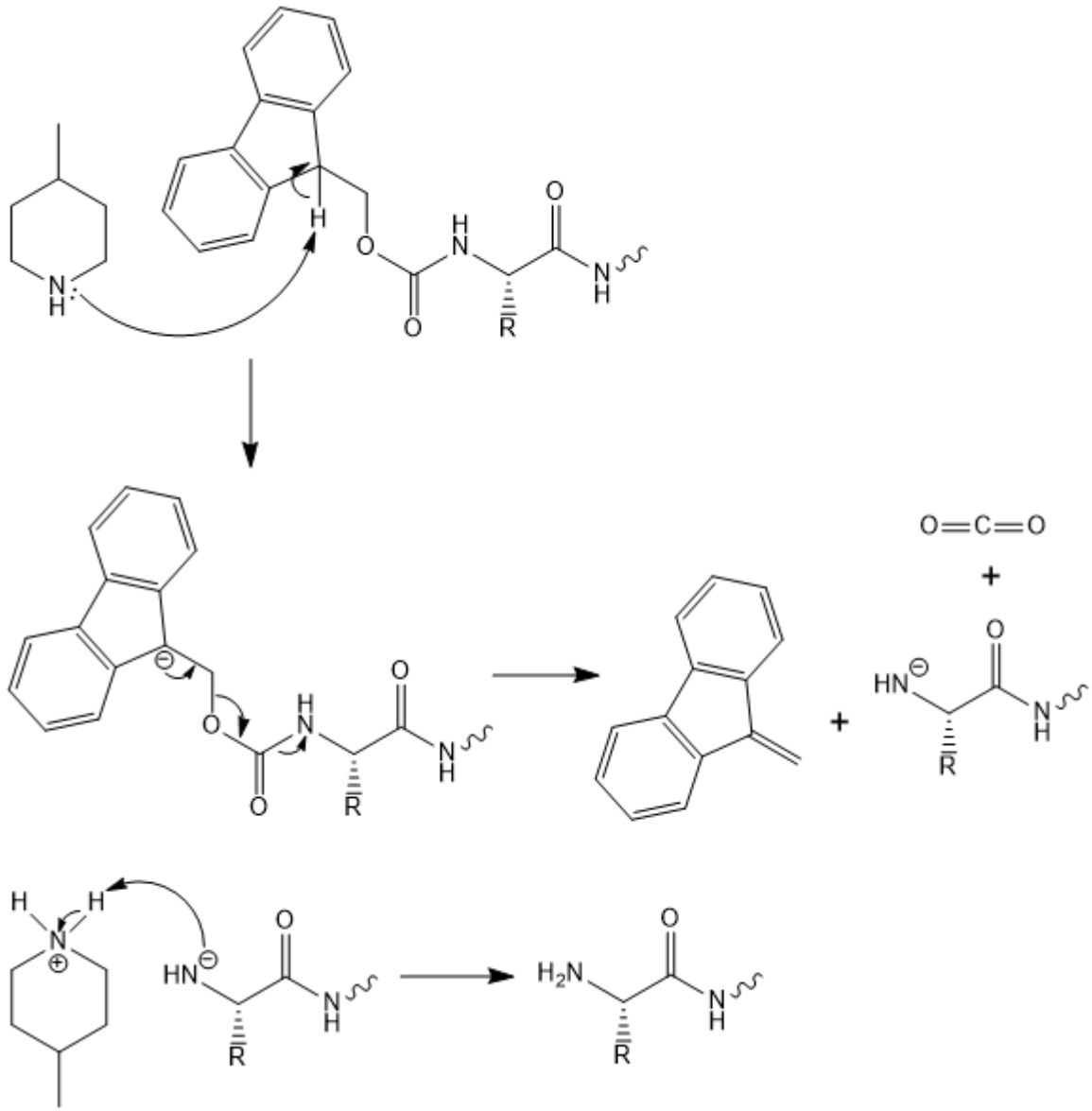


*Figura 16: Mecanismo de desproteção do grupo protetor Fmoc por 4-metil-piperidina. A ligação espiral indica a continuação da cadeia polipeptídica ligada ao suporte sólido durante a síntese.*

Após a desproteção, a solução é removida da seringa por filtração e um processo de lavagem deve ser realizado para a retirada de quaisquer reagentes residuais, de forma que não tenham influência nas posteriores etapas da síntese. Esta lavagem foi feita com três repetições de aproximadamente 2 mL de DMF e 2 mL de DCM. A lavagem foi realizada após ambos os ciclos de desproteção, totalizando dois ciclos de lavagem.

### 4.1.4. Teste de Kaiser

O Teste de Kaiser, ou Teste de Ninhidrina, é um teste que busca verificar a presença de aminas primárias ou secundárias a partir da mudança de coloração da solução. A ninhidrina reage com aminas primárias em uma série de etapas, gerando, ao final, um composto conhecido como “Ruhemann‘s blue”, um dímero da própria ninhidrina que possui uma coloração azul escura. Ao reagir com aminas secundárias, o dímero não é formado, mas os produtos não clássicos destas reações apresentam uma coloração marrom[57].

Na SPPS, o Teste de Kaiser é utilizado para a confirmação da desproteção da amina primária, bem como também é empregado para confirmar o acoplamento de novos aminoácidos à cadeia peptídica da resina em passos subsequentes.

O Teste de Kaiser foi realizado tomando-se alguns grãos da amostra em um tubo de ensaio, onde foi acrescentado duas gotas de cada uma das seguintes soluções: 5% (m/v) de ninhidrina em etanol, 80% (v/v) de fenol em etanol e uma solução preparada com 2 mL de KCN (1 mmol/L) em 98 mL de piperidina. Após as adições, o conteúdo do tubo de ensaio foi bem misturado e aquecido a 120°C por 2 a 5 minutos. O aparecimento da coloração azul escura nos grãos da amostra indica a presença de aminas primárias livres, enquanto o aparecimento de uma coloração marrom nos grãos indica a presença de aminas secundárias livres. As demais soluções, além da que contém ninhidrina, bem com o aquecimento do tubo de ensaio, atuam na acentuação da cor[57].

### 4.1.5. Acoplamento de aminoácidos

Após a verificação e confirmação da desproteção do grupo amino, o primeiro resíduo de aminoácido pode ser acoplado à resina. No caso da resina Rink Amide utilizada, a ligação a ser formada entre o aminoácido C-terminal e a resina trata-se de uma ligação amídica, a mesma encontrada na ligação peptídica. Por conta disso, a metodologia para o acoplamento do primeiro aminoácido a resina também é a mesma empregada para o acoplamento de aminoácidos no processo de alongamento da cadeia.

Os acoplamentos são realizados a partir de uma reação onde ocorre um ataque nucleofílico da porção amino de um aminoácido na carbonila da porção ácida

do aminoácido posterior, formando uma nova ligação amídica a partir da reação de substituição à carbonila. No caso do acoplamento entre a resina utilizada e o primeiro aminoácido, o processo é o mesmo, mas a porção amino encontra-se no linker da resina. Para auxiliar na cinética da reação, é necessário o uso de algum reagente que faça a “ativação” do grupo ácido presente no aminoácido, trazendo um melhor grupo de saída para a reação. Existem vários agentes de “ativação”, como formadores de anidridos, ésteres ativos, reagentes do tipo amínio (“aminium type”), dentre outros[35].

Para a síntese dos peptídeos, foi utilizado o método DIC/Oxyma como ativador. Neste método, inicialmente o nitrogênio da carbodiimida capta o próton presente da porção ácida do aminoácido que, posteriormente, realiza um ataque nucleofílico no carbono eletrofílico da carbodiimida. Como resultado, a porção ácida do aminoácido se torna um o-acil-isoureia, um excelente grupo de saída, uma vez que após a reação de substituição à carbonila será liberado um derivado de ureia. Este grupo de saída é bastante eficiente, de forma que torna-se possível um ataque nucleofílico da carbonila do aminoácido anterior da cadeia peptídica à porção ácida do aminoácido ativado, formando um derivado de oxazolona. Este derivado, quando atacado por um novo aminoácido, causa a racemização do aminoácido antes ativado. Para evitar este problema, é utilizado a Oxyma em conjunto com o DIC. A Oxyma realiza um ataque nucleofílico na carbonila ativada do aminoácido, realizando uma troca entre os grupos ativadores, onde o novo grupo de saída torna-se menos ativo, suprimindo a formação de oxazolona e favorecendo a formação da ligação peptídica almejada[57]. O mecanismo do método DIC/Oxyma para o acoplamento de aminoácidos é mostrado na Figura 17.

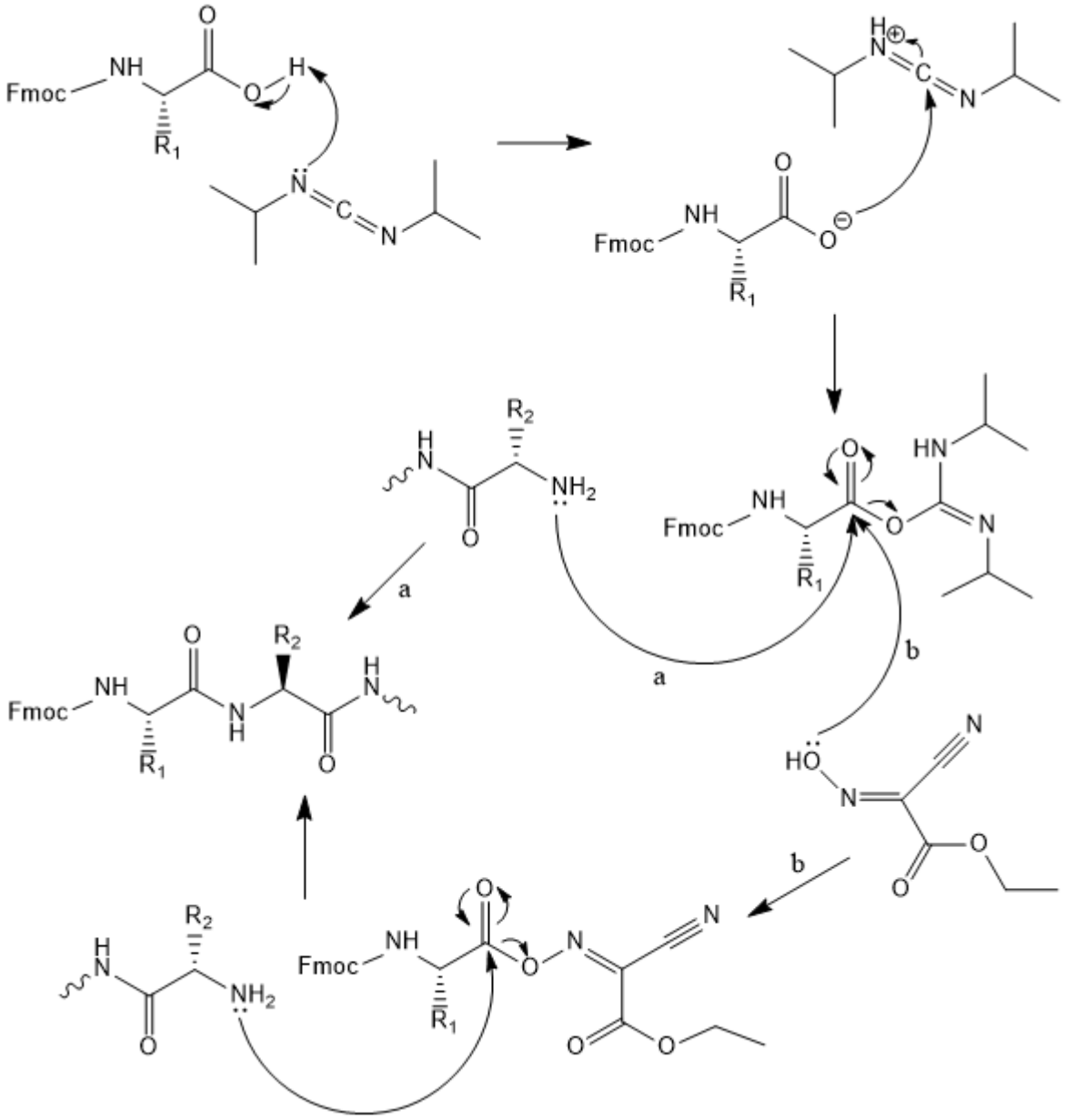



*Figura 17: Mecanismo para o acoplamento de aminoácidos utilizando DIC/Oxyma. Caminho "a": reação do derivado de o-acil-isoureia com o peptídeo. Caminho "b": reação do derivado de o-acil-isoureia com a oxyma. A ligação espiral indica a continuação da cadeia polipeptídica ligada ao suporte sólido durante a síntese.*

A síntese de acoplamento foi realizada utilizando 4 equivalentes molares da quantidade de cada reagente envolvido: o Fmoc-aa correspondente de acordo com a sequência do peptídeo, DIC e Oxyma, objetivando a síntese de 0,15 mmol de peptídeo. Dessa forma, de acordo com cálculos estequiométricos, foi utilizado 85,3 mg de Oxyma e 93 µL de DIC em uma quantidade de DMF suficiente para a completa solubilização dos reagentes, além do Fmoc-aa, cuja massa pesada varia de acordo com o aminoácido a ser acoplado, conforme é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Fmoc-aminoácidos utilizados para o acoplamento e suas massas pesadas

| Nome do aminoácido | Fmoc-aminoácido | Massa pesada (mg) |
|---|---|---|
| Alanina | Fmoc-Ala-OH | 186,8 |
| Cisteína | Fmoc-Cys(Trt)-OH | 351,4 |
| Fenilalanina | Fmoc-Phe-OH | 232,5 |
| Glicina | Fmoc-Gly-OH | 178,4 |
| Leucina | Fmoc-Leu-OH | 212,0 |
| Prolina | Fmoc-Pro-OH | 202,4 |
| Tirosina | Fmoc-Tyr(tBu)-OH | 275,7 |
| Triptofano | Fmoc-Trp(Boc)-OH | 316,0 |

Após um tempo reacional de 1,5 h sob agitação, o produto foi filtrado e lavado da mesma forma como feito após a desproteção, mais uma vez para a remoção de excesso de reagentes. O Teste de Kaiser foi feito em seguida para a confirmação do acoplamento, que se caracteriza pela ausência de cor nos grãos tomados para o teste, uma vez que quando um novo Fmoc-aa é acoplado, sua amina encontra-se protegida e, portanto, o teste não deve demonstrar aminas livres.

O acoplamento de aminoácidos para o alongamento da cadeia peptídica foi feito no sentido C-terminal para N-terminal em que, a cada novo acoplamento, foram realizados os mesmos procedimentos de desproteção do grupo amino e acoplamento do novo aminoácido, sendo um processo cíclico até que a cadeia peptídica fosse concluída.

### 4.1.6. Clivagem

A etapa da clivagem, além de separar o peptídeo da resina, também remove os grupos protetores utilizados nas cadeias laterais dos aminoácidos. Tal etapa é feita a partir de um coquetel ácido junto de outros reagentes sequestradores de carbocátions. O mecanismo de reação da clivagem leva à formação de carbocátions que podem facilmente reagir com as cadeias laterais de aminoácidos ricas em elétrons, como tirosina, triptofano, cisteína, dentre outros. Por conta disso, são adicionados juntos ao ácido outros reagentes que são bons nucleófilos, pois estes

promovem um ataque nos carbocátions, “sequestrando-os” do meio reacional e, por consequência, reduzindo a formação de subprodutos indesejados[57].

Existem vários coquetéis para clivagem de peptídeos, estes que se utilizam de TFA como ácido junto de outros reagentes sequestradores de carbocátions que variam de acordo com os aminoácidos presentes na sequência do peptídeo sintetizado. Para a clivagem dos peptídeos sintetizados neste trabalho, foi utilizado 10 mL de um coquetel composto por TFA/Tioanisol/Água/Fenol/EDT (1,2-etanoditiol) na proporção 82,5/5/5/5/2,5 (v/v)[35].

Após um tempo reacional de 1,5 h sob agitação, a mistura foi borbulhada com gás argônio para evaporação do TFA. O conteúdo restante foi filtrado a vácuo utilizando éter di-isopropílico para lavagem, sendo retido o peptídeo e resina no filtro. O peptídeo foi solubilizado com uma solução de acetonitrila (ACN) e água (1:1), podendo ser recolhido enquanto a resina fica presa ao filtro.

Para a obtenção do peptídeo em fase sólida, o produto da clivagem foi liofilizado. A Figura 18 apresenta um fluxograma geral da síntese dos peptídeos deste trabalho.

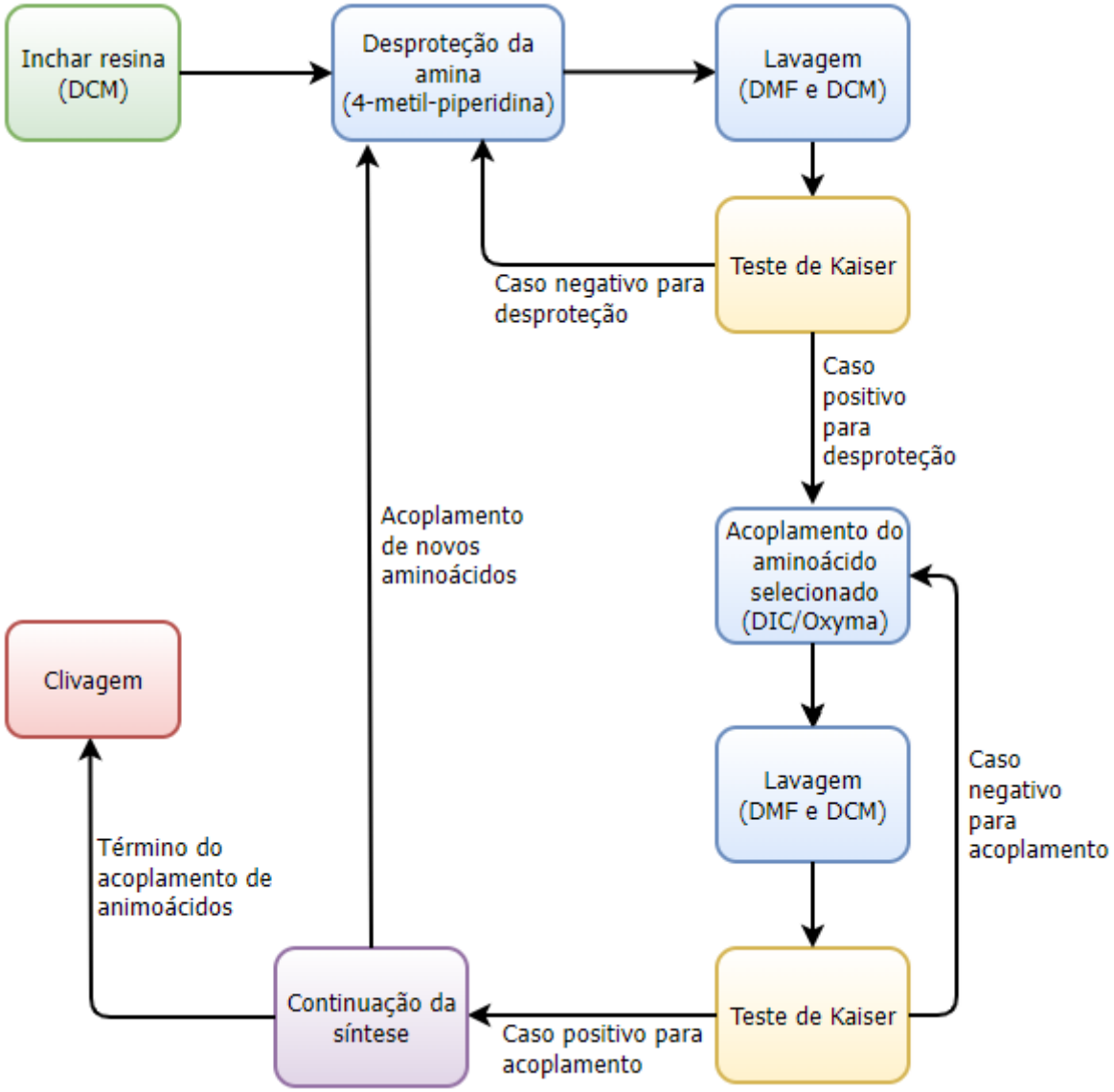



*Figura 18: Fluxograma geral da síntese de peptídeos em fase sólida utilizada neste trabalho.*

### 4.2. Oxidação dos resíduos de cisteína para formação da ligação dissulfeto

Ligações dissulfeto são formadas a partir dos grupos tióis localizados em um par de cisteínas. São consideradas as modificações pós-tradução mais comuns identificadas em proteínas, sendo encontradas tanto em eucariontes quanto em procariontes. As ligações dissulfeto podem exibir funcionalidades em uma proteína ou atuar na estabilização de estruturas tridimensionais[58]. No caso do cPaT-2 e os demais peptídeos análogos deste trabalho, a ligação dissulfeto promove a ciclização do peptídeo em prol de aproximar os resíduos de aminoácidos aromáticos. Esta

ciclização também auxilia na consolidação de uma estrutura tridimensional rígida que pode ser observada pela técnica de RMN.

A oxidação dos peptídeos para a formação da ligação dissulfeto entre o par de cisteínas localizadas nas posições N-terminal e C-terminal foi realizada com base no método 6 do protocolo para Fmoc-SPPS de peptídeos contendo cisteína disponibilizado pela Merck[59]. Nesta metodologia, o peptídeo é deixado em uma solução aberta em contato com o ar, onde o oxigênio atmosférico induz a oxidação. A concentração de peptídeo em solução é um parâmetro importante, uma vez que uma maior diluição tende a desfavorecer a oxidação intermolecular. Foi feita uma solubilização do peptídeo (concentração 0,5 mg/mL) em uma solução de carbonato de amônio 0,1 mol/L recém preparada, ao qual foi colocada sob agitação e em contato com o ar por um tempo reacional de 24 horas. Para a obtenção do produto em fase sólida, a solução foi liofilizada, sendo adquirido um pó branco contendo peptídeo e carbonato de amônio.

### 4.3. Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de Massa (MS)

A caracterização dos peptídeos por Espectrometria de Massa foi realizada após sua síntese linear e para a confirmação da formação da ligação dissulfeto após a oxidação. Para o preparo das amostras, pequenas frações de peptídeo foram diluídas em uma solução de metanol levemente acidificada com ácido fórmico (0,1% ácido fórmico em metanol) e foram enviadas ao espectrômetro. Os espectros ESI-Q/TOF foram adquiridos pelo equipamento Q-Tof 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) do Instituto de Química - UnB, utilizando uma fonte de íons DuoSpray (EsI). Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em modo positivo.

### 4.4. Purificação dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Após a confirmação da ciclização dos peptídeos, estes foram purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em um equipamento composto por uma unidade de desgaseificação (DGU-20A5R), um sistema binário de bombeamento de solventes (LC-20AR), um detector de arranjo de fotodiodo (PDA,

SPD-M20A), um auto-injetor (SIL-10AF) e um módulo controlador (CBM-20A), presente no Laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina, área de morfologia da Faculdade de Medicina (FS), Universidade de Brasília. Foi utilizada uma coluna preparativa Phenomenex® Jupiter 10 µm C-18, onde a separação dos componentes da amostra se deu a partir de diferentes interações hidrofóbicas do peptídeo e impurezas com o suporte sólido da coluna (fase estacionária apolar). Em casos em que a massa de peptídeo injetado foi inferior a 10 mg, foi utilizada uma coluna semipreparativa Vydac® TP510 C-18 25 cm × 10 mm x 5µm.

Para o preparo das amostras, a massa do produto bruto pós-oxidação equivalente a 25 mg de peptídeo foi diluída em aproximadamente 2 mL de uma solução de acetonitrila/água 1:2 em um eppendorf. No caso do peptídeo cPaT-2, duas fases foram formadas, uma fase aquosa contendo água e carbonato de amônio ao fundo do eppendorf e uma fase orgânica contendo acetonitrila e peptídeo na superfície. A fase orgânica foi coletada com uma seringa de vidro e injetada no equipamento para a cromatografia. Para massas totais inferiores ao equivalente a 10mg de peptídeo, todo o material pesado foi diluído em aproximadamente 1 mL de uma solução de acetonitrila/água 2:1.

As corridas cromatográficas foram realizadas com dois solventes compondo a fase móvel, acetonitrila e água, ambas acidificadas com 0,1% (v/v) de TFA. Cada corrida durou 58 minutos, no seguinte gradiente de eluentes: de 0 a 5 minutos com 5% de ACN/95% de água, de 5 a 45 minutos com rampa de 5% de ACN/95% de água até 100% de ACN, de 45 a 50 minutos com 100% de ACN, de 50 a 53 minutos com rampa de 100% de ACN até 5% de ACN/95% de água e de 53 a 58 minutos com 5% de ACN/95% de água. Os comprimentos de onda 216 nm e 280 nm foram monitorados através do detector. Os peptídeos purificados foram coletados manualmente. Para a obtenção do produto em fase sólida, a fração líquida coletada foi liofilizada.

### 4.5. Análise do cPaT-2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Uma amostra de 2 mM do peptídeo cPaT-2 foi preparada em 550 µL de $H_2O$ e 50 µL de $D_2O$. O pH da amostra foi analisado por um pHmetro, mostrando um

valor de aproximadamente 4,5. Dadas as condições ácidas da amostra, não foram necessários quaisquer aditivos.

Os espectros de RMN foram adquiridos por um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Brucker Avance III HD 600 presente no Instituto de Química - UnB, operando em um campo magnético de 14 T e frequência de 600 MHz. Foram obtidos espectros unidimensionais de $^{1}H$ a 4°C, 25°C e 75°C, além dos experimentos bidimensionais Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy (ROESY) e Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (HSQC). O experimento unidimensional de $^{1}H$ foi feito com 65536 de tamanho de FID e 16 scans. O espectro de TOCSY foi adquirido com 4096 complex points, 512 número de incrementos, 64 scans e 100 ms de mixing time. O espectro de ROESY foi adquirido com 4096 complex points, 512 números de incrementos, 64 scans e 250 ms de mixing time. O espectro de HSQC foi adquirido com 2048 complex points, 256 números de incrementos e 64 scans. Os espectros foram obtidos com supressão do sinal da água e a uma temperatura de 25°C. O referenciamento do eixo de frequências, em valores de deslocamentos químicos (ppm), foi feito de acordo com o sinal obtido para a água.

Os espectros foram visualizados através do software CCPNMR (versão 2.4), onde também foram realizadas as integrações dos sinais ROESY e a avaliação dos ângulos de diedros através dos sinais obtidos pelo experimento de HSQC. O cálculo da estrutura foi feito utilizando o software ARIA (versão 2.3.1), posteriormente validado com o software CCPNMR, que mostra possíveis violações, além do gráfico de Ramachandran para as estruturas calculadas. A visualização das estruturas calculadas e a geração de figuras foi feita através do software PyMOL.

### 4.6. Ensaio de inibição de hemólise

Sangue periférico foi obtido com EDTA (1,8 mg/mL) de um doador humano voluntário. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com 1× PBS a 37 ºC. A suspensão de eritrócitos foi ajustada para atingir 6% de células em 1× PBS. Em seguida, 50 µL desta suspensão foram adicionados a 50 µL de peptídeos diluídos em 1× PBS e 100 µL de AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dicloridrato) em uma placa de 96 poços. As

concentrações de peptídeos no poço variaram de 80 a 2,5 μM e a concentração de AAPH no poço foi de 60 mM. A placa foi incubada por 3 horas a 37ºC, centrifugada a 4700 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi medido a 550 nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA). Os controles negativo (ausência de hemólise) e positivo (100% de hemólise) foram ajustados com 1× PBS e AAPH, respectivamente. Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) foi utilizado como controle de inibição da hemólise.

### 4.7. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) seguida de análises de comparações múltiplas de Bonferroni foram aplicadas para verificar diferenças estatísticas entre grupos utilizando o GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Softwares, EUA). ANOVA bidirecional seguida de análises de comparações múltiplas de Bonferroni foram empregadas para comparar médias entre PaT-2 e cPaT-2. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas em $p<0,05$. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média da triplicata.

### 4.8. Análises por LC-MS/MS dos peptídeos oxidados com AAPH

Soluções de peptídeo foram preparadas dissolvendo a quantidade obtida após a purificação em 15 μL de DMSO, completando subsequentemente o volume com água ultrapura até atingir 1 mL. As concentrações das soluções foram medidas por espectroscopia UV-Vis através do comprimento de onda de 280 nM, absorção característica para o resíduo de aminoácido de triptofano, e calculadas através da Lei de Lambert-Beer. As medidas de absorbância foram realizadas com o Espectrofotômetro SHIMADZU UV 1280. A Tabela 3 apresenta as concentrações calculadas para a solução de cada peptídeo.

Tabela 3: Concentrações calculadas para cada peptídeo em solução

| Peptídeo | Concentração |
|---|---|
| cPaT-2 | 1,02 mM |
| cPaT-W | 232,97 µM |
| cPaT-Y | 381,9 µM |
| cPaT-A | 483,87 µM |

Alíquotas de cada peptídeo foram dissolvidas em 50 µL de uma solução de 100 mM de AAPH em 1x PBS e completadas com 1x PBS até o volume final de 150 µL. O volume das alíquotas de peptídeo foi calculado para que a sua concentração final fosse de 10 µM. A reação durou 3 horas na temperatura de 37°C. Para os peptídeos cPaT-W e cPaT-Y, a concentração final de peptídeo foi de 20 µM.

Para os peptídeos sem a oxidação por AAPH, alíquotas de cada peptídeo foram dissolvidas em 150 µM de 1x PBS de forma que sua concentração final fosse de 10 µM. Posteriormente, foi adicionado 1x PBS ou água ultrapura até atingir o volume final de 500 µM. Para os peptídeos com oxidação por AAPH, os 150 µL da reação foram diluídos até o volume final de 500 µL com 1x PBS ou água ultrapura. Todas as amostras foram levadas até a análise por LC-MS/MS realizada pelo equipamento Q-Tof 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá).

A corrida cromatográfica foi realizada em 22 minutos no seguinte gradiente de eluentes: de 0 a 1 minuto com 5% de metanol/95% de água, de 1 a 14 minutos com rampa de 5% de metanol/95% de água até 95% de metanol/5% de água, de 14 a 17 minutos com 95% de metanol/5% de água, de 17 minutos a 18 minutos com rampa de 95% de metanol/5% de água até 5% de metanol/95% de água e de 18 a 22 minutos com 5% de metanol/95% de água. O volume de injeção para corrida foi de 2 µL. A coluna utilizada foi uma Kinetex® 2.6 µm XB-C18 100 Å. Os espectros foram adquiridos em modo positivo.

### 4.9. Avaliação de capacidade antioxidante por ABTS

O radical ABTS foi preparado a partir da junção de uma solução de 7mM do sal ABTS em água ultrapura com uma solução de 245mM de persulfato de amônio (APS) em água ultrapura, de forma que a concentração de APS na solução final fosse

de 2,45mM. Esta solução foi guardada durante 16 horas em temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, a solução foi diluída até sua absorbância no comprimento de onda de 734 nm chegar a aproximadamente 0,700.

Soluções de Trolox em água ultrapura foram preparadas nas seguintes concentrações estoque: 20, 60, 100, 150, 200, 250, 400 e 800 µM. Uma placa de 96 poços foi utilizada para o ensaio. Uma alíquota de 10 µL de cada solução estoque foi diluída em 200 µL da solução de ABTS. Para cada solução estoque, foi feita a medida em triplicata.

As soluções de peptídeo utilizadas foram as mesmas apresentadas no subitem 4.8. Alíquotas de 10µL, 7,5µL e 2,5µL foram colocadas em poços para cada peptídeo. Para as alíquotas de 7,5 µL e 2,5 µL, foi acrescentado uma solução de 1,5% de DMSO em água ultrapura até o volume de 10 µL. Posteriormente, as alíquotas foram diluídas em 200 µL da solução de ABTS. Para cada alíquota, foi feita a medida em duplicata.

As alíquotas de Trolox e dos peptídeos foram feitas na mesma placa e a absorbância no comprimento de onda de 734 nm foi medida a cada 5 minutos utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA).

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1. Síntese do cPaT-2 linear e sua caracterização por MS

A síntese do peptídeo cPaT-2 foi realizada conforme a metodologia apresentada. As etapas de desproteção e acoplamento de aminoácidos foram confirmadas pelo Teste de Kaiser a cada ciclo, sem complicações quanto aos resultados do teste qualitativo. O peptídeo foi clivado da resina após um último ciclo de desproteção do grupo Fmoc e posteriormente liofilizado, obtendo-se um sólido granulado branco.

Para a caracterização do cPaT-2, visando a confirmação do sucesso da síntese, foi preparada uma amostra do produto bruto, conforme a metodologia descrita, a qual foi analisada por Espectrometria de Massa. A Tabela 4 apresenta a estrutura primária do cPaT-2, sua massa monoisotópica teórica calculada correspondente aos íons $[M+H]^+$ e a massa obtida experimentalmente. A Figura 19 apresenta o espectro de MS do cPaT-2, evidenciando os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$.

Tabela 4 - Massa monoisotópica teórica e experimental do cPaT-2 linear

| Estrutura primária | $[M+H]^+$ Teórica (Da) | $[M+H]^+$ Experimental (Da) | Erro (ppm) |
|---|---|---|---|
| CGFPPWLGC-$NH_2$ | 978,4329 | 978.4344 | 1,5 ppm |

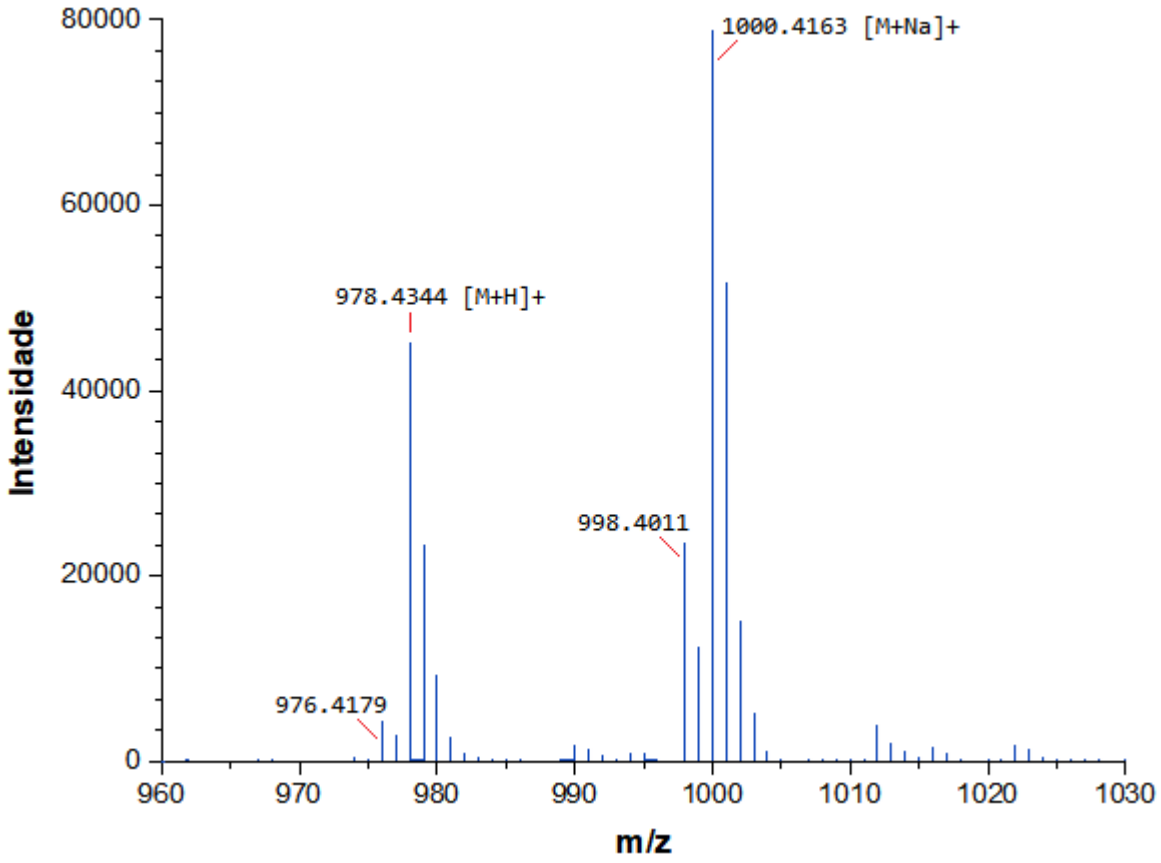



*Figura 19: Espectro de MS do cPaT-2 linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 978,4344 Da e 1000,4163 Da respectivamente.*

Moléculas ionizadas via ESI podem formar espécies protonadas através de reações de ácido e base de Brönsted-Lowry, como os íons monocarregados $[M+H]^+$ ou duplamente carregados $[M+2H]^{2+}$. Também, através de reações ácido e base de Lewis, adutos podem ser formados mediante interações entre cátions e a molécula neutra, o caso de íons como $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ [60]. No espectro do cPaT-2, observam-se os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. A observação de dois ou mais íons correspondentes a uma mesma molécula neutra parental aumenta a confiabilidade de sua atribuição no espectro.

Além dos íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, outros dois íons chamam a atenção: os íons de *m/z* 976,4179 e *m/z* 998,4011. Estes íons possuem cerca de 2 Da a menos que os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ respectivamente.

A ligação dissulfeto, formada a partir de sulfidrilas, em termos de massa, é caracterizada pela perda de 2,0156 Da vindos dos dois hidrogênios que são liberados no processo, um de cada sulfidrila. A partir disto, retirando 2,0156 Da do íon $[M+H]^+$

teórico para o cPaT-2 linear (*m/z* 978,4329), obtém-se que o valor teórico para o íon $[M+H]^+$ do cPaT-2 pós-oxidação seria de 976,4173 Da (Figura 20).

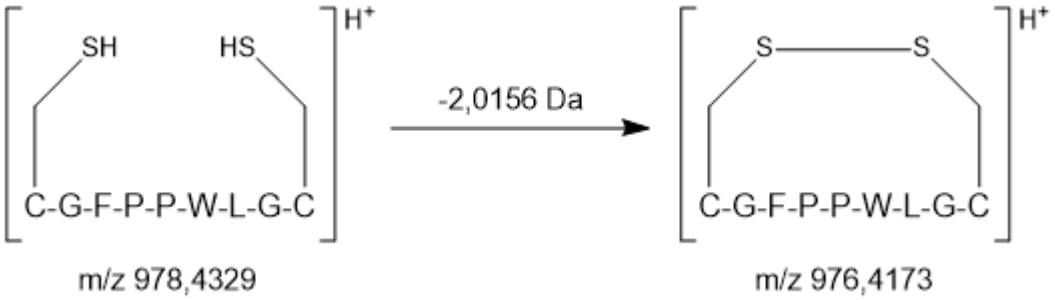



*Figura 20: Perda de 2,0156 Da advinda da formação da ligação dissulfeto no cPaT-2.*

Com isso, o íon de *m/z* 976,4179 observado no espectro da Figura 18 trata-se da versão oxidada do cPaT-2, onde ambas cisteínas estão conectadas através de ligação dissulfeto. Analogamente, o íon de *m/z* 998,4011 corresponde ao aduto de sódio do cPaT-2 oxidado. Esta análise permite inferir que uma parcela do cPaT-2 sintetizado possuí tendência a oxidar-se mesmo sem ter passado por uma reação de oxidação.

Para a caracterização da estrutura primária do cPaT-2, o íon $[M+H]^+$ foi isolado e submetido a fragmentação por colisão com moléculas de gás inerte (técnica de fragmentação CID), gerando o espectro de MS/MS apresentando na Figura 21.

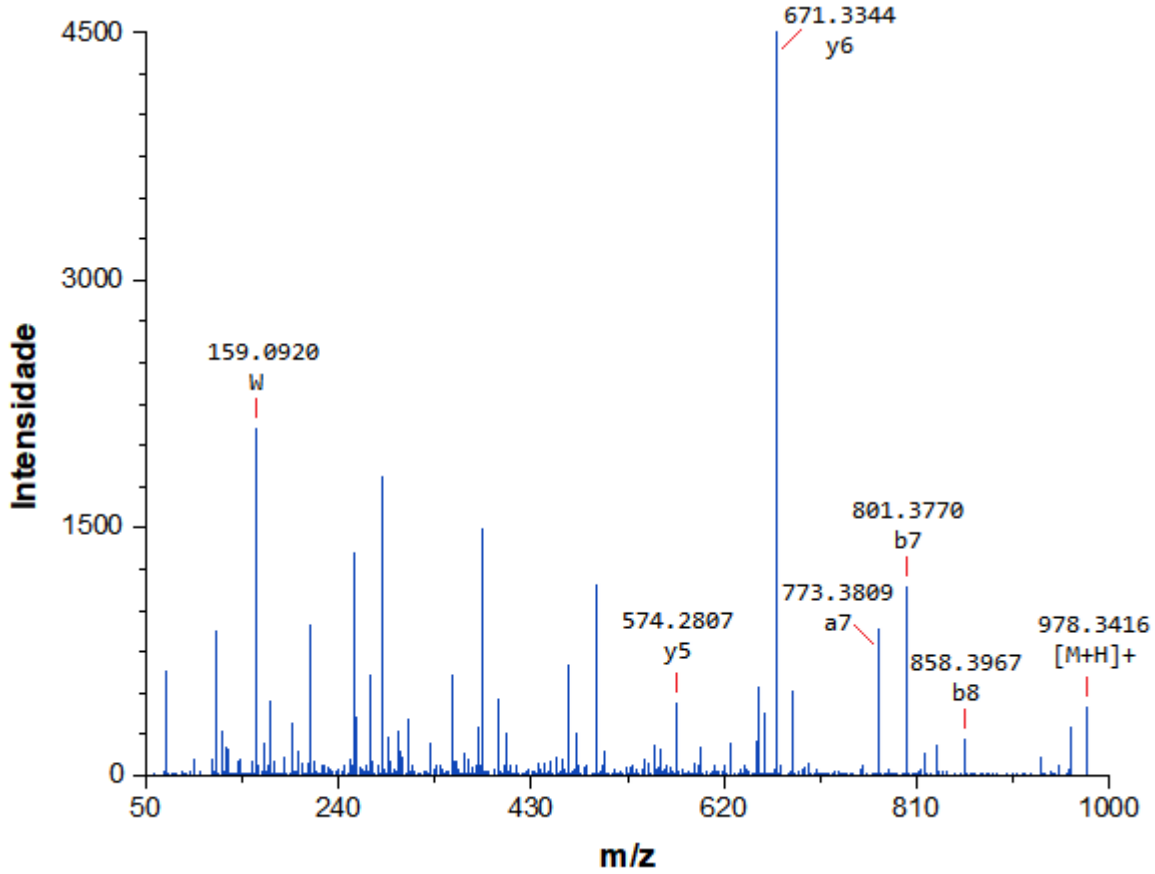



*Figura 21: Espectro de MS/MS do cPaT-2 linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 978,3416 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

A fragmentação de peptídeos gera padrões conhecidos de íons que podem ser explicados pelo "modelo do próton móvel"[61]. Durante a colisão com moléculas de gás inerte, o peptídeo adquire uma maior energia interna, o que induz a transferência intramolecular de prótons nos vários sítios de protonação presentes na molécula, gerando a sua desestabilização e as fragmentações. Os íons fragmentos comumente gerados em peptídeos são divididos em dois grupos, aqueles que retém a carga contendo o lado N-terminal (os íons das séries -a, -b, -c, dependendo da ligação fragmentada) e aqueles que retém a carga contendo o lado C-terminal (os íons das séries -x, -y, -z, dependendo da ligação fragmentada)[39].

Como, de acordo com o modelo do próton móvel, os prótons estão constantemente sendo transferidos em diferentes sítios de protonação, os mecanismos de fragmentação das séries observadas competem entre si[61]. No esqueleto peptídico, as ligações peptídicas são as menos energéticas, portanto são as mais facilmente quebradas após o CID. A quebra da ligação peptídica gera os

fragmentos das séries y e b, que são os íons comumente mais observados em um espectro de MS/MS de um peptídeo, sendo utilizados para a elucidação de estruturas primárias[39].

O mecanismo de fragmentação dos íons das séries y e b se dá mediante a carga. Inicialmente, o próton adicionado no processo de ionização migra para o nitrogênio de uma ligação peptídica. Apesar do oxigênio de amidas ser mais básico que o nitrogênio, a protonação no nitrogênio enfraquece a ligação amídica[62], tornando-a propensa ao ataque nucleofílico do oxigênio amídico da ligação peptídica adjacente, formando um derivado de oxazolona e um peptídeo truncado. Estas duas porções geradas integram um dímero dividindo um próton que, ao final, pode permanecer no derivado de oxazolona ou ser transferido para o peptídeo truncado, gerando os íons da série b ou íons da série y, respectivamente[61].

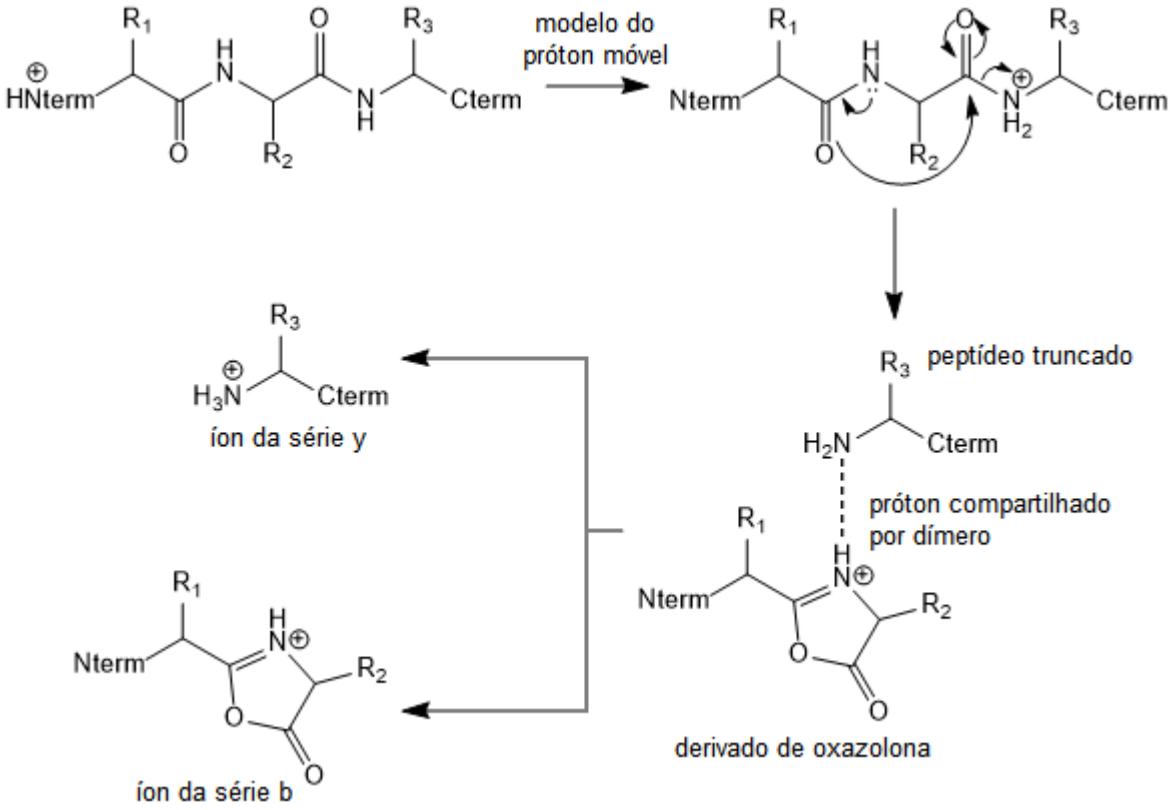



*Figura 22: Fragmentação de íons das séries y e b.*

Em vista deste mecanismo, observa-se que as vias de fragmentação que geram os íons das séries b e y são complementares entre si. A obtenção de íons y e b em um mesmo espectro permite a leitura dos fragmentos no sentido N-terminal para

C-terminal para uma série e de C-terminal para N-terminal para a outra série, gerando informações complementares, o que aumenta a confiabilidade da leitura, sendo uma série a confirmação da outra[39].

Íons da série a também são comumente vistos nos espectros MS/MS de peptídeos, se tratando da perda neutra de monóxido de carbono a partir de fragmentos da série b, conforme mostra a Figura 23. Portanto, íons da série a possuem 27,9949 Da a menos que os íons da série b que os geraram. Outra classe de íons importante na análise de espectros de MS/MS de peptídeos são os íons imônio. Estes íons são gerados a partir da fragmentação tanto da porção N-terminal quanto da porção C-terminal de um resíduo de aminoácido presente na estrutura peptídica, formando íons de massa característica para cada um deles. Íons das séries -c, -x e -z não costumam ser vistos[39].

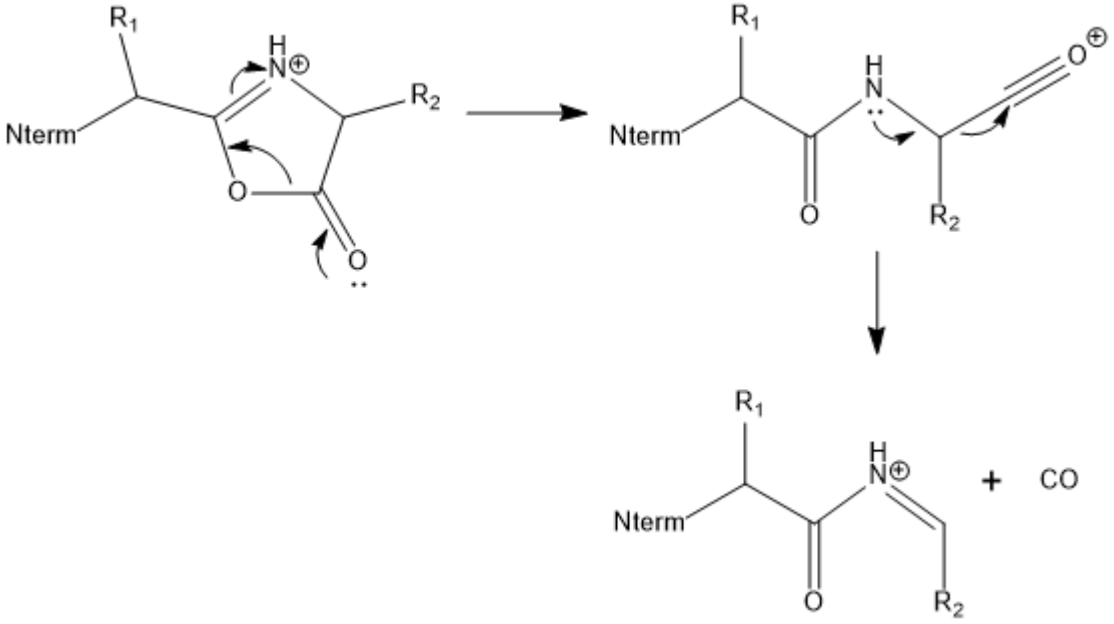



*Figura 23: Fragmentação de íons da série a.*

Todos os íons das séries b e y encontrados no espectro de MS/MS do íon precursor de *m/z* 978,4344, bem como íons da série a e também íons imônio, estão informados da Tabela 5.

Tabela 5: Íons fragmentos encontrados no espectro de MS/MS do íon precursor de *m/z* 978,4344

| **Íon encontrado** | **m/z** |
|---|---|
| y7 | 818,4025 |
| y6 | 671,3344 |
| y5 | 574,2807 |
| y4 | 477,2294 |
| b3 | 308,1067 |
| b4 | 405,1590 |
| b5 | 502,2122 |
| b6 | 688,2925 |
| b7 | 801,3770 |
| b8 | 858,3967 |
| a4 | 377,1651 |
| a5 | 474,2168 |
| a6 | 660,2969 |
| a7 | 773,3809 |
| a8 | 830,4027 |
| Imônio de P | 70,0679 |
| Imônio de F | 120,0814 |
| Imônio de W | 159,0920 |

A leitura da série y no espectro de MS/MS foi feita da direita para a esquerda, enquanto a leitura da série b foi feita da esquerda para a direita. Dada a complementaridade das séries y e b, bem como os íons adicionadas da série a e íons imônio, além da massa experimental obtida na análise ter pouca diferença em vista da massa teórica calculada para o cPaT-2 linear (1,5 ppm de erro), o peptídeo almejado foi sinterizado com sucesso.

É importante salientar que os resíduos de aminoácidos de leucina e isoleucina são isobáricos, ou seja, apresentam a mesma massa, portanto, não podem ter sua caracterização em uma sequência peptídica apenas pela leitura em um espectrômetro de massa[39]. O resíduo de leucina, no caso do cPaT-2, foi atribuído com certeza em vista dele ser um peptídeo sintético, cuja sequência já era conhecida

antes da análise. O mesmo vale para os primeiros dois aminoácidos em relação ao N-terminal, CG, que não tiveram sua ligação peptídica clivada e aparente tanto na série y quanto na série b, o que não permite atribuir se os primeiros dois aminoácidos estão na sequência CG ou GC. A sequência CG foi atribuída com certeza, novamente, por conta do cPaT-2 tratar-se de um peptídeo sintético.

### 5.2. Oxidação do cPaT-2 e sua caracterização por MS

Após caracterizado, o cPaT-2 linear foi oxidado, conforme a metodologia apresentada, para a formação de uma ligação dissulfeto entre os grupos tióis presentes nos resíduos de aminoácidos das cisteínas N-terminal e C-terminal. O produto obtido após a oxidação foi liofilizado, sendo obtido um sólido granulado branco. Uma amostra do produto bruto foi tomada e analisada por espectrometria de massa para a confirmação da oxidação. A Tabela 6 apresenta a massa monoisotópica teórica calculada correspondente aos íons $[M+H]^+$ do cPaT-2 pós-oxidação, conforme executado na Figura 20, a massa obtida experimentalmente e o erro associado. A Figura 24 exibe o espectro de MS do mesmo.

Tabela 6 - Massa monoisotópica teórica e experimental do cPaT-2 cíclico

| Peptídeo | $[M+H]^+$ Teórica (Da) | $[M+H]^+$ Experimental (Da) | Erro (ppm) |
|---|---|---|---|
| cPaT-2 cíclico | 976,4173 | 976,4179 | 0,6 ppm |

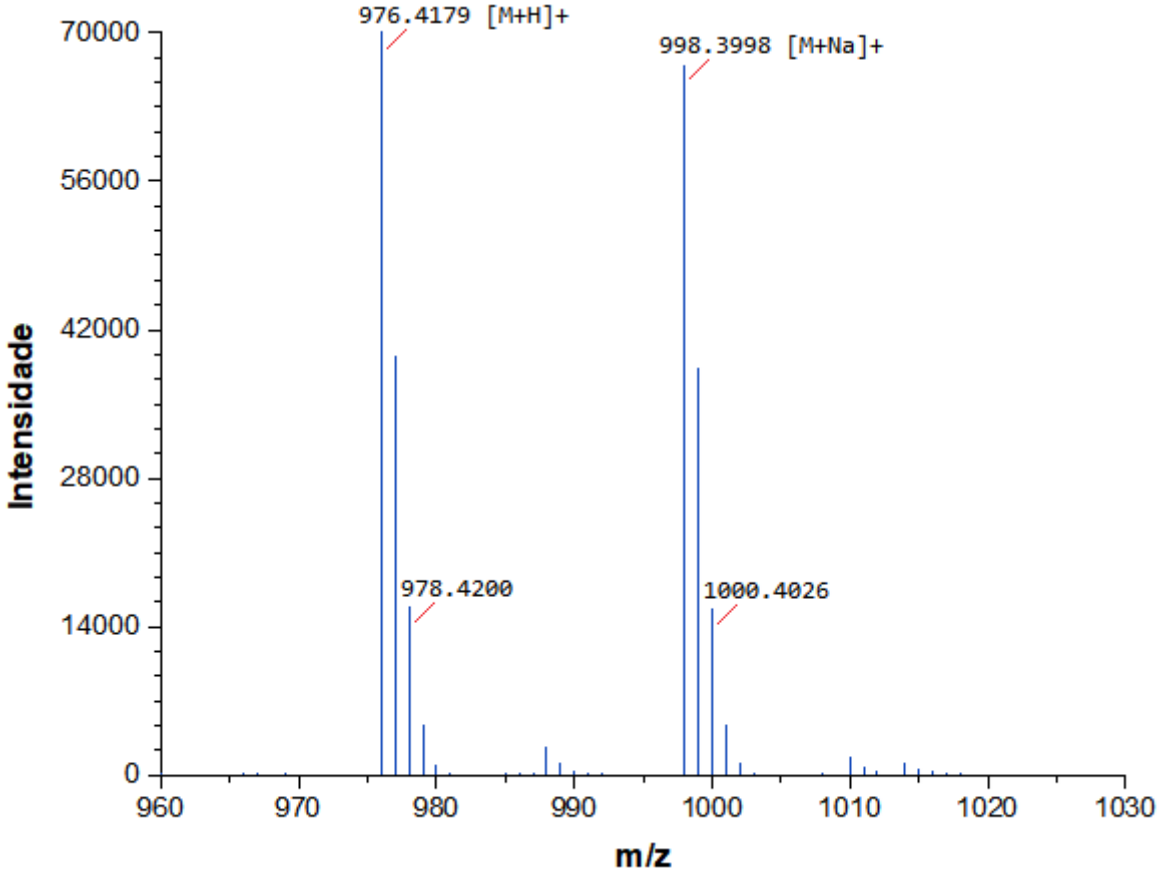



*Figura 24: Espectro de MS do cPaT-2 cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 976,4179 Da e 998,3998 Da respectivamente.*

No espectro de MS obtido para o cPaT-2 pós-oxidação, observa-se o íon de *m/z* 976,4179, ao qual apresenta um erro de 0,6 ppm em relação ao valor esperado. Além disso, nota-se o íon de *m/z* 998,3998, que trata-se do aduto de sódio $[M+Na]^+$ correspondente. Essas observações mostram que a ciclização do cPaT-2 foi alcançada com sucesso. Não foram observados íons $[M+H]^+$ de *m/z* correspondente a uma possível oxidação entre um par de monômeros do cPaT-2 linear.

Outros dois íons são evidenciados no espectro, ambos contendo cerca de 2 Da a mais que os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$: os íons de *m/z* 978,4200 e 1000,4026, respectivamente. Tais íons poderiam ser referentes a uma porção do cPaT-2 que não sofreu oxidação ou aos sinais referentes aos isótopos dos elementos presentes na molécula. A fim de elucidar essa questão, foi utilizado o software PeakView para realizar o cálculo teórico da distribuição isotópica referente ao cPaT-2 cíclico. A Figura 25 mostra este cálculo em comparação aos sinais obtidos no espectro de MS do peptídeo.

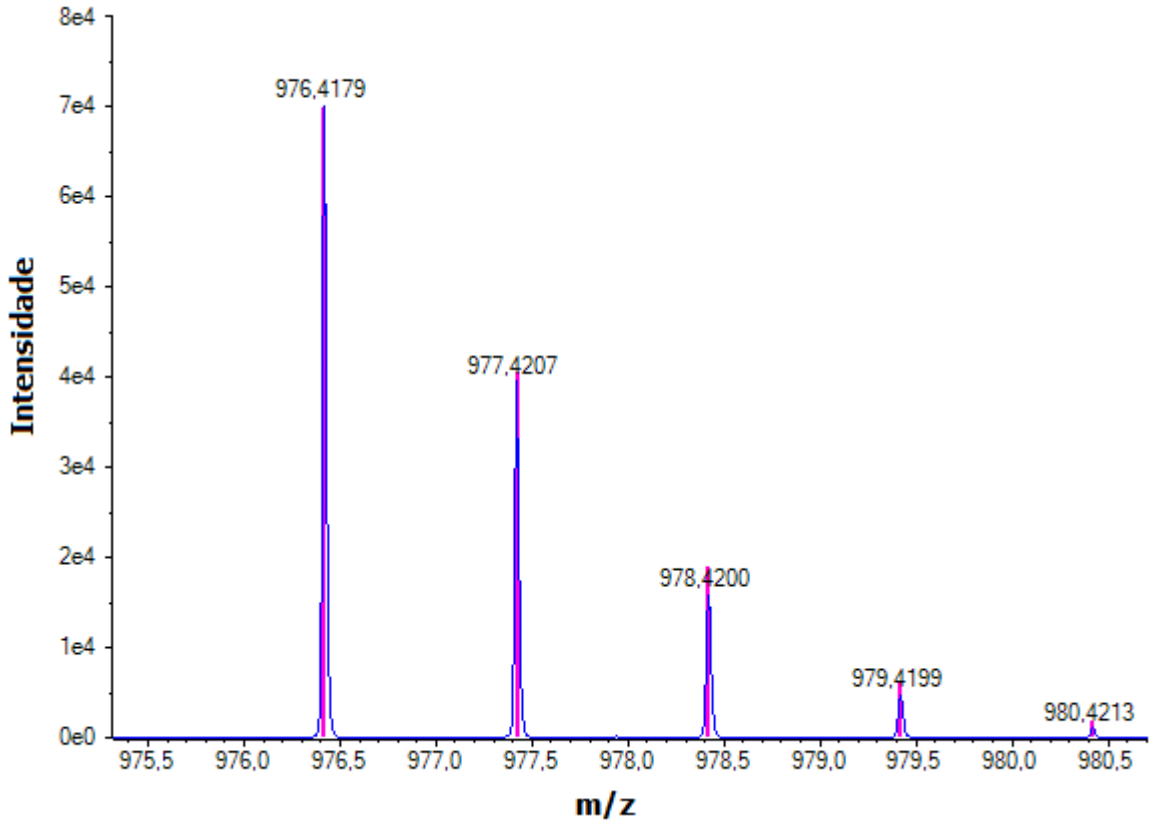



*Figura 25: Comparação entre o sinal experimental obtido no espectro de MS do cPaT-2 cíclico (linha azul) e o cálculo teórico de sua distribuição isotópica esperada (linhas em tom rosa).*

A partir da Figura 25, verifica-se que o sinal experimental do padrão isotópico obtido para o íon $[M+H]^+$ encontra-se de acordo com o cálculo teórico realizado. Caso uma porção do cPaT-2 não tivesse sofrido oxidação, a intensidade do sinal referente ao íon de *m/z* 978,4200 seria maior que o calculado teoricamente, uma vez que seria composto dos íons referentes ao cPaT-2 linear e também dos isótopos do cPaT-2 cíclico. Como a intensidade do sinal experimental encontra-se pouco abaixo do calculado, pode-se inferir que o cPaT-2 foi oxidado com um bom rendimento e que os íons de *m/z* 978,4200 e *m/z* 1000,4026 não se referem ao cPaT-2 linear.

O espectro de MS/MS do cPaT-2 pós-oxidação é exibido na Figura 26. Por este peptídeo ser cíclico, seu padrão de fragmentação é diferente do observado para peptídeos lineares, embora os mecanismos de fragmentação sejam análogos. O espectro possui íons do tipo fragmentos internos em maior abundância, tendo os íons comumente vistos em espectros de fragmentação de peptídeos (y, b, a) com baixa intensidade de sinal ou não mais presentes.

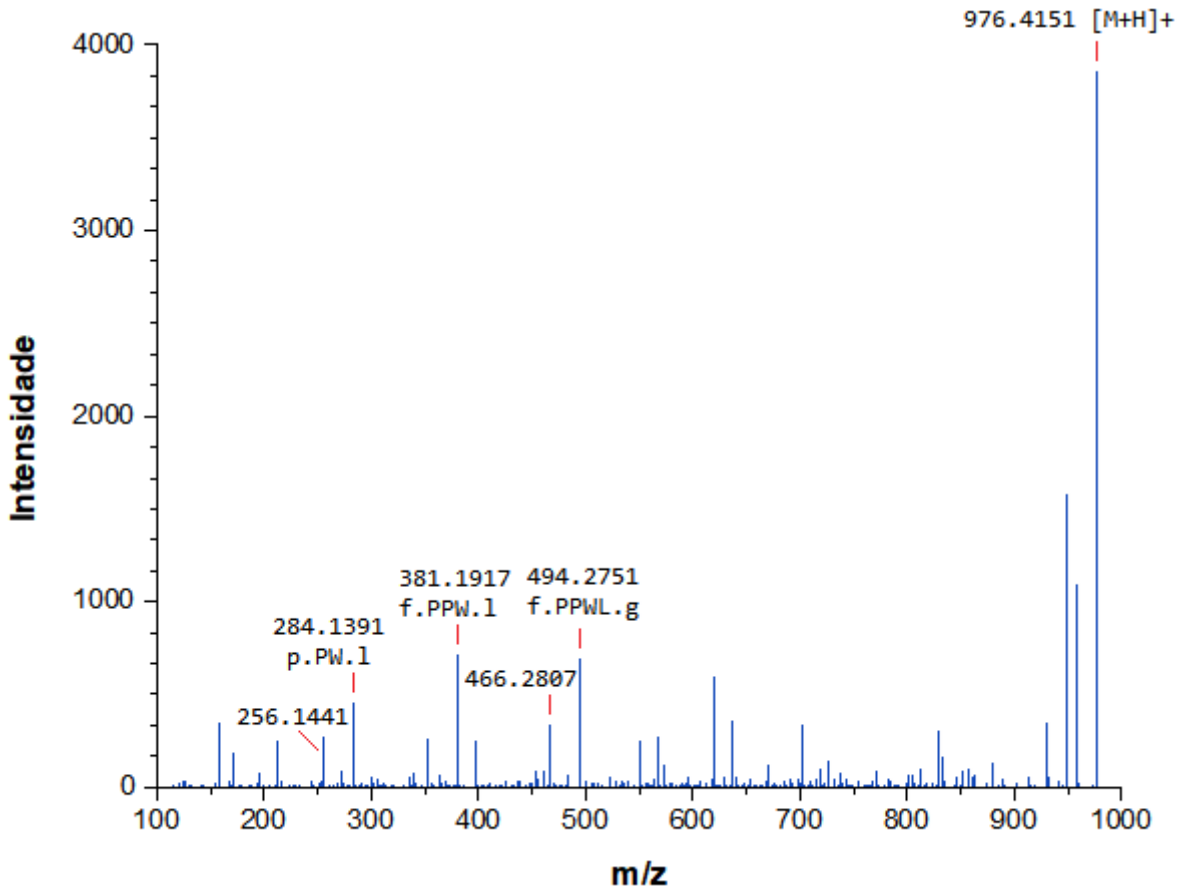



*Figura 26: Espectro de MS/MS do cPaT-2 cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 976,4151 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

Fragmentos internos em espectros de MS/MS de peptídeos são íons em que duas ligações amídicas são quebradas, de forma que o íon não preserva a porção N-terminal e C-terminal. Logo, estes íons apresentam uma parte interna da estrutura primária do peptídeo sem o primeiro e o último aminoácido da sequência, no mínimo[61].

O mecanismo de formação de fragmentos internos também ocorre via o descrito para os íons y e b, com a diferença que, para a produção de um fragmento interno, é necessário que ocorra a fragmentação em duas ligações amídicas distintas[61]. Inicialmente, é gerado um íon y ou b e, deste íon, uma nova fragmentação do tipo y/b ocorre em outra ligação amídica. Com isso, íons fragmentos internos têm origem no que seriam íons y ou b comumente observados[63], que não mais aparecem no espectro por conta das porções N-terminal e C-terminal estarem ligadas, no caso do cPaT-2, através de cadeias laterais de dois de seus aminoácidos, mantendo como valor de *m/z* o mesmo do íon $[M+H]^+$ na primeira fragmentação.

As Figuras 27 e 28 demonstram a proposta de fragmentação para o íon fragmento interno f.PPW.I, que apresenta 381,1917 Da. Na primeira fragmentação do tipo y/b, é formado um íon do tipo b a partir da clivagem da ligação amídica entre os resíduos de fenilalanina e a primeira prolina da sequência (Figura 27). Posteriormente, uma segunda fragmentação y/b ocorre e forma um novo íon b, clivando a ligação amídica presente entre os resíduos de triptofano e leucina (Figura 28). O fragmento gerado, então, apresenta três aminoácidos da estrutura primária do peptídeo, P-P-W, não contendo as porções N-terminal ou C-terminal.

Assim como os íons b formados pela fragmentação y/b em peptídeos lineares, os íons fragmentos internos, por terem origem análoga, também sofrem subsequente perde de CO. Na Figura 26, dois destes íons são observados: o íon de *m/z* 466,2807 corresponde a perda de CO do fragmento interno f.PPW.I, enquanto o íon de *m/z* 256,1441 corresponde a perda de CO do fragmento interno p.PW.I.

A nomenclatura utilizada para estes e outros íons fragmentos internos neste trabalho evidência os resíduos de aminoácidos conservados no fragmento em letras maiúsculas. Em letras minúsculas estão os aminoácidos anterior e posterior na estrutura primária do peptídeo, facilitando a visualização de qual ligação amídica foi quebrada. No caso do íon f.PPW.I, o fragmento interno conserva a sequência interna P-P-W (letras maiúsculas). Para o lado N-terminal, o resíduo anterior a primeira prolina na sequência é a fenilalanina (em letra minúscula), logo a ligação amídica clivada foi entre fenilalanina e a primeira prolina. O mesmo é aplicado ao lado C-terminal, portanto, a letra para o resíduo de leucina está minúscula.

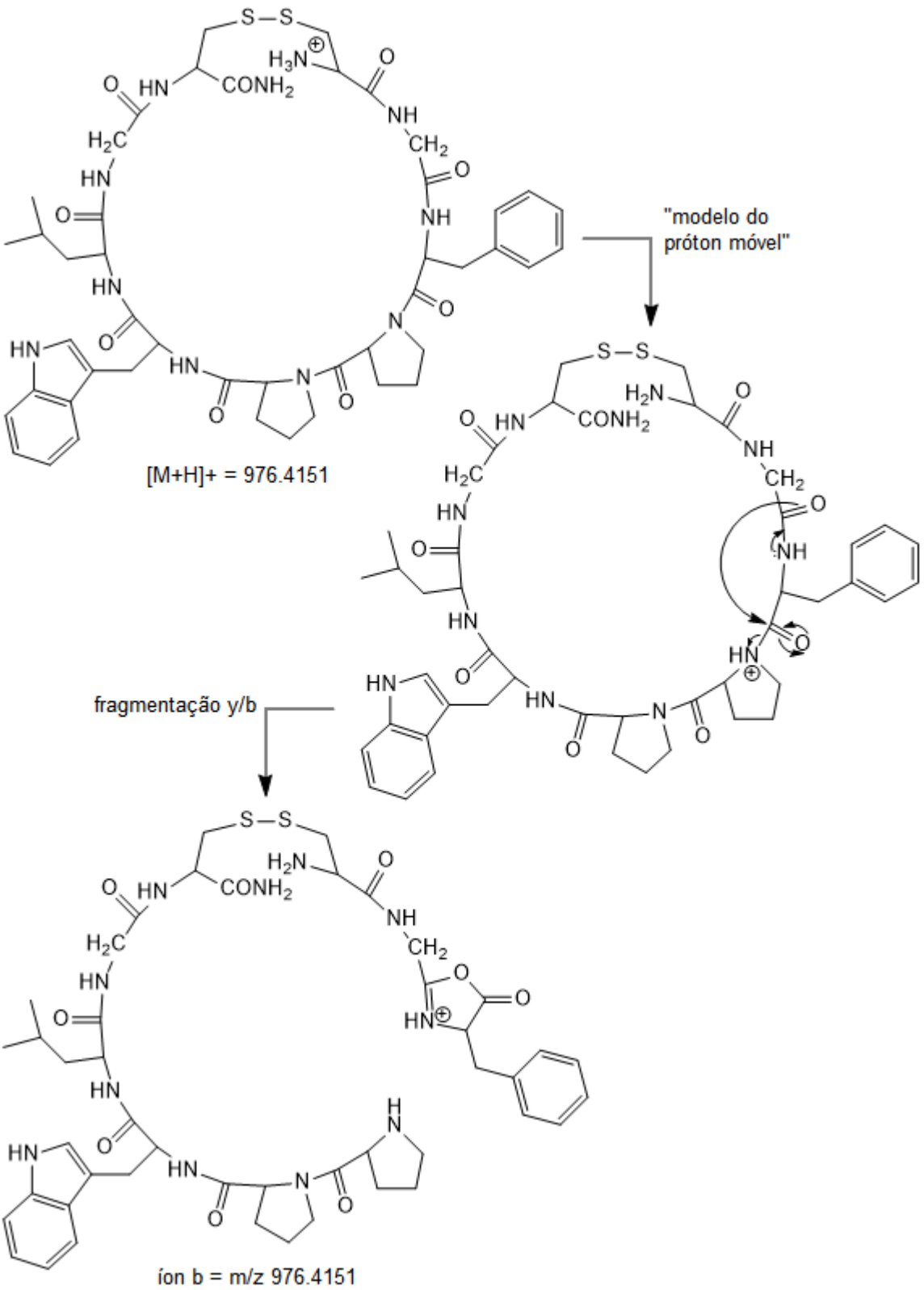



*Figura 27: Fragmentação da ligação amídica do cPaT-2 cíclico entre os resíduos Phe(3) e Pro(4).*

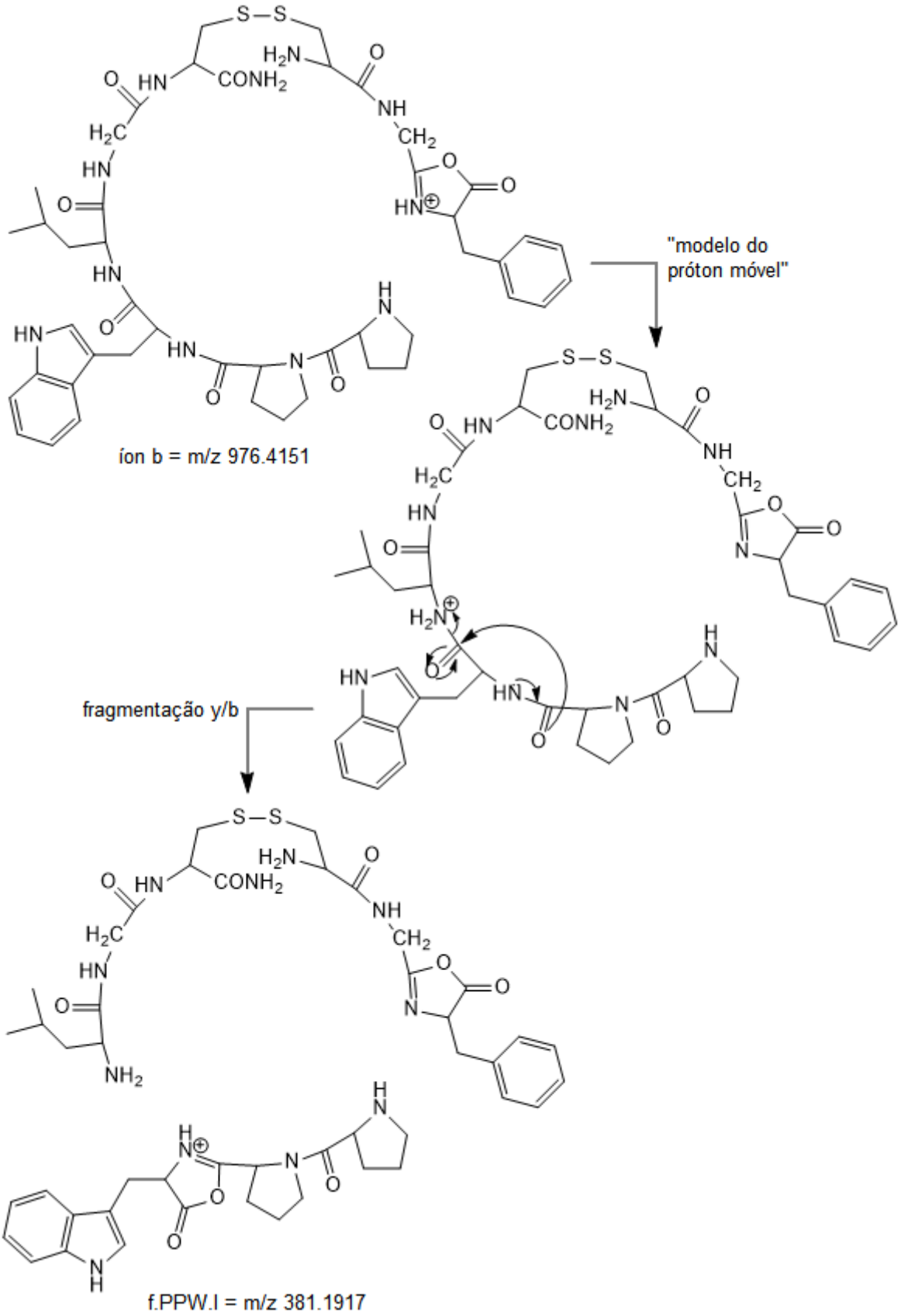



*Figura 28: Fragmentação da ligação amídica do cPaT-2 cíclico entre os resíduos Trp(6) e Leu(7), formando o fragmento interno f.PPW.I.*

Demais fragmentos internos encontrados no espectro de MS/MS do cPaT-2 cíclico são formados pela mesma sequência de fragmentação: fragmentação b/y → íon b → fragmentação b/y → íon b. Contudo, na segunda fragmentação b/y, existe a possibilidade de o próton ser dividido pelas duas moléculas formadas, gerando, ao final, um íon y. Taís íons, formados pela sequência de fragmentação: fragmentação b/y → íon b → fragmentação b/y → íon y, apresentam a ligação dissulfeto entre as cisteínas N-terminal e C-terminal.

A Figura 29 mostra o íon formado a partir do próton compartilhado com o fragmento interno f.PPW.l, nomeado w.LGC-CGF.p, de *m/z* 596,2302, no espectro de MS/MS do cPaT-2 cíclico. A regra para nomenclatura segue considerando em letras maiúsculas os resíduos conservados no fragmento e em letras minúsculas os aminoácidos anterior e posterior nas ligações amídicas clivadas, de acordo com a estrutura primária do peptídeo. Entre os resíduos de cisteína, foi colocado o hífen para enfatizar a existência da ligação dissulfeto, a qual cicliza o peptídeo. A Figura 30 demostra a formação do íon w.LGC-CGF.p.

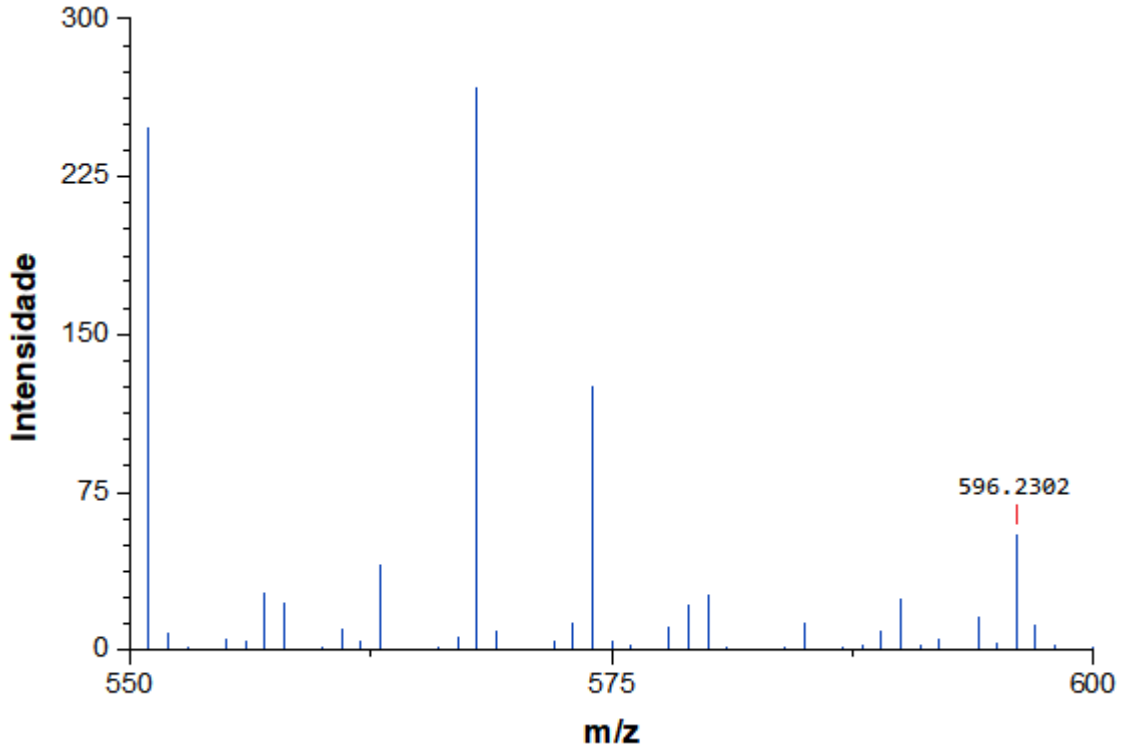



*Figura 29: Espectro de MS/MS do cPaT-2 cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon de m/z 596,2302 encontra-se evidenciado.*

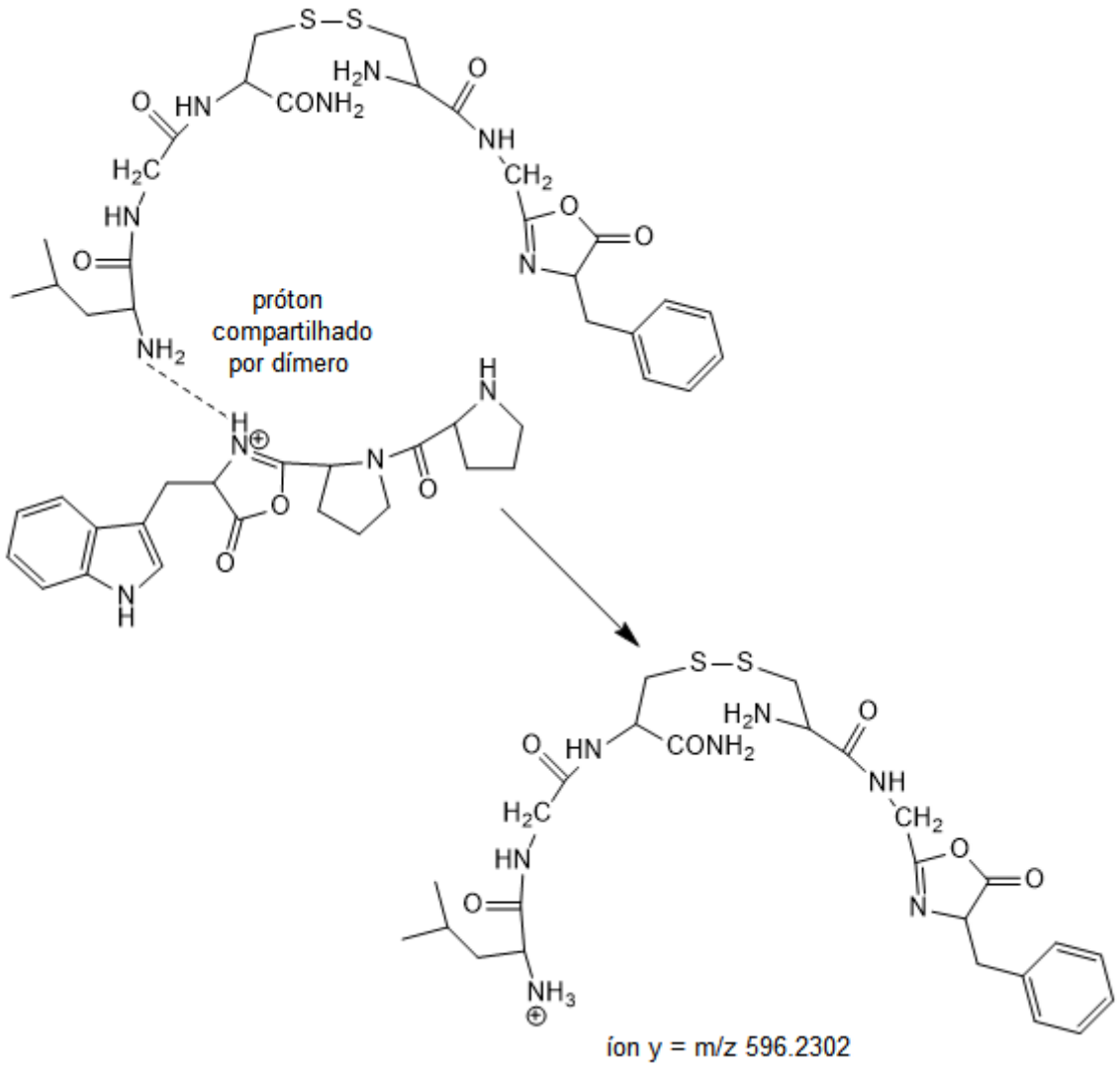



*Figura 30: Formação do íon w.LGC-CGF.p, que é o íon y formado a partir do compartilhamento do próton do fragmento interno f.PPW.l com sua perda neutra (peptídeo truncado do mecanismo de fragmentação y/b).*

Os fragmentos internos mais abundantes no espectro de MS/MS do íon precursor de *m/z* 976,4151, bem como íons imônio e demais fragmentos que apresentam a ligação dissulfeto preservada, estão informados na Tabela 7. Foram escolhidos os 10 íons mais abundantes dentre os fragmentos internos (contando os fragmentos originados de perda de CO) e os 5 mais abundantes dentre os fragmentos que apresentam a ligação dissulfeto preservada.

Tabela 7: Íons fragmentos mais abundantes encontrados no espectro de MS/MS do íon precursor de *m/z* 976,4151.

| **Íon encontrado** | **m/z** |
|---|---|
| f.PPWLG.c | 551,2962 |
| f.PPWL.g | 494,2751 |

Tabela 7: (Continuação)

| Íon encontrado | m/z |
|---|---|
| f.PPWL.g - CO | 466,2802 |
| f.PPW.l | 381,1917 |
| f.PPW.l - CO | 353,1968 |
| p.PWLG.c | 454,2439 |
| p.PWL.g | 397,2228 |
| p.PW.l | 284,1391 |
| p.PW.l - CO | 256,1441 |
| p.WL.g - CO | 272,1754 |
| f.PPWLGC-C.g | 772,3246 |
| p.PWLGC-CG.f | 732,2937 |
| w.LGC-CGF.p | 596,2302 |
| l.GC-CGF.p | 483,1468 |
| l.GC-CG.f | 336,0824 |
| Imônio de F | 120,0814 |
| Imônio de P | 70,0680 |
| Imônio de W | 159,0917 |
| Imônio de L | 86,0983 |

Dados os fragmentos internos encontrados, bem como demais fragmentos que apresentam a ligação dissulfeto preservada e íons imônio, além da massa experimental obtida na análise ter pouca diferença em vista da massa teórica calculada para o peptídeo (0,6 ppm de erro), a oxidação cPaT-2 almejada, gerando sua forma cíclica, foi realizada com sucesso.

### 5.3. Purificação do cPaT-2

Após a ciclização do peptídeo ter sido confirmada pela espectrometria de massa, o produto bruto foi purificado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) conforme a metodologia descrita. O cromatograma adquirido para a purificação do cPaT-2 é mostrado na Figura 31. O peptídeo eluiu em um tempo de

retenção de 28,87 minutos e foi coletado manualmente. Após a coleta, a solução foi liofilizada e obteve-se o cPaT-2 purificado em fase sólida, se tratando de um granulado branco.

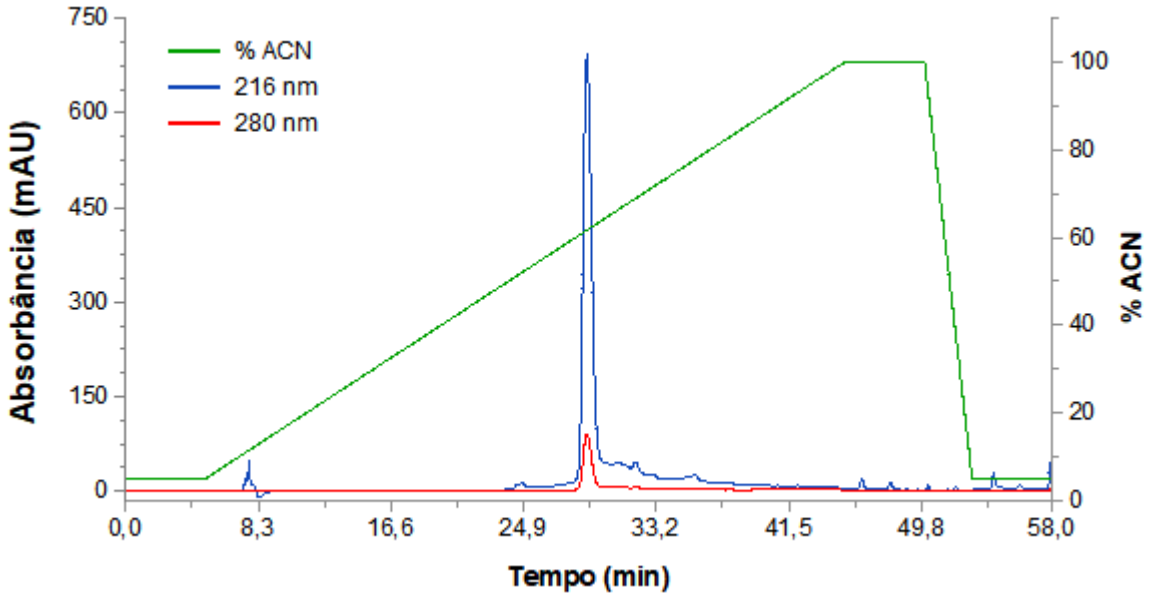



*Figura 31: Cromatograma referente a purificação do cPaT-2.*

É válido mencionar que, no trabalho de Barbosa et al. (2021), o PaT-2, após passar por cromatografia, apresentou dois tempos de retenção no cromatograma[11]. Isso é um indicativo de que o PaT-2 apresenta duas conformações nas condições da cromatografia. O cromatograma do cPaT-2 apresentou apenas um tempo de retenção, contudo, a cromatografia foi realizada em uma coluna preparativa, a qual possivelmente não apresenta resolução cromatográfica suficiente para distinguir populações. Uma cromatografia do cPaT-2 em uma coluna analítica poderia mostrar se, para o análogo cíclico, diferentes tempos de retenção poderiam ser obtidos.

## 5.4. Caracterização estrutural do cPaT-2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O peptídeo cPaT-2 purificado teve uma amostra preparada e enviada para análises no equipamento de RMN conforme descrito na metodologia. As análises seguiram por base o protocolo já utilizado na comunidade científica para a elucidação de estruturas tridimensionais de peptídeos, como mencionado anteriormente na

revisão bibliográfica. Inicialmente, foi feito um espectro unidimensional de $^{1}H$ para verificar a nitidez do espectro. O espectro obtido está mostrado na Figura 32.

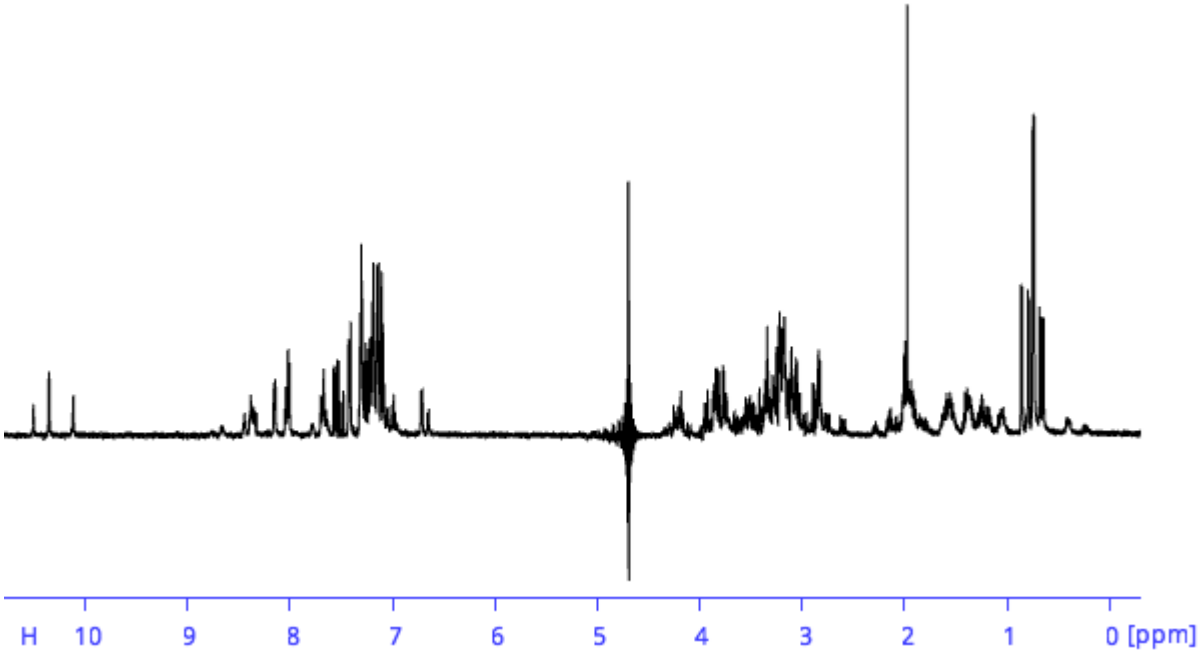



*Figura 32: Espectro unidimensional de $^{1}H$ do cPaT-2 ($H_2O/D_2O$ 95/5 v/v, 25°C).*

O espectro unidimensional de $^{1}H$ do cPaT-2 apresenta picos finos e nítidos, indicando que a amostra foi preparada de maneira apropriada e pode ser submetida às análises bidimensionais, estas que são essenciais para a elucidação de sua estrutura tridimensional. O espectro também apresenta padrões de sinais comumente observados em peptídeos, como os prótons amídicos (faixa entre 6,6 e 8,7 ppm), prótons encontrados em carbonos α e β de aminoácidos (faixa entre 2,5 e 4,5 ppm) e demais prótons de cadeias alifáticas (faixa entre 0 e 2,5 ppm). Como o cPaT-2 possui aminoácidos aromáticos em sua sequência, uma porção dos sinais entre 6,5 a 8 ppm são oriundos de prótons aromáticos. O sinal em 4,7 ppm trata-se do sinal da água, solvente da amostra.

O espectro ainda mostrou uma segunda informação, tratando-se dos três sinais obtidos na faixa entre 10 e 10,6 ppm, aos quais são mostrados com evidência na Figura 33.

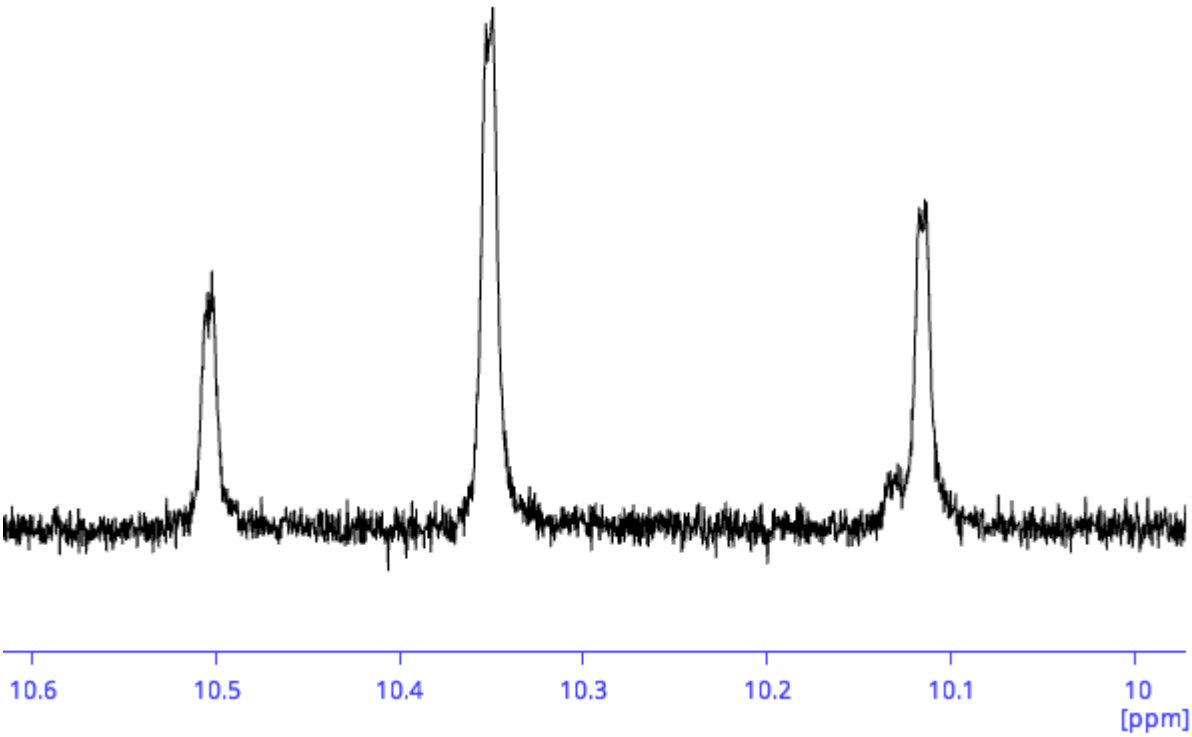



*Figura 33: Espectro unidimensional de $^{1}H$ do cPaT-2 ($H_2O/D_2O$ 95/5 v/v, 25°C) com a região entre 10 e 10,6 ppm ampliada.*

No caso do cPaT-2, o único átomo que pode explicar a ocorrência destes sinais no espectro é o hidrogênio ligado ao nitrogênio presente no anel indol da cadeia lateral do triptofano, cujo deslocamento químico médio encontra-se em 10,098[47]. Como, no peptídeo em questão, há apenas um resíduo de triptofano em sua estrutura primária, surgem duas hipóteses que podem explicar a aparição de três sinais nesta região: a cadeia lateral do triptofano possui mobilidade e, de acordo com três posições diferentes assumidas, geram os três sinais, ou o peptídeo em si assume três diferentes conformações, o que resulta nos três sinais obtidos.

A confirmação que o cPaT-2 assume três conformações diferentes veio a partir do experimento de TOCSY. Cada resíduo de aminoácido possui um padrão característico de sinais TOCSY relacionados ao seu hidrogênio amídico. Certos aminoácidos possuem padrões de sinais TOCSY muito semelhantes devido à presença de carbonos quaternários ou heteroátomos não ligados a um hidrogênio, os quais impedem a transferência da magnetização para o restante da cadeia lateral. Esse é o caso dos resíduos de cisteína, fenilalanina e triptofano presentes no cPaT-2. Nestes aminoácidos, apenas serão mostrados sinais para os carbonos α e β, uma vez que, no caso da cisteína, o próximo átomo da cadeia lateral é o enxofre (envolvido em

uma ligação dissulfeto, portanto sem hidrogênio), e, no caso dos resíduos aromáticos, trata-se de um carbono quaternário. Outros resíduos, no caso do peptídeo em questão, irão apresentar padrões de sinais TOCSY únicos em vista dos outros presentes na cadeia peptídica, como a glicina e a leucina. O resíduo de prolina, por ser cíclico e não possuir um nitrogênio amídico, não possui um padrão TOCSY na mesma faixa de deslocamento químico dos demais aminoácidos. A Figura 34 ilustra a transferência de magnetização nos resíduos de aminoácidos presentes no cPaT-2, destacando as características mencionadas.

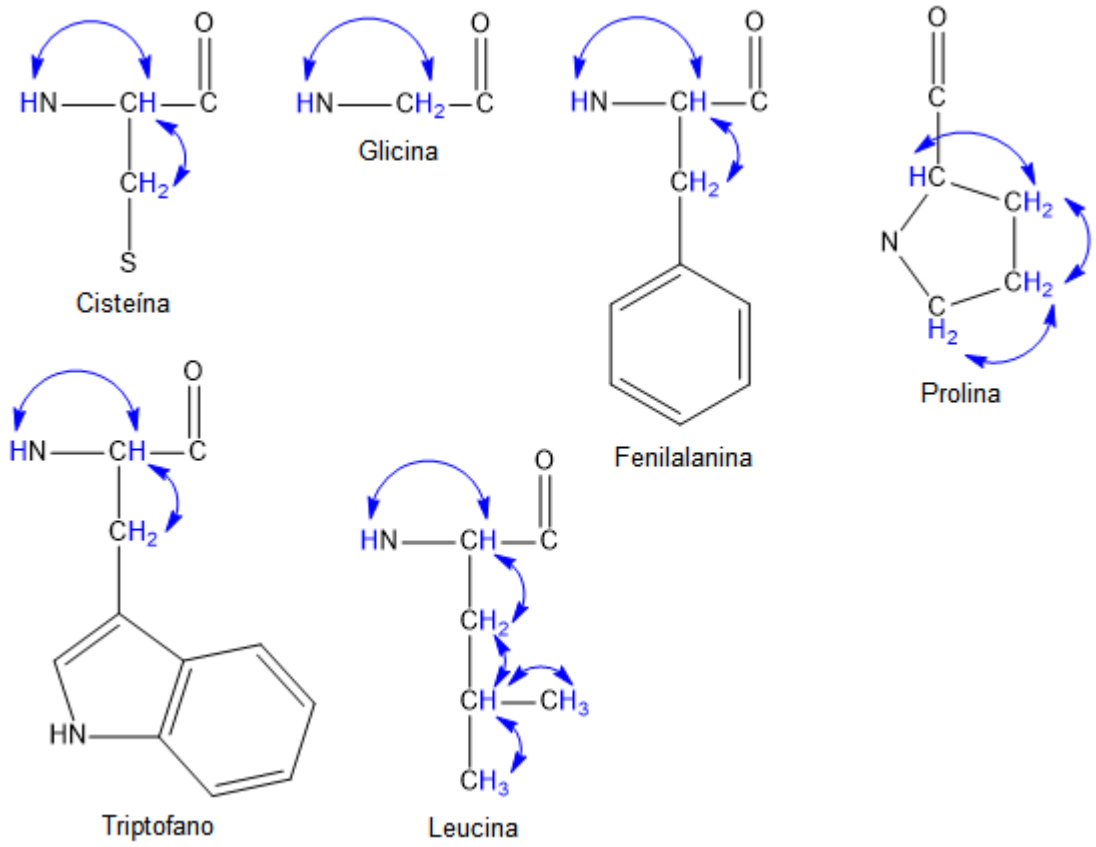



*Figura 34: Transferência de magnetização entre os hidrogênios dos resíduos de aminoácidos presentes no cPaT-2.*

No espectro de TOCSY adquirido para o cPaT-2, foi possível encontrar três padrões de sinais que são característicos para o resíduo de leucina, conforme é exposto na Figura 35. O resíduo de leucina, além de possuir um padrão TOCSY único no caso do cPaT-2, também ocorre em sua sequência primária apenas uma vez. Dessa forma, se o peptídeo em questão apresenta três conformações diferentes em solução, ele deve apresentar também um padrão de sinais TOCSY para a leucina de cada conformação, totalizando três, como visto experimentalmente. Essa observação

confirma que o cPaT-2 apresenta três conformações e que o observado no espectro unidimensional de $^{1}H$ não se trata de diferentes rotações da cadeia lateral do triptofano. Outra evidência no espectro de TOCSY que corrobora com a hipótese das três conformações é a quantidade de padrões TOCSY relacionados à nitrogênios amídicos. Para o cPaT-2, o esperado era a observação de 7 padrões TOCSY, no entanto, a quantidade observada no espectro é superior a este valor.

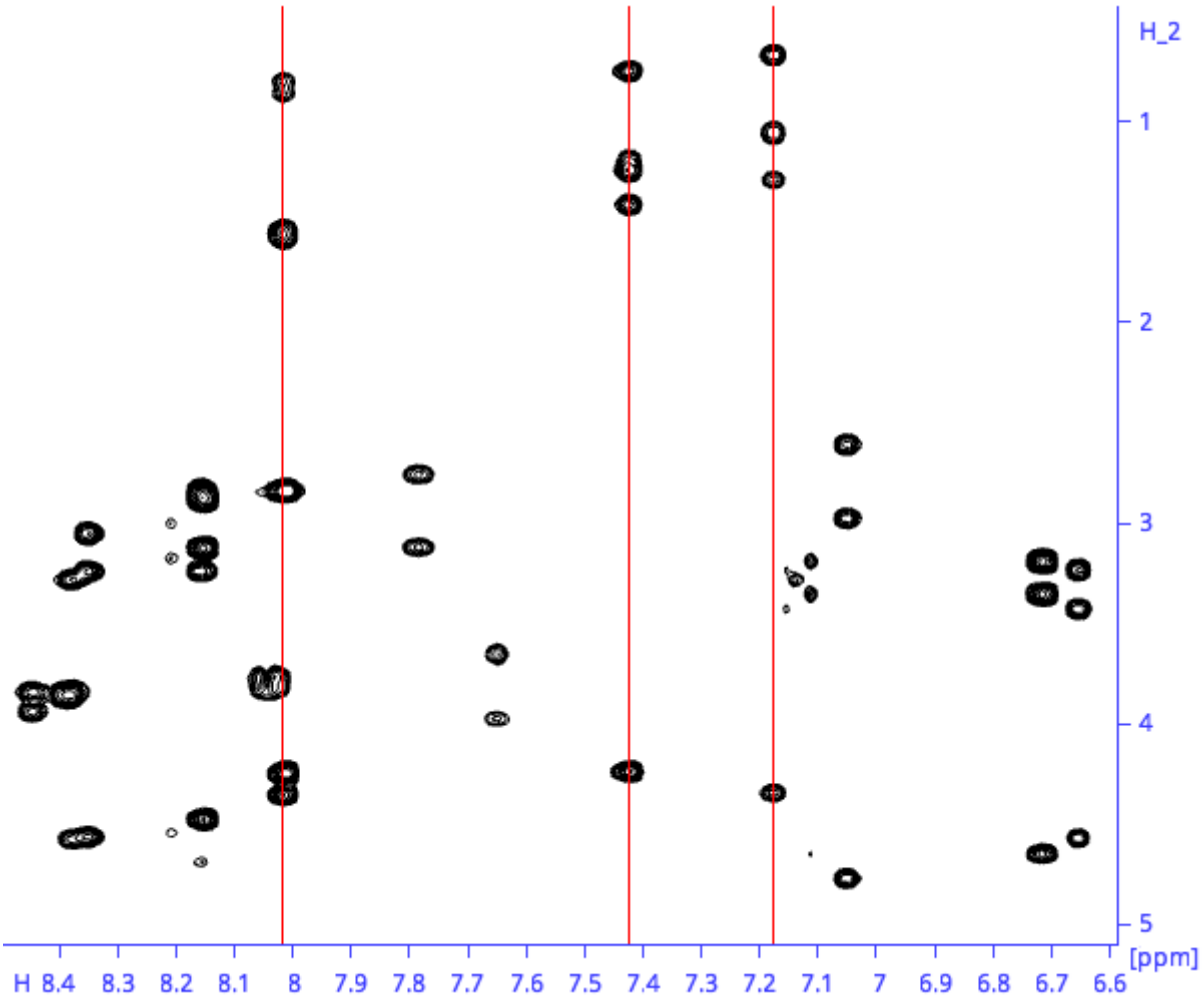



*Figura 35: Espectro de TOCSY adquirido para o cPaT-2 com a área entre 6,6 e 8,4 ppm ampliada (região de prótons amídicos). As três linhas vermelhas indicam as três faixas que contém sinais referentes ao resíduo de aminoácido de leucina para cada uma das três conformações assumidas pelo cPaT-2.*

Uma possível explicação para o aparecimento de múltiplas conformações está na hipótese de que alguns resíduos de prolina estejam assumindo a conformação *cis*[45]. Em uma cadeia peptídica, os resíduos de aminoácidos estão na conformação *trans* em sua grande maioria. Porém, como o resíduo de prolina é diferente dos outros aminoácidos por conta de sua estrutura anelar, a barreira energética entre as

configurações *trans* e *cis* é menor em vista dos fatores estéricos entre o carbono δ da prolina e o carbono α do resíduo de aminoácido ao seu lado na direção N-terminal[64]. Seguindo esta hipótese, quatro conformações se tornam possíveis para o cPaT-2, onde as prolinas estão arranjadas *trans-trans*, *trans-cis*, *cis-trans* ou *cis-cis* (Figura 36).

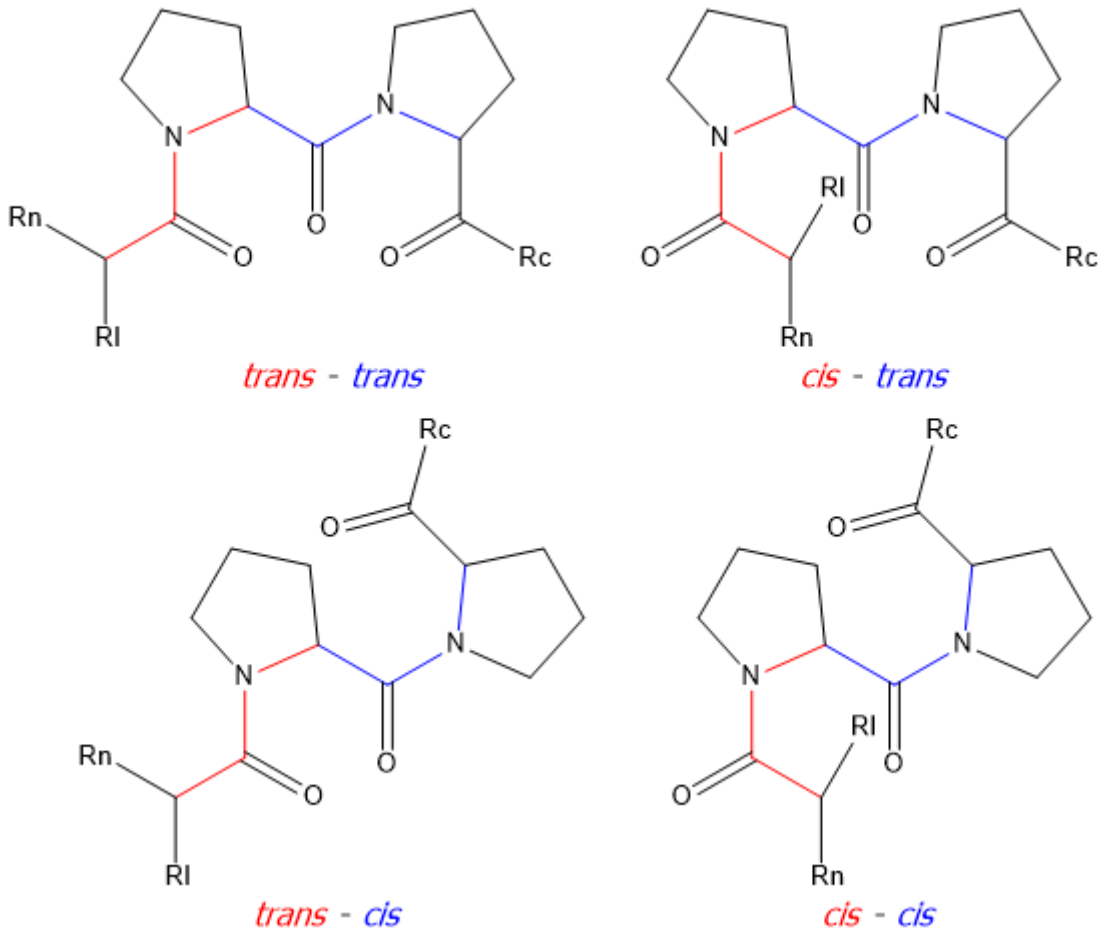



*Figura 36: Possíveis conformações entre duas prolinas subsequentes em um peptídeo. Em vermelho estão as ligações referentes a primeira prolina da sequência, enquanto em azul estão as ligações referentes a segunda prolina da sequência, evidenciando o caráter cis ou trans das ligações para ambas. Legenda: Rn = porção N-terminal do peptídeo, Rc = porção C-terminal do peptídeo, Rl = cadeia lateral de aminoácido.*

Como apenas três conformações são observadas nos espectros de RMN, isso sugere que uma dessas quatro pode não ser estável ou possua algum impedimento estérico. A conformação *trans-cis* já foi estudada em peptídeos que apresentam o motivo “Pro-Pro-Resíduo aromático” em sua sequência, como no caso do cPaT-2. A conformação *trans-cis* é favorecida devido a uma interação entre o hidrogênio do carbono α da primeira prolina (seguindo a ordem de N-terminal para C-

terminal) e a cadeia lateral aromática do aminoácido (interação do tipo CH···π), permitida pela segunda prolina assumindo a conformação *cis* (Figura 37)[64].

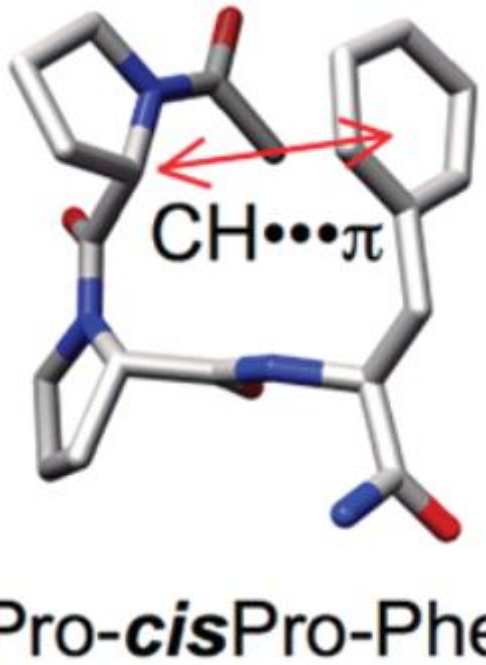



*Figura 37: Interação do tipo CH···π entre o carbono α da primeira prolina e a cadeia lateral aromática da fenilalanina, ref. 64.*

Em prol de favorecer apenas uma conformação e facilitar a leitura dos espectros de RMN, novos espectros unidimensionais de $^{1}H$ foram adquiridos em diferentes temperaturas, uma mais baixa (4°C) e outra mais alta (75°C). Os espectros estão apresentados na Figura 38. Em todas as temperaturas, os três sinais do hidrogênio ligado ao nitrogênio presente no anel indol do triptofano estão presentes, indicando que as três conformações são estáveis na faixa de temperatura analisada.

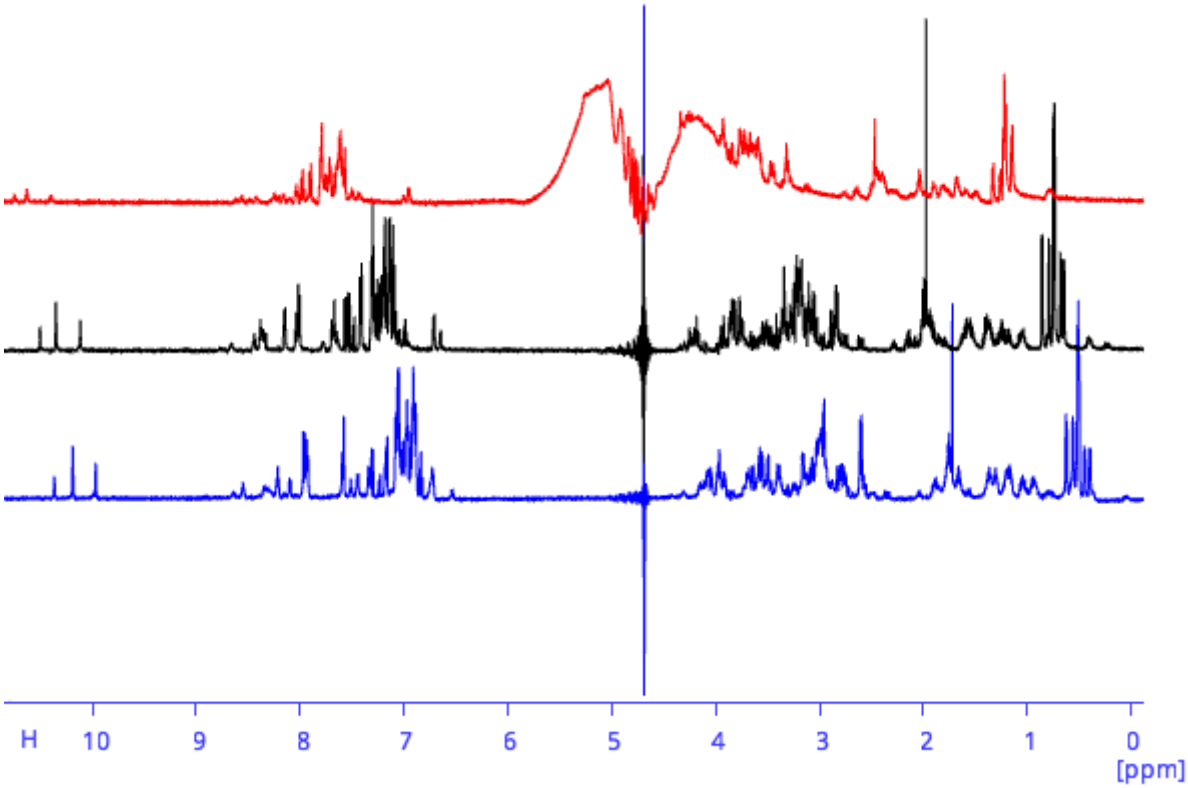



*Figura 38: Espectros unidimensionais de $^{1}H$ do cPaT-2 adquiridos nas temperaturas de 4°C (azul), 25°C (preto) e 75°C (vermelho).*

A atribuição completa dos sinais foi obtida apenas para uma conformação. Para isto ser possível, foi necessário adquirir dados em um experimento de ROESY. Os espectros de ROESY conferem as mesmas informações que os de NOESY (interações entre átomos próximos através do espaço), sendo utilizados para moléculas na faixa próxima dos 1000 a 2000 Da. O sinal NOE é dependente de alguns fatores: distância entre os átomos, a frequência de Larmor e o tempo de correlação rotacional (tempo médio que uma molécula leva para girar um radiano). O tempo de correlação rotacional é função da massa da molécula. Para moléculas na faixa próxima aos 1000 a 2000 Da o sinal NOE fica próximo de um valor nulo, ou seja, espectros de NOESY destas moléculas podem não apresentar sinal algum, como foi o caso do cPaT-2. Para contornar este problema, foi realizado o espectro de ROESY, ao qual trata-se de um NOESY feito no Sistema de Referência em Rotação. Os espectros de ROESY apresentam sinais para moléculas com massa na faixa entre 1000 a 2000 Da, além de uma menor probabilidade da ocorrência de difusão de spin. Contudo, estes experimentos tendem a produzir mais artefatos[42,44].

Os valores de deslocamentos químicos atribuídos para átomos de hidrogênio presentes em uma das conformações do cPaT-2 estão evidenciados na Tabela 8. Os deslocamentos químicos atribuídos foram inferidos através dos espectros de TOCSY e ROESY. Pela quantidade de sinais em vista das três conformações assumidas, vários são ambíguos, de forma que parte destes foram atribuídos hipoteticamente para determinado aminoácido e, posteriormente, submetidos ao cálculo computacional para a elucidação da estrutura tridimensional. De acordo com os resultados de cada novo cálculo submetido, a atribuição dos sinais foi refinada até o resultado final. O mesmo procedimento foi adotado para os prótons aromáticos, que também apresentam sinais ambíguos.

Tabela 8: Valores de deslocamento químico atribuídos para cada átomo de hidrogênio presente no cPaT-2 de acordo com o seu resíduo de aminoácido.

| **Resíduo de aminoácido** | **Hidrogênios e deslocamentos químicos** |
|---|---|
| 1-Cys | H - 8,346 / HA - 4,561 / HB - 3,241; 3,048 |
| 2-Gly | H - 8,442 / HA - 3,938 |
| 3-Phe | H - 8,020 / HA - 4,236 / HB - 2,837 / HD - 7,305 / HE - ? / HZ - ? |
| 4-Pro | HA - 3,511 / HB - 1,363; 1,054 / HG - 0,412 / HD - 3,192 |
| 5-Pro | HA - 4,196 / HB - 2,153 / HG – 2,010 / HD - 3,363; 3,200 |
| 6-Trp | H - 6,715 / HA - 4,645 / HB - 3,349; 3,190 / HD1 - 7,107 / HE1 - 10,348 / HE3 - 7,531 / HZ2 - 7,415 / HZ3 - ? / HH2 - ? |
| 7-Leu | H - 7,421 / HA - 4,236 / HB - 1,394 / HG - 1,234 / HD - 0,747 |
| 8-Gly | H - 8,040 / HA - 3,818 |
| 9-Cys | H - 8,150 / HA - 4,696 / HB - 3,241; 2,871 |

*Prótons com dois valores atribuídos indicam prótons quimicamente diferentes em um mesmo carbono. Prótons com ? não foram atribuídos.

Múltiplas conformações já foram observadas anteriormente em espectros bidimensionais de RMN. No estudo de Francart et al. (1996), três conformações diferentes foram observadas em seu peptídeo de estrutura primária CLPREPGLC, cujas cisteínas N-terminal e C-terminal estão ligadas por meio de uma ligação

dissulfeto, como feito no cPaT-2. Essas diferentes conformações foram atribuídas aos resíduos de prolina, que assumiram configurações *trans-trans*, *trans-cis* e *cis-trans*. A estrutura tridimensional foi calculada para a conformação de maior abundância, *trans-trans*[65].

Sinais ROE, que indicam a proximidade de átomos através do espaço estão mostrados na Tabela 9. Ao todo foram encontrados 54 sinais. A Figura 39 exemplifica alguns desses sinais na faixa do deslocamento químico de prótons amídicos no espectro de ROESY.

Tabela 9: Todos os sinais ROE atribuídos para uma das conformações do cPaT-2 encontrados no espectro de ROESY

| **Hidrogênio** | **Hidrogênios que apresentaram sinal ROE correspondente** |
|---|---|
| C1-H | C1-HA; C1-HBx; G2-HA |
| G2-H | G2-HA |
| F3-H | F3-HA; F3-HB |
| F3-HA | F3-HD |
| F3-HB | F3-HD; P4-HA |
| F3-HD | P4-HA; P4-HBx; W6-HBx; W6-HBy; C9-HA |
| P4-HA | P4-HBx; P4-HG; P4-HD; P5-HDx |
| P4-HBy | L7-H |
| P5-HA | P5-HB; P5-HG; P5-HDx; W6-H |
| P5-HG | W6-H; W6-HE3 |
| W6-H | W6-HA; W6-HBx; W6-HBy; W6-HD1; W6-HE3; L7-H |
| W6-HA | W6-HD1; W6-HE3; L7-H |
| W6-HBx | W6-HD1; W6-HE3; L7-H |
| W6-HBy | W6-HD1; W6-HE3; L7-H |
| W6-HD1 | W6-HE1; L7-HA; L7-HD |
| W6-HE1 | W6-HZ2 |
| W6-HE3 | L7-HA |
| L7-H | L7-HA; L7-HB; L7-HG; G8-H |
| L7-HA | G8-H |
| L7-HB | G8-H |

Tabela 9: (Continuação)

| Hidrogênio | Hidrogênios que apresentaram sinal ROE correspondente |
|---|---|
| G8-H | G8-HA |
| G8-HA | C9-H |
| C9-HA | C9-HBx |

*Legenda: Código de uma letra para o aminoácido e sua posição na cadeia peptídica em relação N-terminal para C-terminal – hidrogênio presente neste resíduo de aminoácido. Exemplo, L7-HA trata-se do hidrogênio ligado ao carbono α do resíduo de leucina que está na posição 7 na cadeia peptídica do cPaT-2.

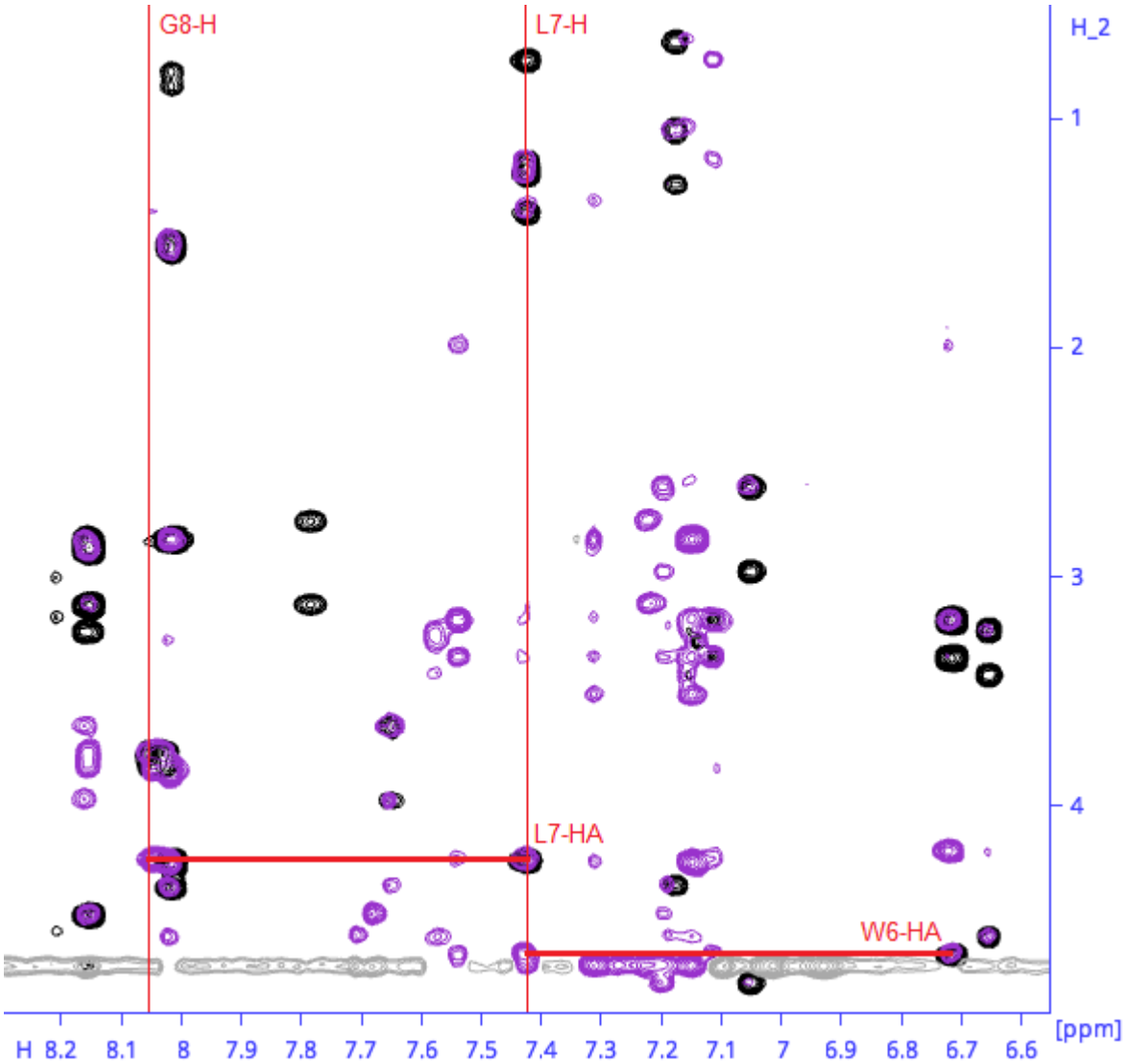



*Figura 39: Espectro de TOCSY em preto e ROESY em roxo, sobrepostos, adquiridos para o cPaT-2, com a área entre 6,6 e 8,2 ppm ampliada (região de prótons amídicos). Dois sinais ROE estão em evidência, a correlação entre os prótons G8-H e L7-HA (à esquerda) e L7-H e W6-HA (à direita). Estes sinais mostram a proximidade entre W6-L7-G8 na sequência do cPaT-2. As linhas vermelhas finas indicam as faixas de sinais TOCSY para um aminoácido. As linhas vermelhas grossas indicam o próton correlacionado no espectro ao sinal ROE.*

A Figura 40 apresenta todas as faixas de padrão TOCSY dos aminoácidos atribuídos para uma mesma conformação. A Figura 41 mostra as faixas de padrão TOCSY encontradas para os resíduos de prolina desta conformação. Como os resíduos de aminoácidos de prolina não possuem um próton amídico, seu padrão TOCSY pode ser visto através do hidrogênio do carbono α, que possui um valor de deslocamento químico maior que os demais hidrogênios presentes na estrutura anelar, pois está próximo tanto do nitrogênio amídico da ligação peptídica de um lado da cadeia quanto da carbonila presente na ligação peptídica do outro lado da cadeia. O carbono α de um resíduo de prolina possui, em média, um valor de deslocamento químico de 4.386 ppm[47].

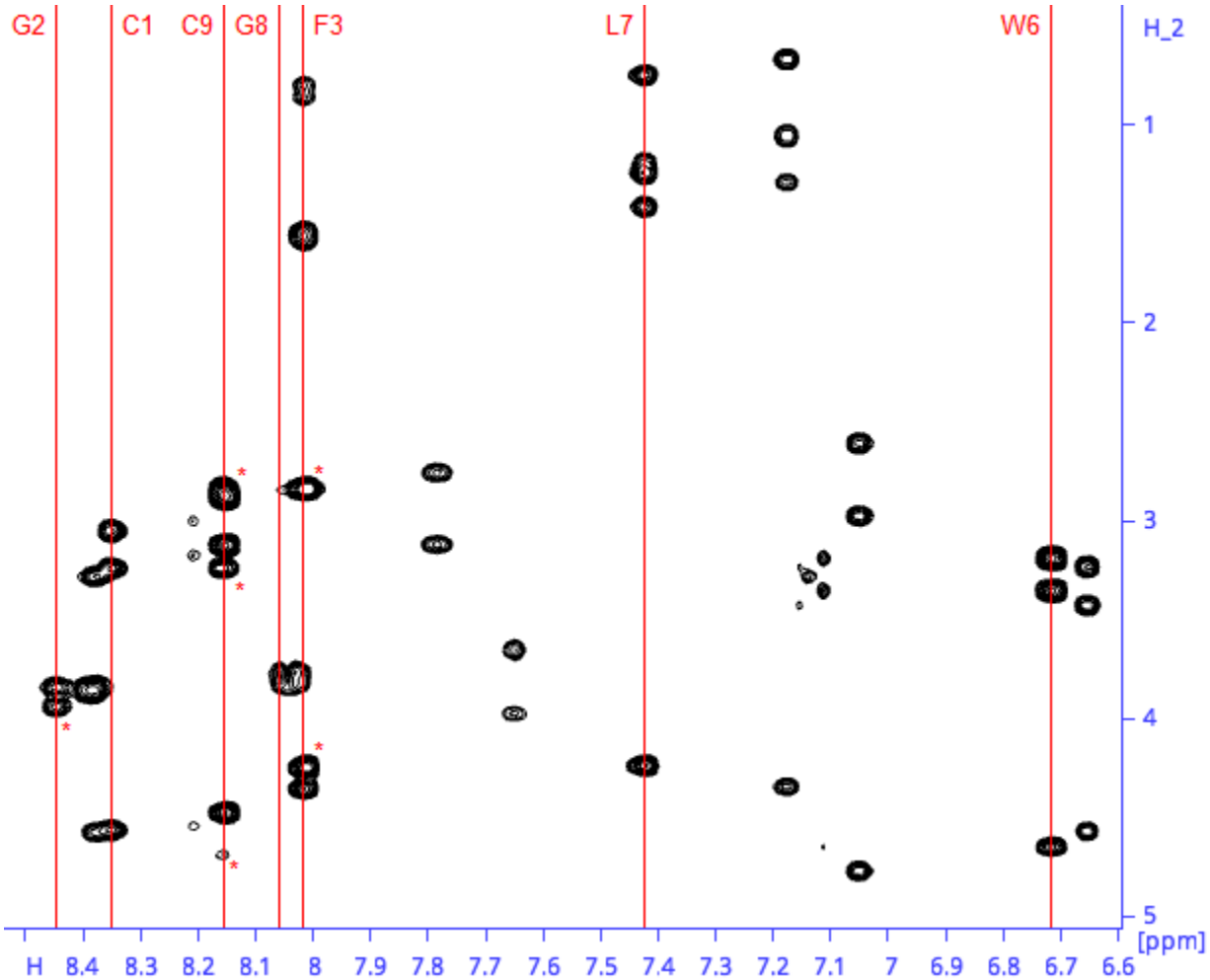



*Figura 40: Espectro de TOCSY adquirido para o cPaT-2 com a área entre 6,6 e 8,5 ppm ampliada (região de prótons amídicos). As linhas vermelhas indicam faixas que contém sinais referentes aos resíduos de aminoácido de uma das conformações assumidas pelo peptídeo. As linhas estão identificadas de acordo com o aminoácido que fazem parte, os asteriscos indicam os sinais referentes ao peptídeo no caso de sinais de outros aminoácidos presentes em uma mesma faixa.*

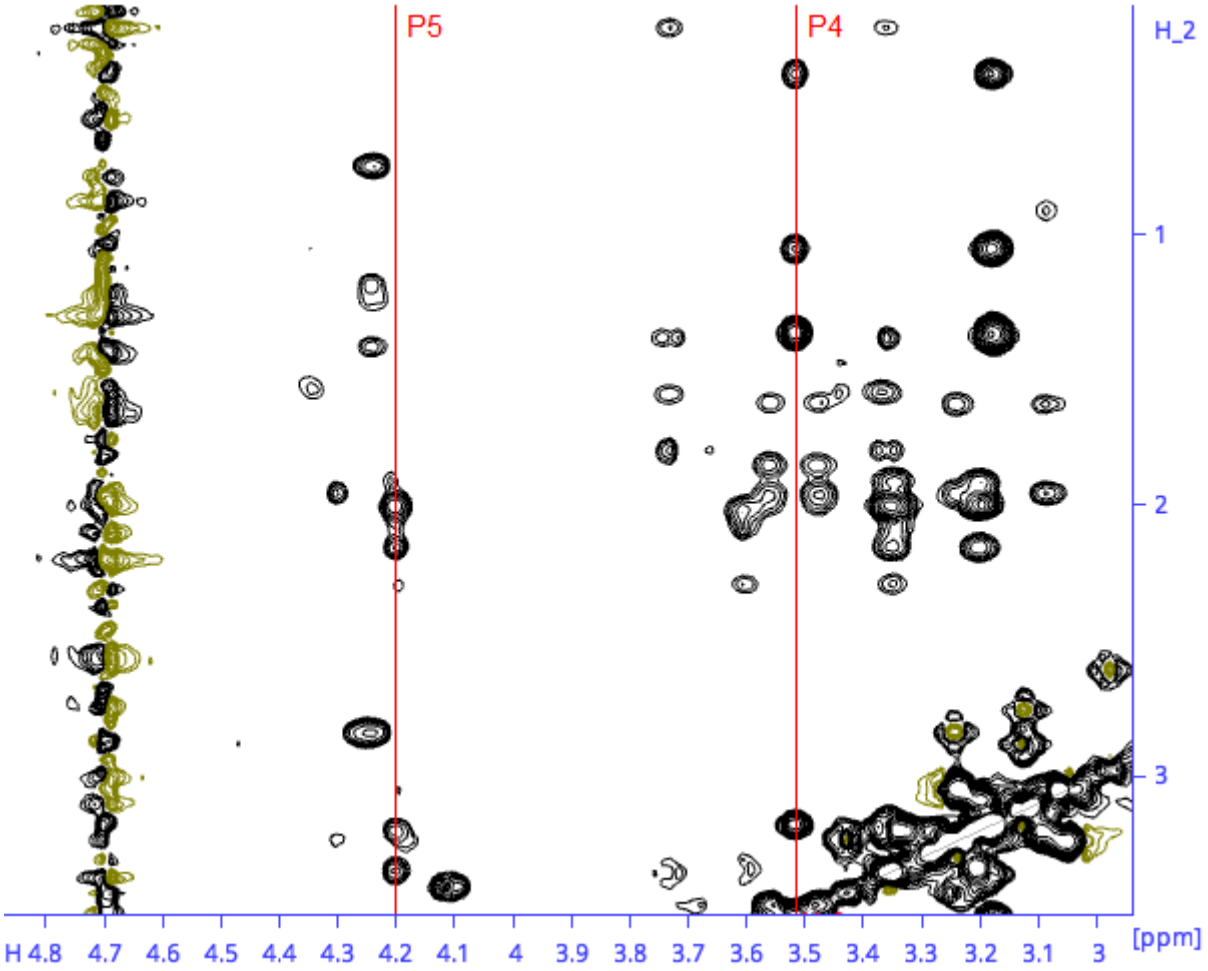



*Figura 41: Espectro de TOCSY adquirido para o cPaT-2 com a área entre 3 e 4,8 ppm ampliada (região de prótons ligado a carbonos α, β e demais alifáticos). As duas linhas vermelhas indicam faixas que contém sinais referentes aos resíduos de prolina para uma das conformações assumidas pelo peptídeo. As linhas estão identificadas de acordo com o aminoácido que fazem parte.*

É importante mencionar a diminuição dos valores de deslocamento químico para os hidrogênios da prolina na posição 4 em relação ao valor médio encontrado para estes átomos. Tais valores médios tem por base a média dos dados obtidos em várias análises, em que diversos valores de ppm abaixo e acima da média para estes prótons foram encontrados e utilizados para a formação do banco de dados[47]. Uma possível explicação para essa diferença entre o valor experimental e o valor médio de deslocamento químico está na possibilidade deste resíduo de prolina sofrer um efeito de anisotropia dos dois anéis aromáticos presentes no peptídeo, localizados nos resíduos de fenilalanina e triptofano.

Para os cálculos computacionais da estrutura tridimensional do peptídeo, os sinais ROE encontrados, mostrados na Tabela 9, foram integrados e convertidos em valores aproximados de distância entre os átomos pelo software CCPNMR. Tais

valores formam um conjunto de restrições espaciais a serem utilizadas pelo método computacional. Além deste conjunto de restrições, um segundo foi feito utilizando valores de deslocamentos químicos encontrados para os carbonos do peptídeo, estes atribuídos por meio de um experimento HSQC com DEPT. Por meio destes valores, o software CCPNMR calculou restrições para os ângulos de diedro encontrados na cadeia principal do peptídeo. A Tabela 10 apresenta os valores de deslocamentos químicos encontrados para os átomos de carbono de acordo com o aminoácido o qual pertence. A Tabela 11 mostra os ângulos de diedro encontrados e utilizados como restrições para o cálculo computacional da estrutura tridimensional do peptídeo.

Tabela 10: Valores de deslocamento químico atribuídos para cada átomo de carbono ligado a hidrogênio presente no cPaT-2 de acordo com o seu resíduo de aminoácido

| **Resíduo de aminoácido** | **Carbonos e deslocamentos químicos** |
|---|---|
| 1-Cys | CA - 55,658 / CB - ? |
| 2-Gly | CA - 45,387 |
| 3-Phe | CA - 55,481 / CB - 41,369 / CD - ? / CE - ? / CZ - ? |
| 4-Pro | CA - 61,298 / CB - 32,408 / CG - 32,428 / CD - 49,510 |
| 5-Pro | CA - 64,360 / CB - 31,664 / CG - 27,504 / CD - 50,216 |
| 6-Trp | CA - 57,624 / CB - 28,308 / CD1 - 127,140 / CE1 - ? / CE3 - 120,560 / CZ2 - ? / CZ3 - ? / CH2 - ? |
| 7-Leu | CA - ? / CB - 41,862 / CG - 26,760 / CD - 24,699 |
| 8-Gly | CA - 45,325 |
| 9-Cys | CA - ? / CB - ? |

*Carbonos com ? não foram atribuídos.

Tabela 11: Ângulos de diedro considerados para o cálculo da estrutura do cPaT-2 obtidos através do espectro de HSQC

| **Ângulos de diedro** |
|---|
| 2GlyC-3PheN-3PheCa-3PheC |
| 3PheN-3PheCa-3PheC-4ProN |
| 3PheC-4ProN-4ProCa-4ProC |
| 4ProN-4ProCa-4ProC-5ProN |
| 4ProC-5ProN-5ProCa-5ProC |
| 5ProN-5ProCa-5ProC-6TrpN |

Tabela 11: (Continuação)

| Ângulos de diedro |
|---|
| 5ProC-6TrpN-6TrpCa-6TrpC |
| 6TrpN-6TrpCa-6TrpC-7LeuN |
| 7LeuN-8GlyN-8GlyCa-8GlyC |
| 8GlyN-8Gly-Ca-8GlyC-9CysN |

Os cálculos para a estrutura tridimensional do peptídeo foram realizados repetidas vezes, com leves alterações de acordo com o último resultado obtido, até que as estruturas calculadas não apresentassem quaisquer violações em relação à distância dos átomos de acordo com os sinais ROE encontrados. Os cálculos foram realizados pelo software ARIA e, para cada novo cálculo submetido, o software gerou 10 estruturas. Para a validação do cálculo da estrutura, foi avaliado os valores de RMSD para cada aminoácido, além da utilização do gráfico de Ramachandran.

A estrutura tridimensional encontrada para o cPaT-2 é apresentada nas Figuras 42 e 43. A Figura 42 apresenta as 10 estruturas calculadas em sobreposição, enquanto a Figura 43 mostra a seleção de uma dessas estruturas para uma melhor visualização.

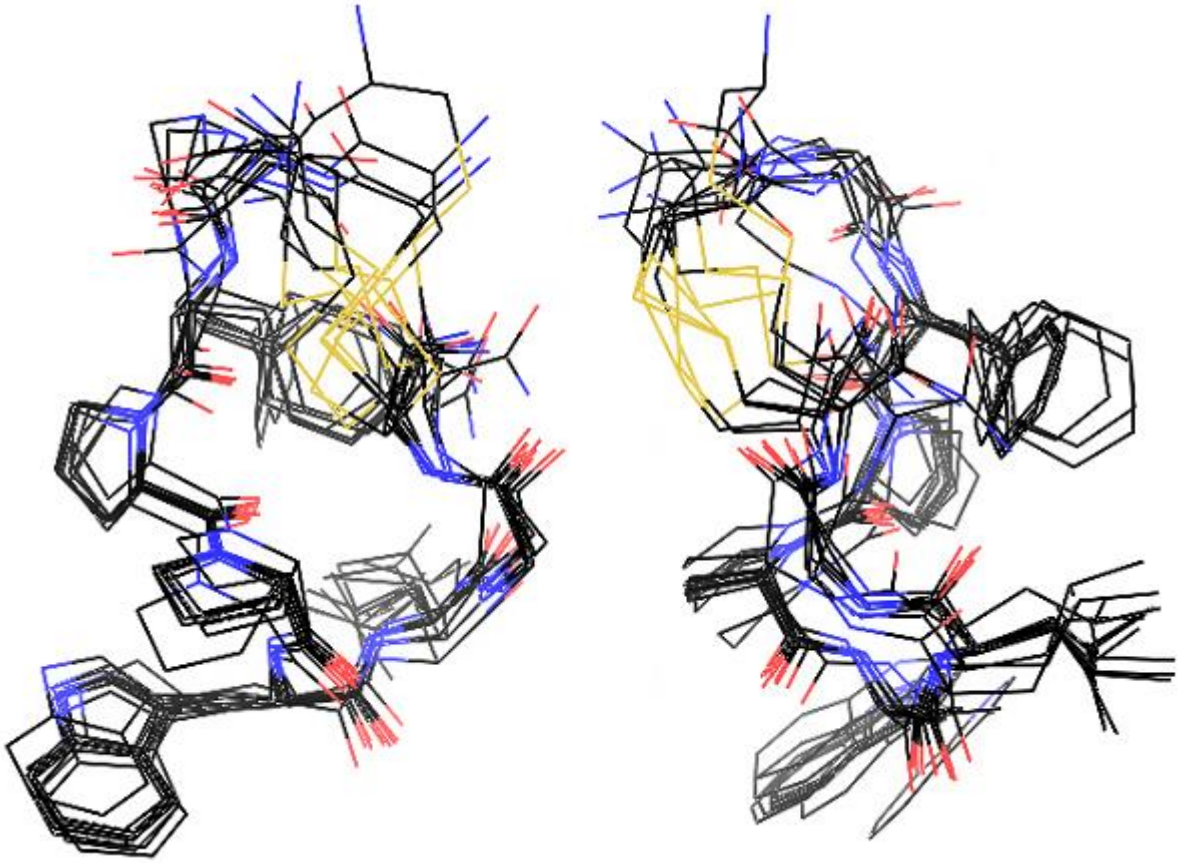


*Figura 42: Estruturas sobrepostas calculadas para o cPaT-2. Os hidrogênios foram omitidos para melhor visualização. Legenda das cores para cada átomo: preto = carbono, vermelho = oxigênio, azul = nitrogênio e amarelo = enxofre.*

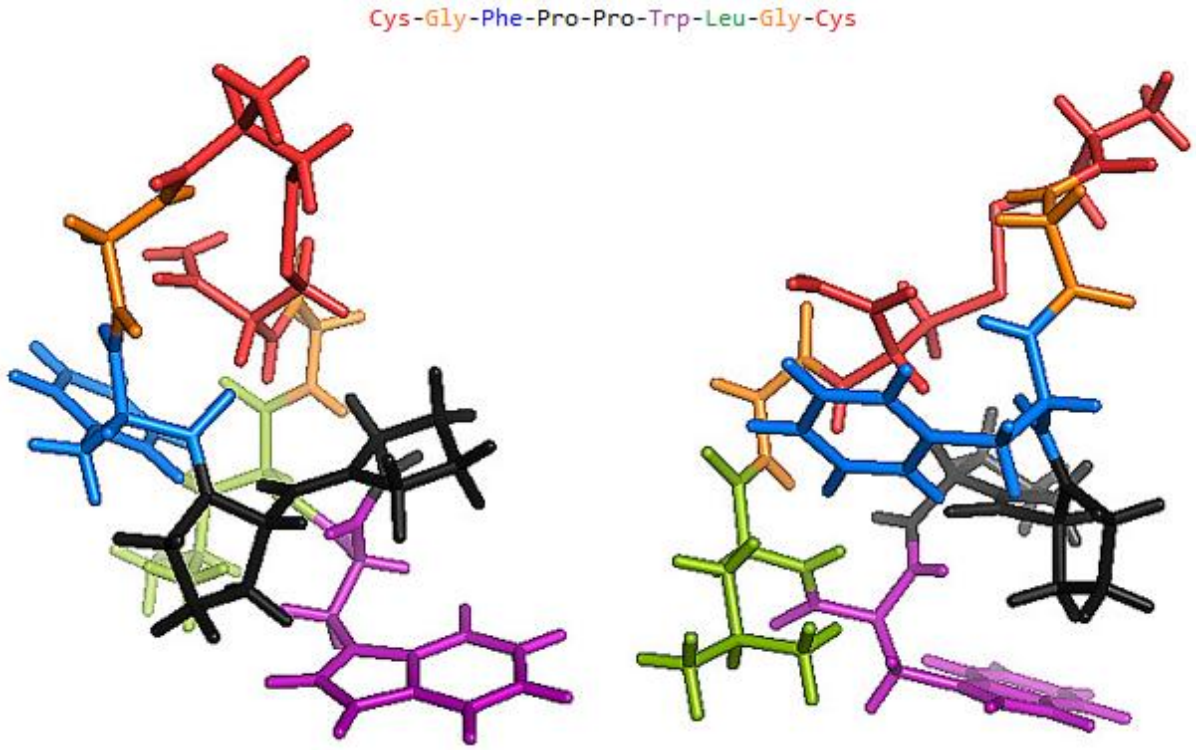



*Figura 43: Uma das estruturas calculadas para o cPaT-2. As cores correspondem aos aminoácidos de acordo com a sequência na parte superior da figura.*

A Figura 44 evidencia os valores de RMSD (Root Mean Square Deviation, em português: raiz quadrada do desvio quadrático médio) para a cadeia principal do peptídeo e para todos os átomos da estrutura. O RMSD é uma medida da média da distância entre os átomos de todas as estruturas calculadas. Valores mais baixos de RMSD indicam regiões do peptídeo mais estruturadas (abaixo de 2 Å), enquanto valores mais altos de RMSD indicam regiões menos estruturadas[44].

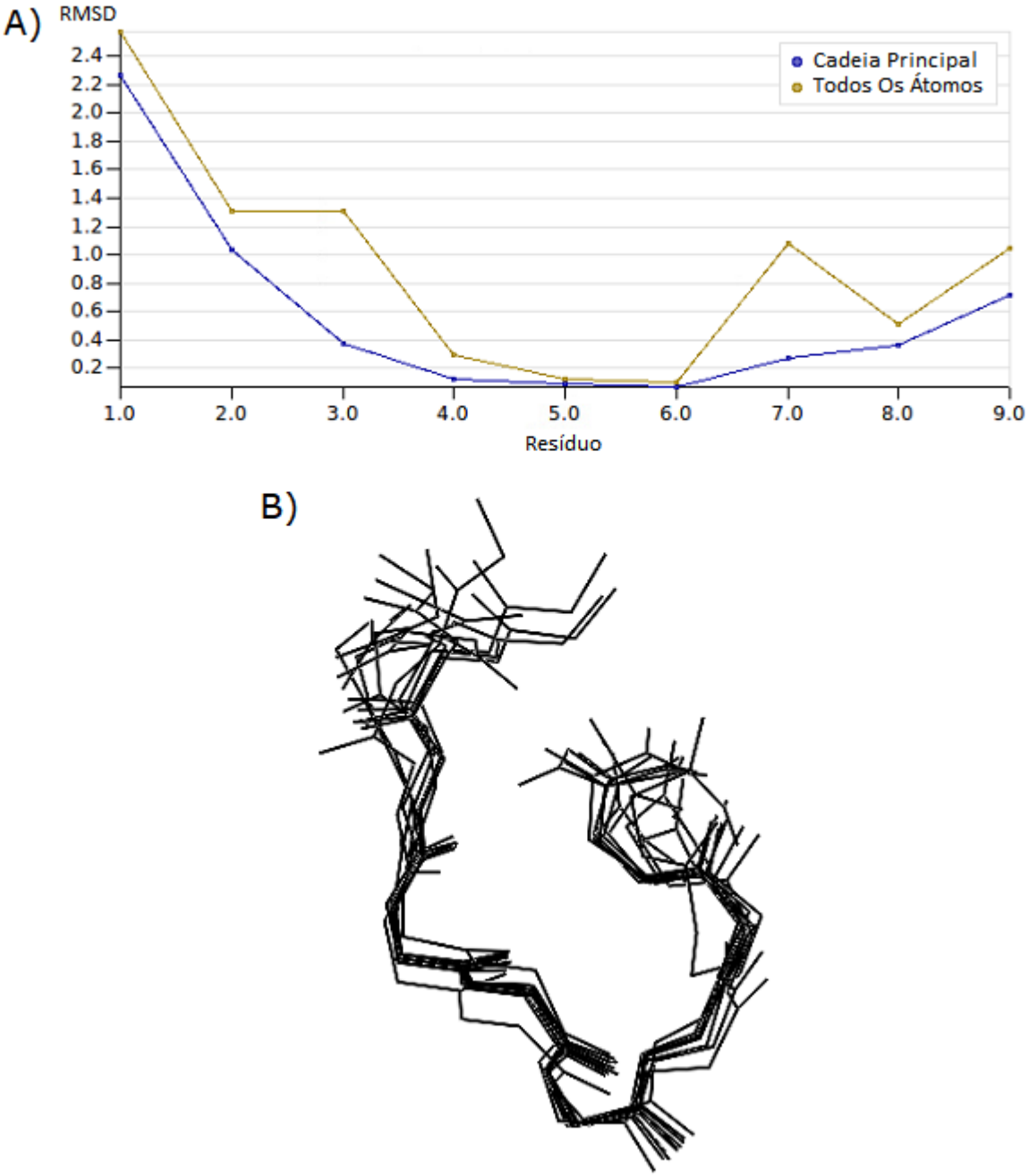



*Figura 44: A) Gráfico com os valores de RMSD (em Angstrons) para as estruturas calculadas do peptídeo cPaT-2. B) Estruturas calculadas para o cPaT-2 em sobreposição expondo apenas a cadeia principal.*

Observa-se que o núcleo FPPWL (o núcleo original) na estrutura do cPaT-2 possui RMSDs abaixo de 1,4 Å, valores considerados aceitáveis para uma região bem estruturada. Acima de 2 Å encontra-se apenas a cisteína N-terminal, valor esperado considerando os poucos sinais ROE vistos na região do peptídeo que compreende os resíduos 8Gly-9Cys-1Cys-2Gly. Considerando que os resíduos de cisteína e glicina colocados nos lados N-terminal e C-terminal tem por motivo a ciclização do peptídeo, sendo de fato uma região mais lábil, pode-se inferir que os valores de RMSD estão satisfatórios para o cPaT-2.

Contribuindo para a validação da estrutura, a Figura 45 mostra o gráfico de Ramachandran para a estrutura do cPaT-2 calculada.

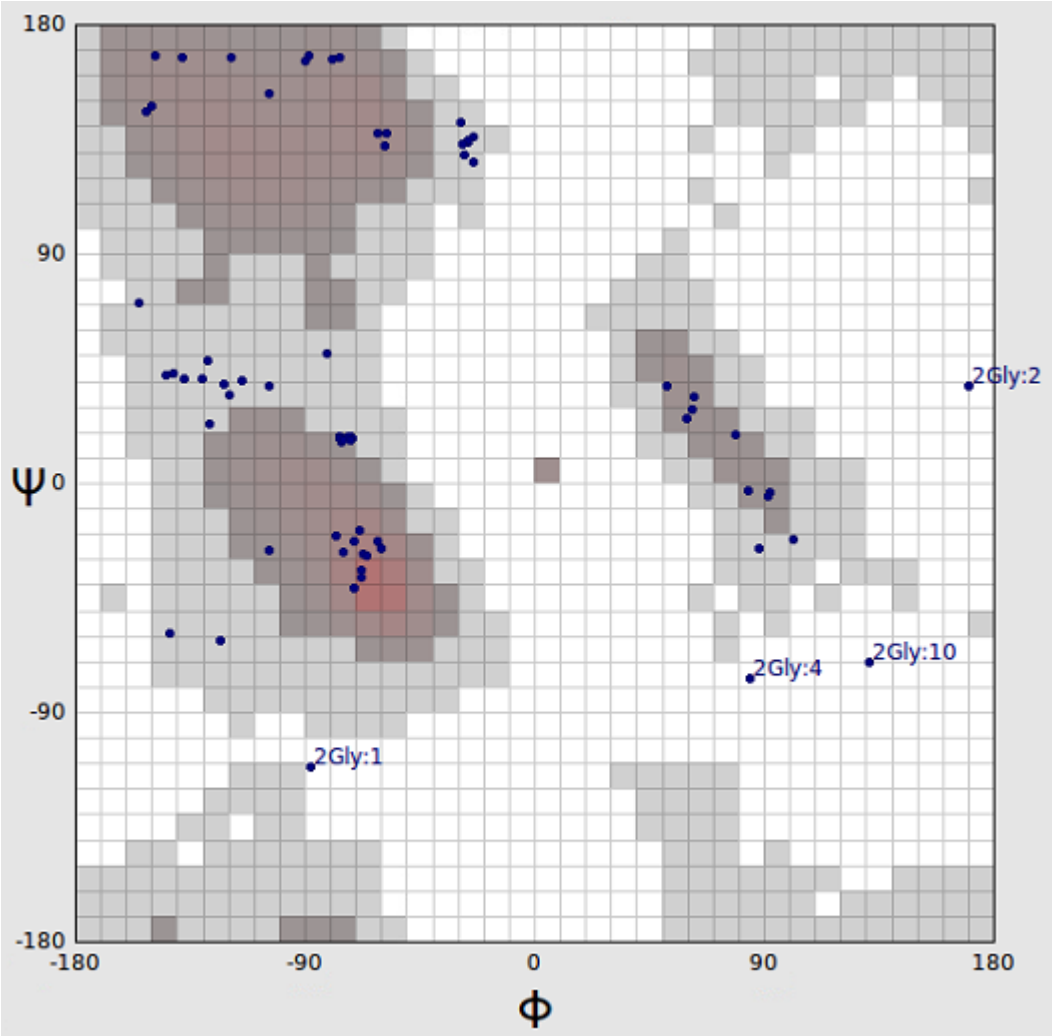



*Figura 45: Gráfico de Ramanchadran para as 10 estruturas do cPaT-2 calculadas. Os pontos fora de áreas favoráveis foram nomeados conforme a legenda "número do resíduo de acordo com a sequência, sigla de 3 letras do resíduo e número da estrutura calculada". Exemplo: 2Gly:4 corresponde ao resíduo de glicina na segunda posição de acordo com o N-terminal encontrada na quarta estrutura calculada.*

Cada ponto do gráfico de Ramachandran representa a posição de um resíduo de aminoácido de uma das dez estruturas. Ao todo, 61,4% dos pontos encontram-se em regiões muito favoráveis do gráfico, enquanto 32,9% estão em regiões favoráveis e apenas 5,7% são vistas em regiões pouco favoráveis. Destaca-se que os pontos vistos nesta região foram todos provindos do resíduo de glicina na posição 2 em relação ao N-terminal. O gráfico de Ramachandran para o resíduo de glicina possui mais áreas favoráveis em relação aos outros aminoácidos, considerando que sua cadeia lateral é apenas um átomo de hidrogênio, permitindo uma maior liberdade conformacional. Dessa forma, apesar destes pontos encontrarem-se em regiões desfavoráveis do gráfico de Ramachandran padrão, se for considerado um gráfico específico para a glicina, tais pontos se encontrariam também em regiões favoráveis ou muito próximas a essas.

Considerando a estrutura calculada para o cPaT-2, não foram observadas interações do tipo “aromático-aromático”, conforme fora anteriormente pressuposto. Contudo, é importante mencionar que foi calculada apenas uma estrutura dentre as três observadas nos espectros de RMN. Apesar disso, um outro tipo de interação foi visto. Para todas as estruturas calculadas, foram observadas interações do tipo CH···π entre um dos hidrogênios γ da prolina (posição 5 em relação ao N-terminal) e o anel de seis membros do triptofano e outra interação CH···π entre um dos hidrogênios δ da mesma prolina com o anel nitrogenado do triptofano. A Figura 46 evidencia tais interações junto das distâncias entre o hidrogênio participante da interação e os carbonos do anel indólico.

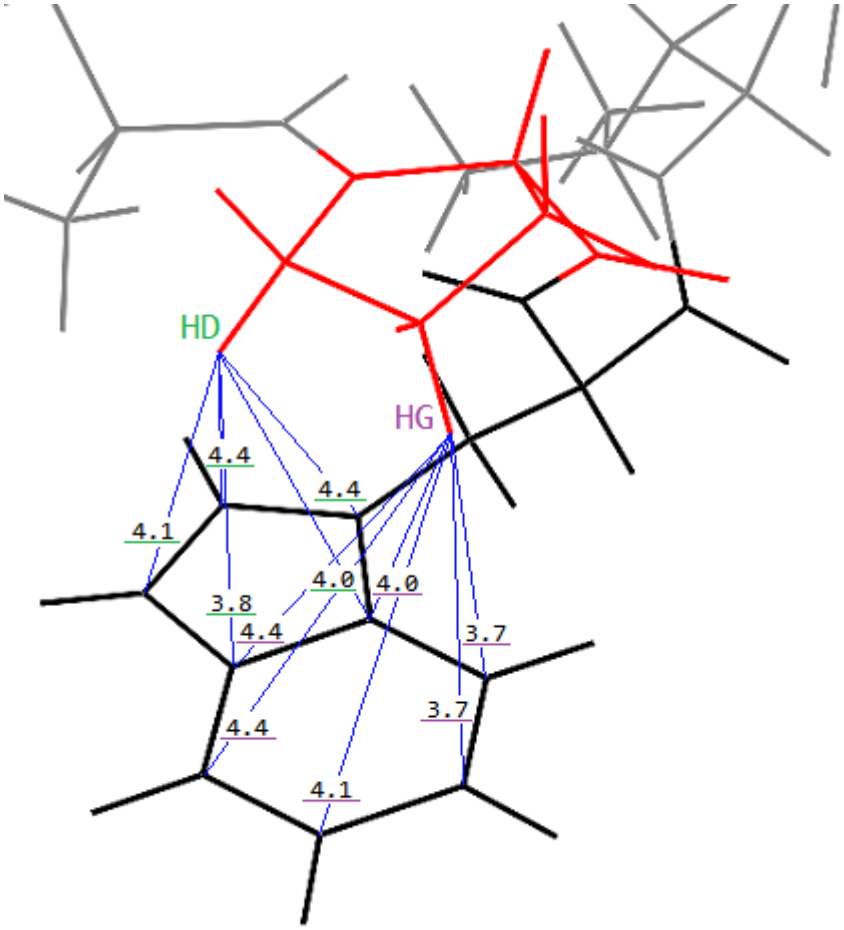



*Figura 46: Interações CH···π entre os hidrogênios γ e δ da 5Pro (em vermelho) com o anel indólico do 6Trp (em preto). As linhas azuis correspondem a distância entre os hidrogênios da prolina e os carbonos do triptofano. As distâncias são dadas em Angstrons.*

Interações CH···π são interações que envolvem um hidrogênio e uma ou mais ligações π, sendo encontradas em uma variedade de proteínas, como na γB-cristalina-da-lente-do-olho (γB-eye-lens-crystallin, em inglês), onde foram encontradas 15 interações CH···π. Alguns exemplos envolvem interações de hidrogênios presentes nas cadeiras de laterais de diversos aminoácidos com as ligações π de aminoácidos aromáticos (His, Phe, Trp, Tyr) ou com a ligação π de aminoácidos como glutamato, arginina, dentre outros que possuem pelo menos uma ligação dupla. Acredita-se que essas interações contribuem para a estabilização de certas estruturas dentro de uma proteína, como hélices ou aminoácidos arranjados na conformação *cis* ao invés da *trans*[66].

No estudo de Brandl et al. (2001), foram analisadas 1154 estruturas de proteínas em busca de interações CH···π. Dentre as encontradas, a maior frequência dos hidrogênios participantes foi em resíduos de prolina para a categoria de hidrogênios de carbono alfa, além dos hidrogênios dos carbonos β e γ sendo segundo

e o terceiro lugar dentre a categoria dos hidrogênios alifáticos. Dentre os sistemas π aromáticos encontrados, o de maior incidência foi o triptofano[65]. Essas informações ressaltam que os resíduos de prolina e triptofano são comumente encontrados participando de interações CH···π, corroborando com o que foi visto no cPaT-2.

Umezawa et al. (1999) analisaram interações CH···π em 130 peptídeos e fizeram uma relação entre o número de interações e a distância entre o átomo de hidrogênio participante da interação e o átomo de carbono do anel mais próximo em relação ao hidrogênio. Para interações intramoleculares, foram encontrados valores entre 2,45 a 3,20 Å, em que o maior número de interações ficou entre 2,8 a 2,9 Å[67]. A distância entre o hidrogênio γ da prolina e o carbono mais próximo do anel de seis membros do triptofano no cPaT-2 foi de 3,7 Å, enquanto o mesmo para o hidrogênio δ da prolina e o anel nitrogenado do triptofano foi de 3,8 Å. Ambos os valores se encontram acima dos esperados se comparado ao referido estudo, embora não tão distantes do valor de 3,2 Å, gerando a hipótese que as duas interações CH···π entre os resíduos de prolina e triptofano sejam fracas.

Outra interação CH···π observada é entre a fenilalanina e prolina (posição 4 em relação ao N-terminal) em algumas das estruturas calculadas. Conforme mostra a Figura 47, três das dez estruturas calculadas apresentam a fenilalanina posicionada de uma forma diferente, forma esta que permite a interação CH···π mencionada. Esta interação é evidenciada na Figura 48 junto das distâncias entre o hidrogênio participante da interação e os carbonos do anel aromático.



*Figura 47: Estruturas calculadas para o cPaT-2 evidenciando os resíduos de fenilalanina. Em preto e vermelho encontram-se grupos de estruturas com diferentes orientações para este aminoácido. O grupo preto possui 7 estruturas, enquanto o grupo vermelho possui 3. Os hidrogênios foram omitidos para uma melhor visualização.*

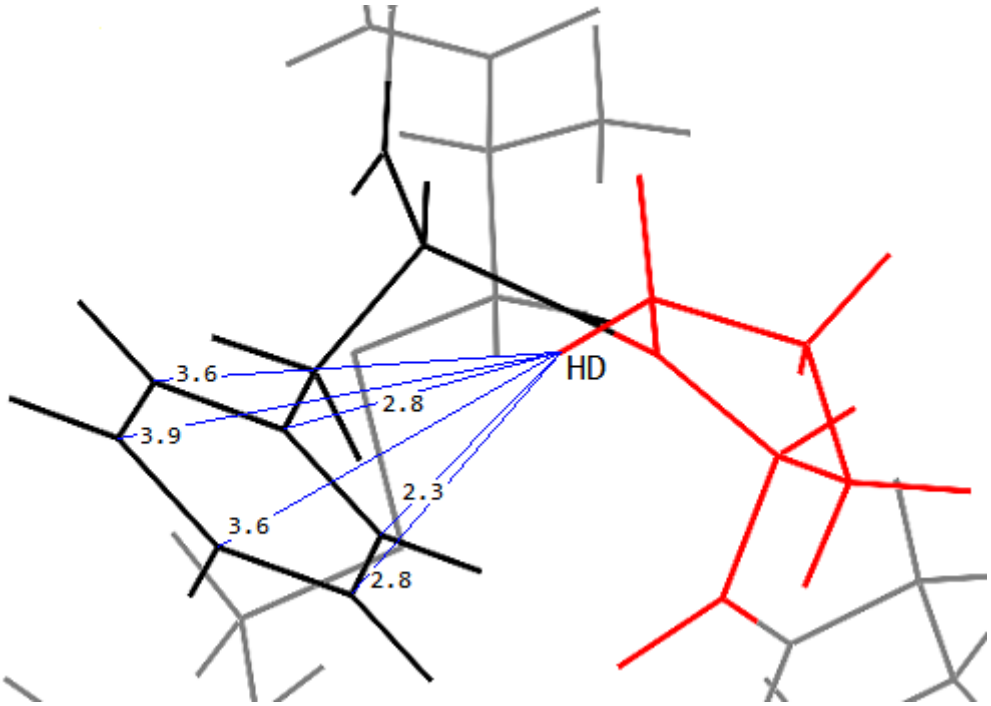



*Figura 48: Interações CH···π entre o hidrogênio δ da 4Pro (em vermelho) com o anel aromático da 3Phe (em preto). As linhas azuis correspondem a distância entre os hidrogênios da prolina e os carbonos do fenilalanina. As distâncias são dadas em Angstrons.*

Comparando a distância entre o hidrogênio δ da prolina e o carbono do anel aromático mais próximo com o estudo de Umezawa et al. (1999), observa-se que a

distância encontrada de 2,3 Å encontra-se abaixo da faixa em que foram observados o maior número de interações analisadas. Diferentemente das interações encontradas entre o triptofano e sua prolina vizinha, a interação entre a fenilalanina e sua prolina subsequente encontram-se dentro da faixa de distâncias averiguadas para interações do tipo CH···π.

Em resumo, os espectros de RMN adquiridos para o cPaT-2 revelaram a existência de três conformações em solução, atribuídas tentativamente aos resíduos de prolina, que podem assumir tanto a configuração *trans* quanto a *cis*. A estrutura correspondente a uma dessas conformações foi calculada e validada com base nos valores de RMSD e no gráfico de Ramachandran. Nessa estrutura, ambos resíduos de prolina encontram-se na configuração *trans*, tal como foi com o peptídeo estudado por Francart et al. (1996)[65]. A hipótese inicial de uma possível interação aromático-aromático entre os resíduos de fenilalanina e triptofano foi descartada, uma vez que estes encontram-se muito distantes na estrutura. Contudo, uma outra forma de interação foi identificada envolvendo os hidrogênios dos resíduos de prolina e os anéis aromáticos presentes na fenilalanina e no triptofano, caracterizando uma interação do tipo CH···π.

### 5.5. Ensaio de inibição de hemólise induzida por AAPH para o PaT-2 e o cPaT-2

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante diferencial do cPaT-2 em relação ao PaT-2, os peptídeos foram submetidos ao ensaio de inibição de hemólise com AAPH. Neste ensaio, o AAPH se decompõe formando dois equivalentes de radical alquila que, na presença de oxigênio, são convertidos a radicais peróxidos e alcóxidos. Estes radicais, por sua vez, reagem com os lipídios presentes na membrana celular dos eritrócitos, promovendo a peroxidação lipídica que culmina na lise da hemácia e na liberação de hemoglobina, posteriormente medida na solução. A adição de uma molécula antioxidante ao ensaio interrompe esse processo ao capturar os radicais formados, inibindo a peroxidação lipídica e, consequentemente, prevenindo a lise das hemácias[55].

Diferentes concentrações do PaT-2 e do cPaT-2 foram adicionadas a uma suspensão de eritrócitos e AAPH, conforme a metodologia descrita. Os resultados obtidos para o ensaio são representados na Figura 49.

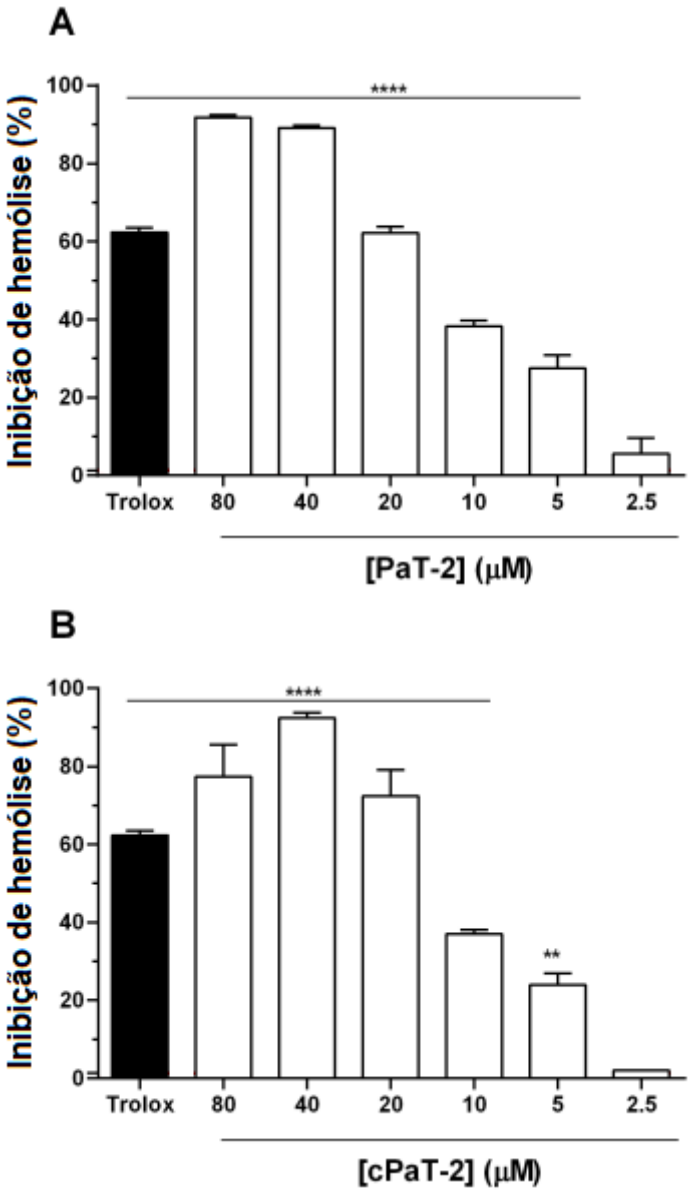



*Figura 49: Resultados do ensaio de inibição de hemólise para A) PaT-2, valor de $IC_{50}$ 13,6 ± 1,9 μM e B) cPaT-2, valor de $IC_{50}$ 10,0 ± 1,5 μM. Os asteriscos indicam os erros estáticos versus o controle (Trolox): **p<0,01, ****p<0,0001.*

Observa-se que o PaT-2 e o cPaT-2 mostram valores significativos de inibição de hemólise em comparação ao controle, indicando que ambos os peptídeos apresentam atividade quelante em relação ao AAPH. Também é notável o efeito de dose-resposta com o aumento da concentração de peptídeo, ou seja, quanto maior a concentração de peptídeo empregada, maior também é a resposta de inibição de hemólise. Para o peptídeo PaT-2, essa relação segue até o valor de 80 μM, enquanto para o cPaT-2, tal relação alcança o seu platô de inibição em 40 μM, tendo sua efetividade decaindo aos 80 μM.

Outro ponto importante observado é que não existe uma diferença significativa entre a atividade demonstrada pelo PaT-2 e pelo cPaT-2. Os valores de $IC_{50}$ (concentração de peptídeo necessária para inibir 50% da hemólise induzida por AAPH) foram calculados, sendo 13,6 ± 1,9 μM para o PaT-2 e 10,0 ± 1,5 μM o cPaT-2. A diferente de aproximadamente 3 μM, contando o erro apresentado nos cálculos de $IC_{50}$, não é significativa para afirmar que o cPaT-2 possui uma inibição mais forte que o PaT-2. Assim, o aumento da rigidez da estrutura do cPaT-2 em relação a PaT-2 não parece ter contribuído para a atividade antioxidante desta molécula, ao menos para este ensaio.

Embora muitos peptídeos antioxidantes tenham sua atividade avaliada por meio do ensaio de inibição de hemólise com AAPH, não foi identificado um peptídeo amplamente utilizado como referência para comparação com as moléculas aqui avaliadas. Contudo, outras moléculas antioxidantes de naturezas distintas são empregadas para esse propósito. Os valores de $IC_{50}$ calculados para o PaT-2 e o cPaT-2 estão próximos ao identificado para ensaios similares realizados com a curcumina (8,0 ± 0,6 μM), uma molécula amplamente estudada por sua atividade antioxidante e seus efeitos anti-inflamatórios[55]. Com isso, pode-se afirmar que o PaT-2 e o cPaT-2 apresentam uma boa captação destes radicais quando comparados a uma molécula já descrita na literatura.

### 5.6. Síntese e purificação dos análogos cíclicos advindos do cPaT-2

A partir das observações feitas na estrutura tridimensional calculada para o cPaT-2, novos análogos cíclicos foram sintetizados com substituições pontuais de aminoácidos na estrutura primária do peptídeo. O objetivo dessas modificações foi de aprofundar o estudo das relações entre estrutura e função, além de buscar modular a atividade do peptídeo de forma a potencializar seu efeito. As estruturas primárias dos análogos, juntamente com a do cPaT-2 para fins de comparação, estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12: Peptídeos cíclicos sintetizados e suas estruturas primárias

| Nome do peptídeo | Estrutura primária |
|---|---|
| cPaT-2 | CGFPPWLGC-$NH_2$ |
| cPaT-W | CGWPPWLGC-$NH_2$ |
| cPaT-Y | CGYPPWLGC-$NH_2$ |
| cPaT-A | CGFAAWLGC-$NH_2$ |

O primeiro análogo, chamado cPaT-W, possui um triptofano substituindo a fenilalanina. O objetivo foi verificar se a atividade antioxidante do peptídeo aumentaria com o incremento no número de triptofanos, considerando que tal aminoácido é frequente em peptídeos que apresentam esta atividade[7].

O segundo análogo, chamado cPaT-Y, possui uma tirosina substituindo a fenilalanina, tendo por objetivo desfavorecer qualquer possível interação entre os anéis aromáticos do peptídeo. Considerando que a hipótese inicial da interação aromático-aromático ter sido descartada pela estrutura calculada através do RMN, uma nova proposta sugere que a atividade antioxidante depende do triptofano estar numa posição mais externa em relação à estrutura do peptídeo (ou seja, que o triptofano esteja exposto ao solvente). Dessa forma, a tirosina foi escolhida como um aromático rico em elétrons para antagonizar com o triptofano, uma vez que dois aromáticos ricos em elétrons têm maior tendência à repulsão[13]. Essa repulsão tem por propósito estimular que os anéis aromáticos assumam uma posição externa na estrutura tridimensional do peptídeo, ou seja, voltada para o solvente e mais propensos a reagir com este.

O terceiro e último análogo, chamado cPaT-A, tem seus resíduos de prolina substituídos por resíduos de alanina. Com as interações CH···π vistas na estrutura calculada por RMN, também surge a hipótese desta interação, de alguma forma, favorecer a atividade antioxidante do triptofano. A substituição dos resíduos de prolina por alanina visa avaliar se o análogo será mais ou menos capaz de realizar a ação antioxidante, ponderando, portanto, se a interação CH···π tem de fato alguma contribuição para a atividade da molécula.

A síntese dos três análogos foi realizada de forma similar ao cPaT-2 e ocorreu sem quaisquer complicações. Todos os análogos, ao final da síntese e do processo de liofilização, apresentaram-se como sólidos brancos. A Tabela 13 mostra

as massas monoisotópicas calculadas para cada peptídeo, bem como a massa experimental obtida e o erro associado. As Figuras 50 a 53 exibem os espectros de MS e MS/MS para as formas reduzida e oxidada do análogo cPaT-W.

Tabela 13: Massa monoisotópica teórica e experimental dos análogos do cPaT-2

| Peptídeo | $[M+H]^+$ Teórica (Da) | $[M+H]^+$ Experimental (Da) | Erro (ppm) |
|---|---|---|---|
| cPaT-W | 1017,4438 | 1017,4445 | 0,7 |
| cPaT-Y | 994,4278 | 994,4269 | 0,9 |
| cPaT-A | 926,4016 | 926,4026 | 1,1 |

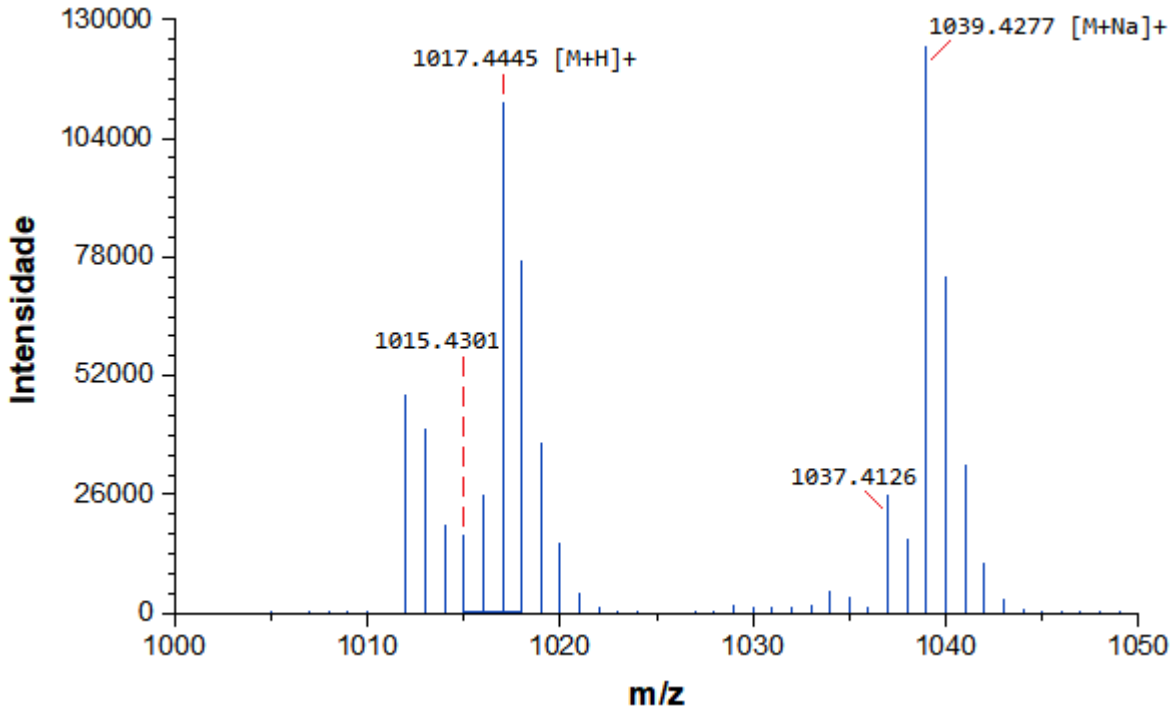



*Figura 50: Espectro de MS do cPaT-W linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 1017,4445 Da e 1039,4277 Da respectivamente.*

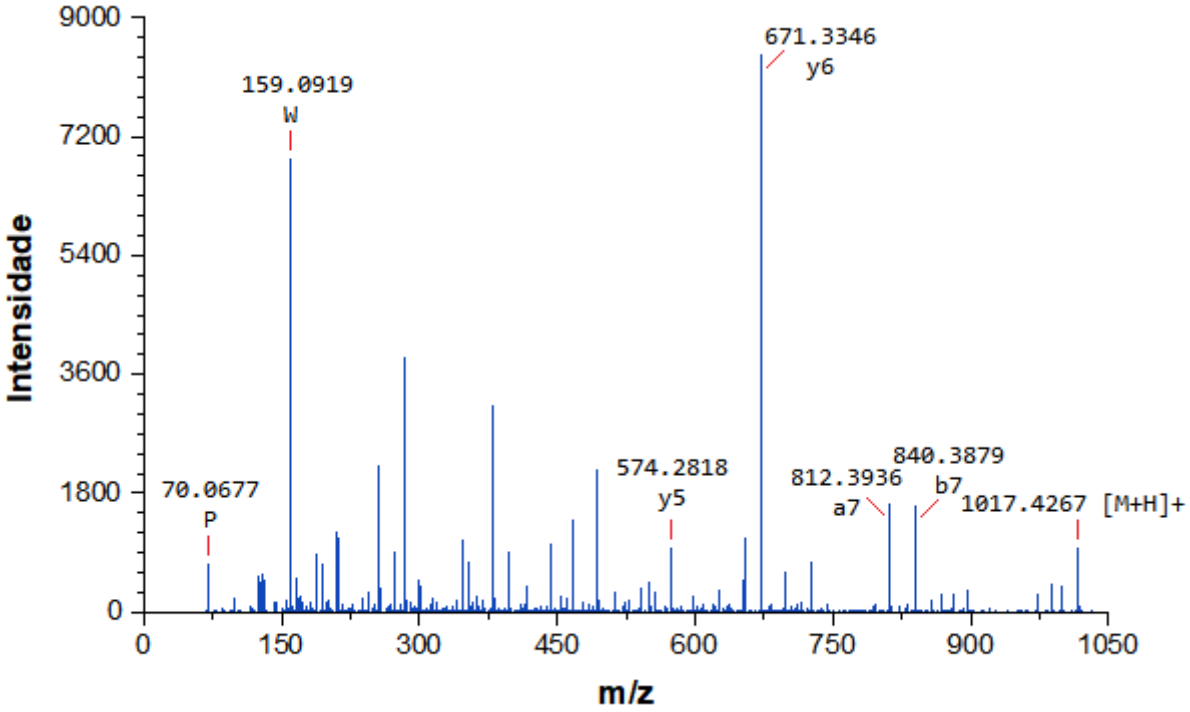



*Figura 51: Espectro de MS/MS do cPaT-W linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 1017,4267 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

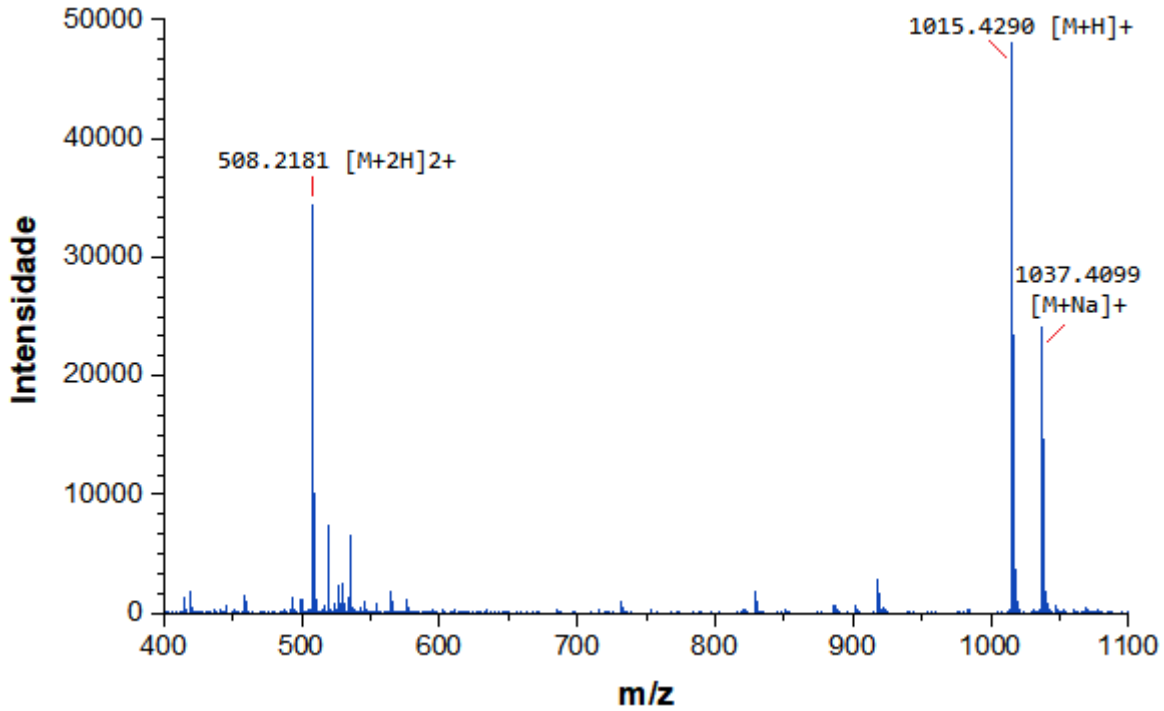



*Figura 52: Espectro de MS do cPaT-W cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 1015,4290 Da, 508,2181 Da e 1037,4099 Da respectivamente.*

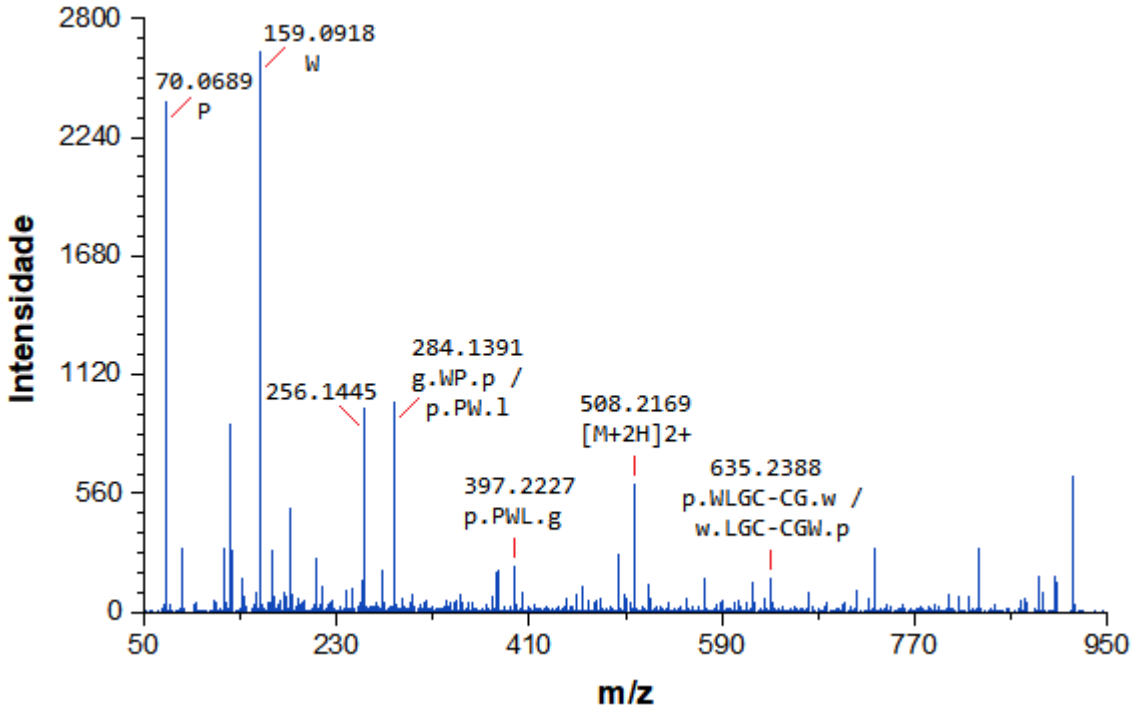



*Figura 53: Espectro de MS/MS do cPaT-W cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+2H]^{2+}$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 508,2169 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados*

O espectro de MS do cPaT-W reduzido mostrou os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e, de forma análoga ao espectro do cPaT-2, também foi possível observar íons com 2 Da a menos em relação aos mencionados, indicando que uma porção de moléculas do peptídeo encontra-se oxidada. Através do espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$, foi possível sequenciar o peptídeo utilizando-se das séries b, y e imônios. O espectro de MS do cPaT-W pós-oxidação apresentou os íons $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ e $[M+Na]^+$. O íon $[M+2H]^{2+}$ foi submetido a fragmentação e através de seu espectro de MS/MS foi possível identificar diversos fragmentos internos. Observa-se que, no caso deste peptídeo, um mesmo valor de MS pode estar relacionado a dois fragmentos internos por conta do novo resíduo de triptofano.

Seguindo para o análogo cPaT-Y, as Figuras 54 a 57 mostram os espectros de MS e MS/MS para as formas reduzida e oxidada do peptídeo.

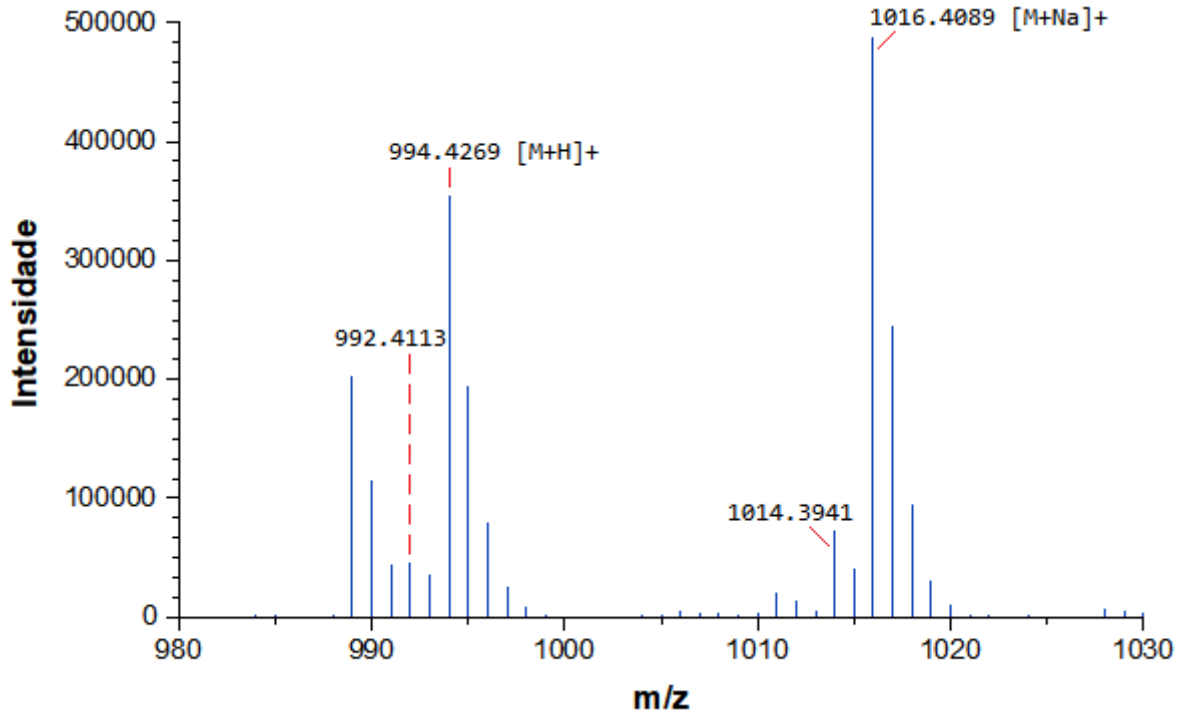



*Figura 54: Espectro de MS do cPaT-Y linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 992,4269 Da e 1016,4089 Da respectivamente.*

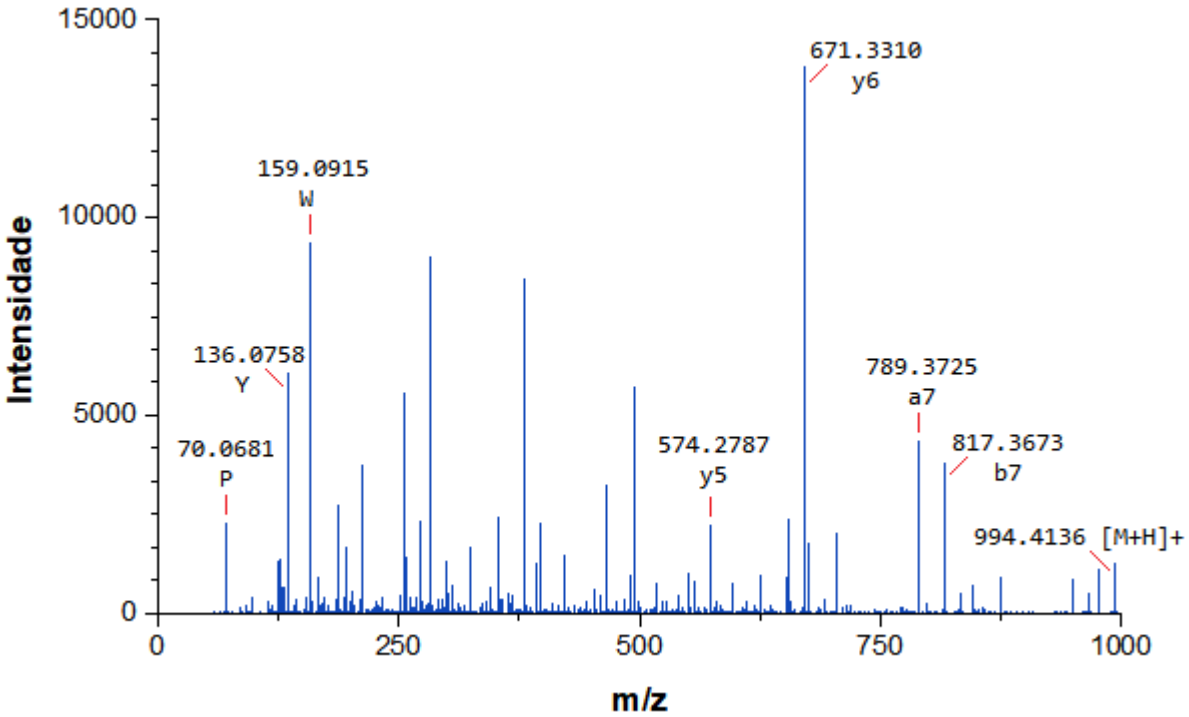



*Figura 55: Espectro de MS/MS do cPaT-Y linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 994,4136 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

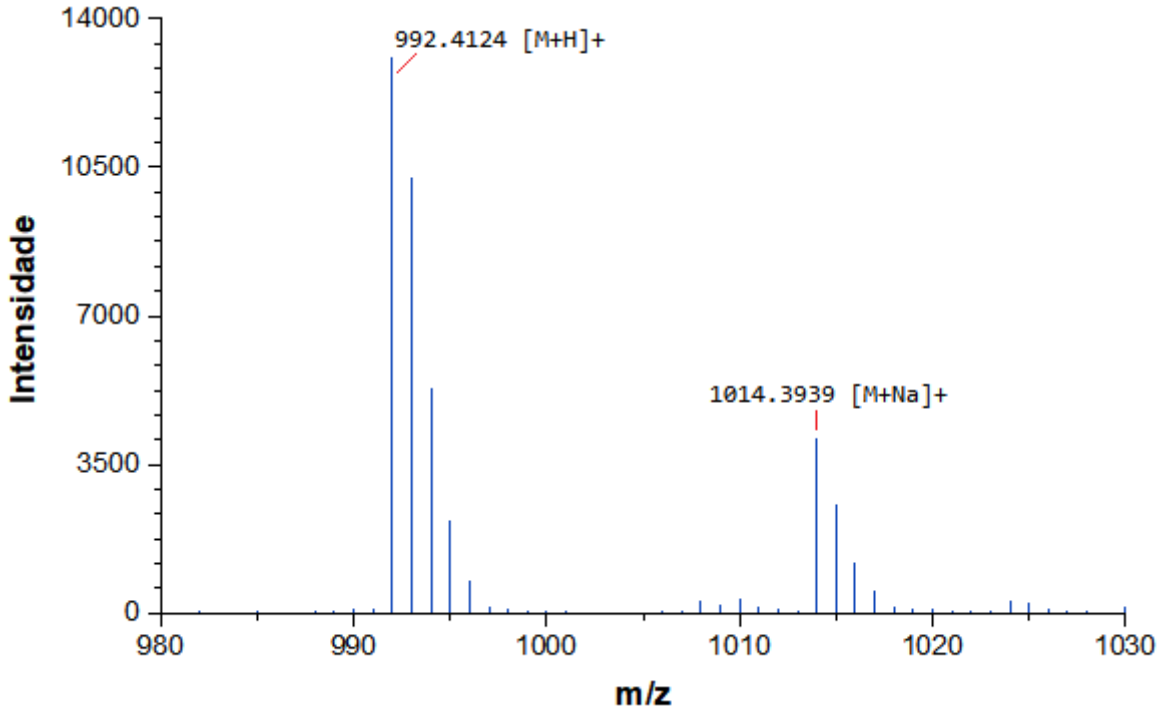



*Figura 56: Espectro de MS do cPaT-Y cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 992,4124 Da e 1014,3939 Da respectivamente.*

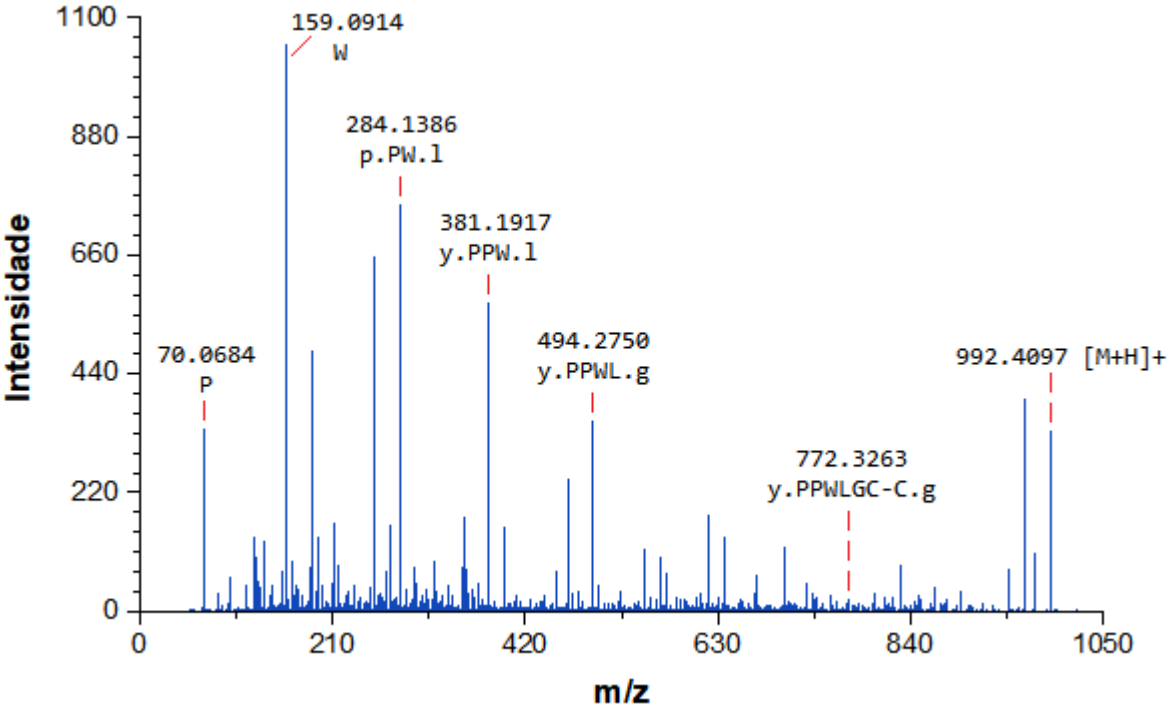



*Figura 57: Espectro de MS/MS do cPaT-Y cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 992,4097 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

Observa-se no espectro de MS do cPaT-Y os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ e também os íons com 2 Da a menos referentes aos anteriores, novamente indicando

que uma parte das moléculas encontra-se na forma oxidada. O íon $[M+H]^+$ foi submetido a fragmentação e em seu espectro de MS/MS foi possível encontrar íons da série b e y, além de imônios, que confirmam a estrutura primária do peptídeo sintetizado. O espectro de MS do cPaT-Y pós-oxidação mostrou os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, em que o íon $[M+H]^+$ foi submetido a fragmentação. O espectro de MS/MS do cPaT-Y pós-oxidação, conforme os demais, apresentou uma série de fragmentos internos associados à sua estrutura.

Os espectros de MS e MS/MS para as formas reduzida e oxidada do terceiro análogo, cPaT-A, estão exibidas nas Figuras 58 a 61.

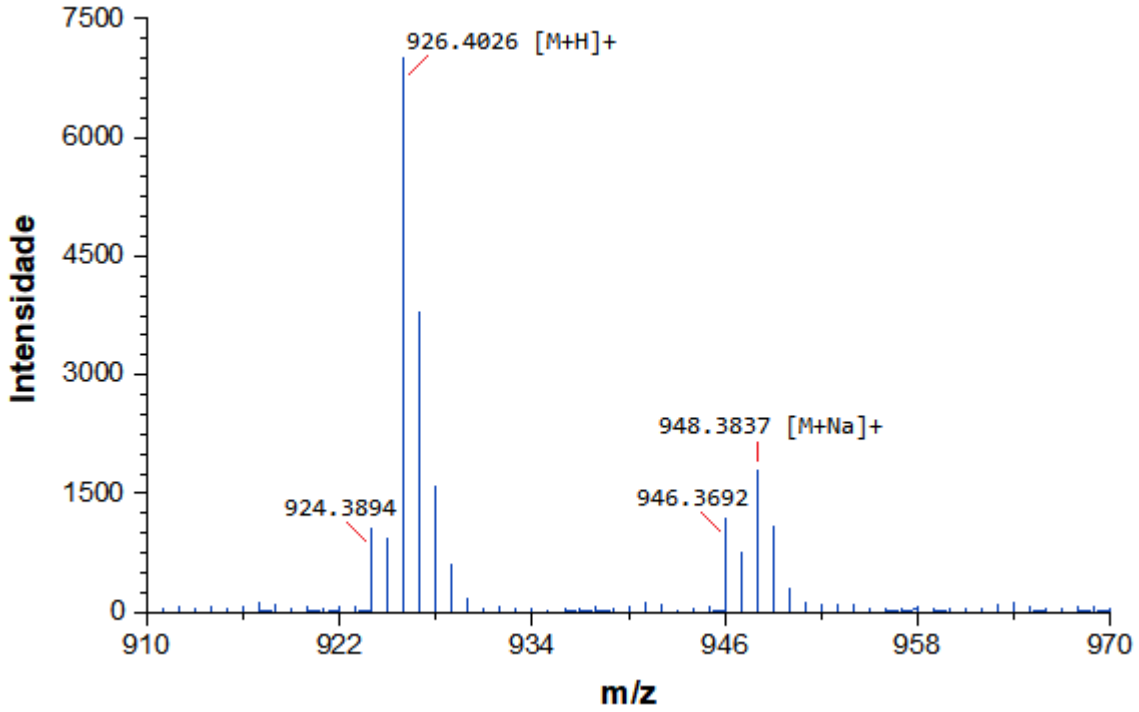



*Figura 58: Espectro de MS do cPaT-A linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 926,4026 Da e 948,3837 Da respectivamente*.

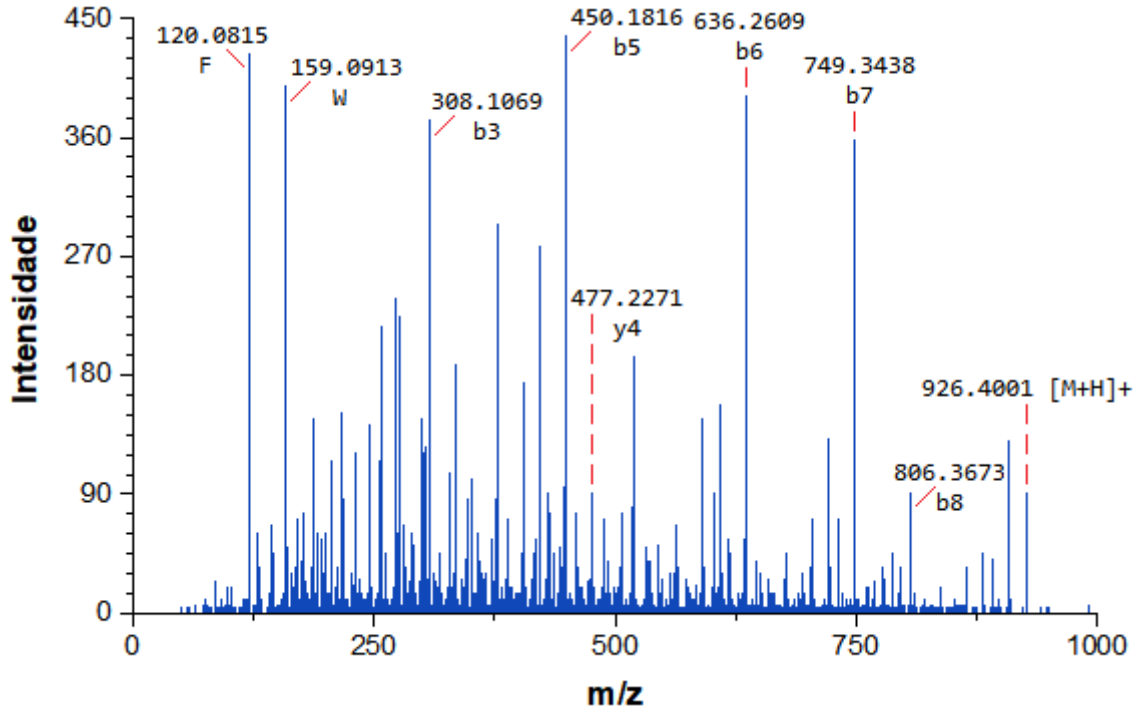



*Figura 59: Espectro de MS/MS do cPaT-A linear obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 926,4001 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciado.*

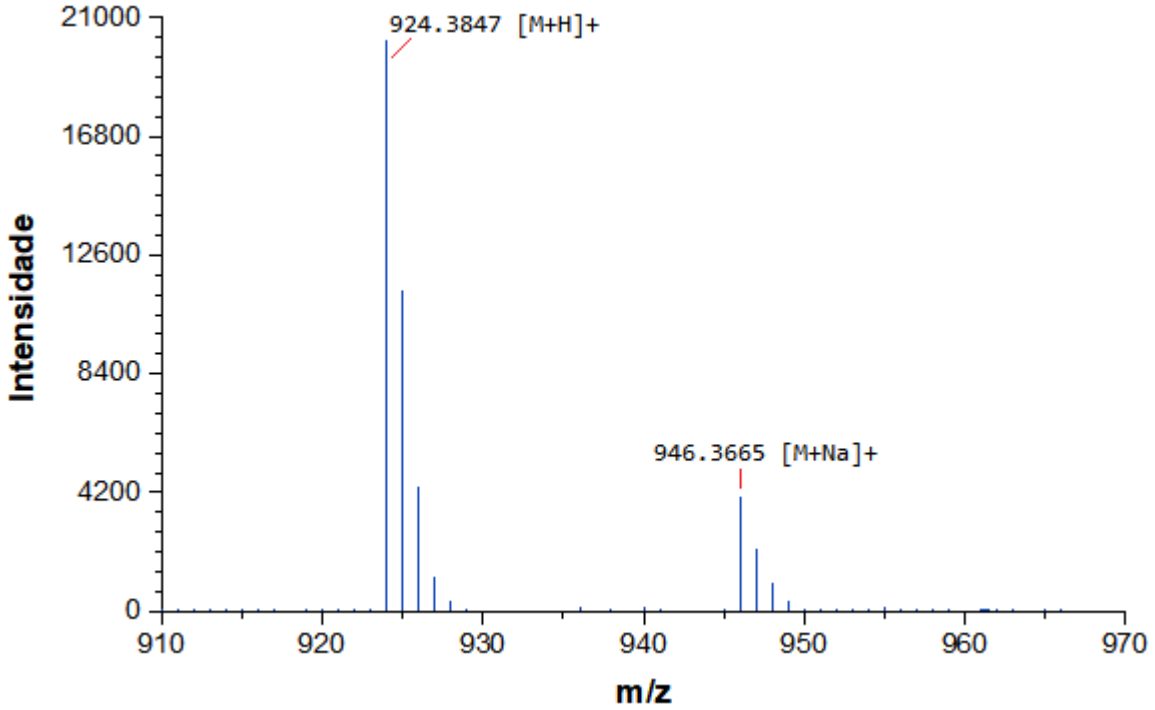



*Figura 60: Espectro de MS do cPaT-A cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. Os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ encontram-se evidenciados, tendo a massa 994,3847 Da e 954,3665 Da respectivamente.*

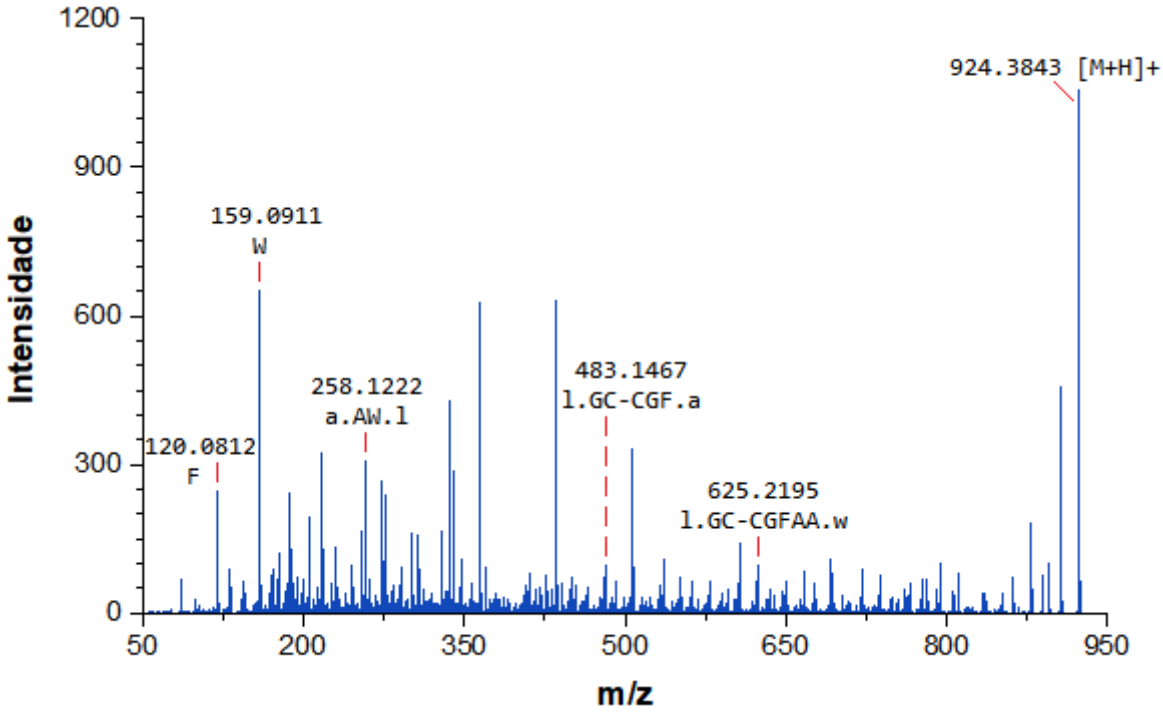



*Figura 61: Espectro de MS/MS do cPaT-A cíclico obtido por meio de ESI-Q/TOF. O íon $[M+H]^+$ encontra-se evidenciado, tendo a massa 994,3843 Da. Alguns íons fragmentos foram selecionados e também encontram-se evidenciados.*

O espectro de MS do cPaT-A reduzido exibiu os íons [M+H]+ e [M+Na]+, bem como os íons com 2 Da a menos já vistos nos espectros dos análogos anteriores, indicando que uma parte das moléculas encontra-se na forma oxidada. O espectro de MS/MS do íon [M+H]+ mostrou íons b, y e imônios, que comprovam a estrutura primária do peptídeo. O espectro de MS do cPaT-A pós-oxidação apresentou os íons [M+H]+ e [M+Na]+, em que o primeiro foi submetido a fragmentação, gerando um espectro de MS/MS que mostrou fragmentos internos de acordo com sua sequência de aminoácidos.

A Tabela 14 evidencia os íons b, y e imônios encontrados nos espectros de MS/MS dos peptídeos reduzidos para cada análogo. As Tabelas 15 e 16 apresentam os íons fragmentos mais abundantes encontrados em cada um dos espectros de MS/MS dos análogos em sua forma cíclica. Como antes feito para o cPaT-2, a tabela contém os 10 íons mais intensos dentre os fragmentos internos (contando aqueles originários de perda de CO) e os 5 fragmentos mais intensos que apresentam a ligação dissulfeto preservada.

Tabela 14: Íons fragmentos encontrados no espectro de MS/MS do íons precursores dos peptídeos cPaT-W, cPaT-Y e cPaT-A

| Íon encontrado | m/z | | |
|---|---|---|---|
| | cPaT-W | cPaT-Y | cPaT-A |
| y8 | - | 891,4174 | - |
| y7 | 857,4148 | 834,3937 | 766,3802 |
| y6 | 671,3346 | 671,3310 | - |
| y5 | 574,2818 | 574,2787 | 548,2623 |
| y4 | 477,2283 | 477,2261 | 477,2271 |
| y3 | 291,1484 | 291,1481 | 291,1465 |
| y2 | - | 178,0635 | 178,0677 |
| b2 | 161,0374 | 161,0371 | 161,0368 |
| b3 | 347,1179 | 324,1007 | 308,1069 |
| b4 | 444,1709 | 421,1527 | 379,1446 |
| b5 | 541,2236 | 518,2045 | 450,1816 |
| b6 | 727,3032 | 704,2835 | 636,2609 |
| b7 | 840,3879 | 817,3673 | 749,3438 |
| b8 | 897,4094 | 874,3888 | 806,3673 |
| a2 | - | 133,0421 | 133,0434 |
| a3 | 319,1237 | 296,1050 | 280,1106 |
| a4 | 416,1757 | 393,1582 | 351,1494 |
| a5 | 513,2276 | 490,2101 | 422,1862 |
| a6 | 699,3078 | 676,2890 | 608,2672 |
| a7 | 812,3936 | 789,3725 | 721,3506 |
| a8 | 869,4144 | 846,3943 | 778,3708 |
| Imônio de P | 70,0677 | 70,0681 | - |
| Imônio de C | - | - | 76,0267 |
| Imônio de L | 86,0975 | 86,0979 | 86,0985 |
| Imônio de Y | - | 136,0758 | - |
| Imônio de F | - | - | 120,0815 |
| Imônio de W | 159,0919 | 159,0915 | 159,0913 |

Tabela 15: Íons fragmentos mais abundantes encontrados no espectro de MS/MS do íon precursor dos peptídeos cPaT-W e cPaT-Y

| cPaT-W | | cPaT-Y | |
|---|---|---|---|
| Íon encontrado | m/z | Íon encontrado | m/z |
| c.GW.p | 244,1075 | y.PPWLG.c | 551,2962 |
| c.GW.p - CO | 216,1130 | y.PPWL.g | 494,2750 |
| g.WPP.w* | 381,1912 | y.PPWL.g - CO | 466,2800 |

Tabela 15: (Continuação)

| cPaT-W | | cPaT-Y | |
|---|---|---|---|
| **Íon encontrado** | **m/z** | **Íon encontrado** | **m/z** |
| g.WP.p* | 284,1391 | y.PPW.l | 381,1917 |
| g.WP.p - CO* | 256,1445 | y.PPW.l - CO | 353,1953 |
| w.PPWL.g | 494,2768 | y.PP.w | 195,1120 |
| p.PWLG.c | 454,2445 | p.PWL.g | 397,2237 |
| p.PWL.g | 397,2227 | p.PW.l | 284,1386 |
| p.WLG.c | 300,1681 | p.PW.l - CO | 256,1439 |
| p.WLG.c - CO | 272,1752 | p.WL.g - CO | 272,1744 |
| p.WLGC-CG.w* | 635,2388 | y.PPWLGC-C.g | 772,3263 |
| p.WLGC-CGW.p | 821,3210 | w.LGC-CGY.p | 612,2259 |
| l.GC-CGW.p | 522,1576 | l.GC-C.g* | 279,0568 |
| l.GC-CGWP.p | 619,2106 | l.GC-CGY.p | 499,1428 |
| l.GC-CGWPP.w | 716,2633 | g.C-CGY.p | 442,1225 |
| Imônio de P | 70,0689 | Imônio de P | 70,0684 |
| Imônio de L | 86,0985 | Imônio de Y | 136,0760 |
| Imônio de W | 159,0918 | Imônio de W | 159,0914 |

*Íons encontrados com asterisco possuem outro íon de massa análoga. Exemplo: o íon g.WPP.w possui a mesma massa que o íon w.PPW.l

Tabela 16: Íons fragmentos mais abundantes encontrados no espectro de MS/MS do íon precursor do peptídeo cPaT-A

| **Íon encontrado** | **m/z** |
|---|---|
| c.GFAA.w | 347,1711 |
| c.GFA.a | 276,1330 |
| c.GF.a | 205,0962 |
| c.GF.a - CO | 177,1013 |
| g.FA.a | 219,1116 |
| f.AAW.l | 329,1600 |
| f.AA.w | 143,0799 |
| a.AWL.g | 371,2062 |
| a.AW.l | 258,1222 |
| w.LG.c | 171,1123 |
| l.GC-C.g | 279,0581 |
| l.GC-CG.f | 336,0821 |
| w.LGC-CG.f | 449,1628 |
| l.GC-CGF.a | 483,1467 |

Tabela 16: (Continuação)

| Íon encontrado | m/z |
|---|---|
| I.GC-CGFAA.w | 625,2195 |
| Imônio de L | 86,0981 |
| Imônio de F | 120,0812 |
| Imônio de W | 159,0911 |

Após a caracterização da estrutura primária de cada peptídeo e, posteriormente, a verificação do sucesso da ligação dissulfeto, todos os análogos foram submetidos à purificação por HPLC numa metodologia similar à descrita para o cPaT-2. Os cromatogramas referentes a cada peptídeo estão mostrados nas Figuras 62, 63 e 64.

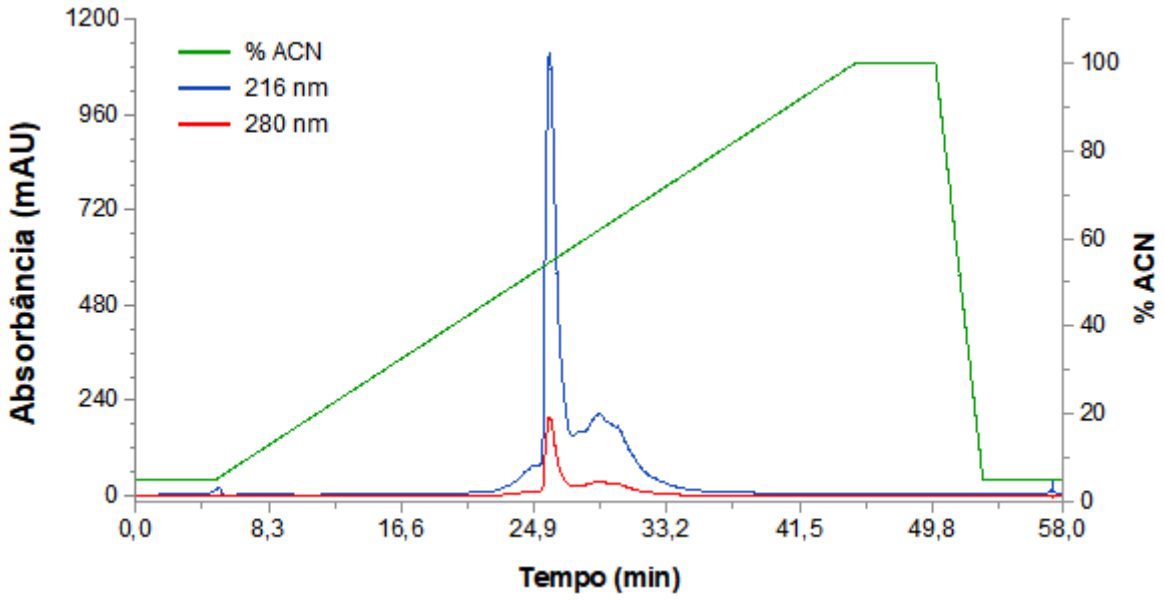



*Figura 62: Cromatograma referente a purificação do cPaT-W.*

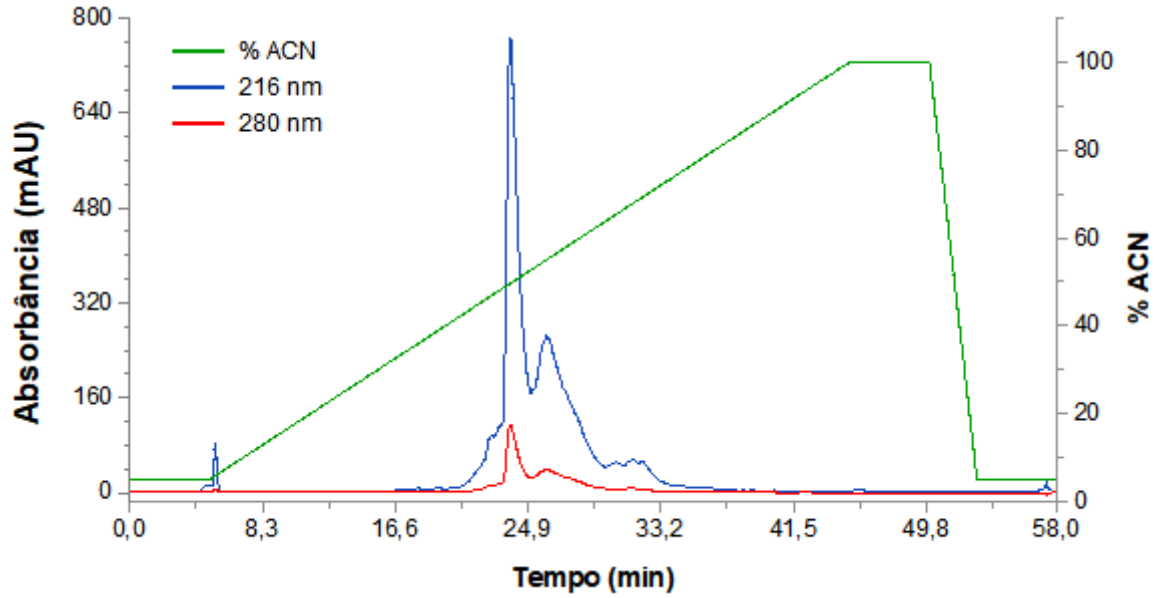



*Figura 63: Cromatograma referente a purificação do cPaT-Y.*

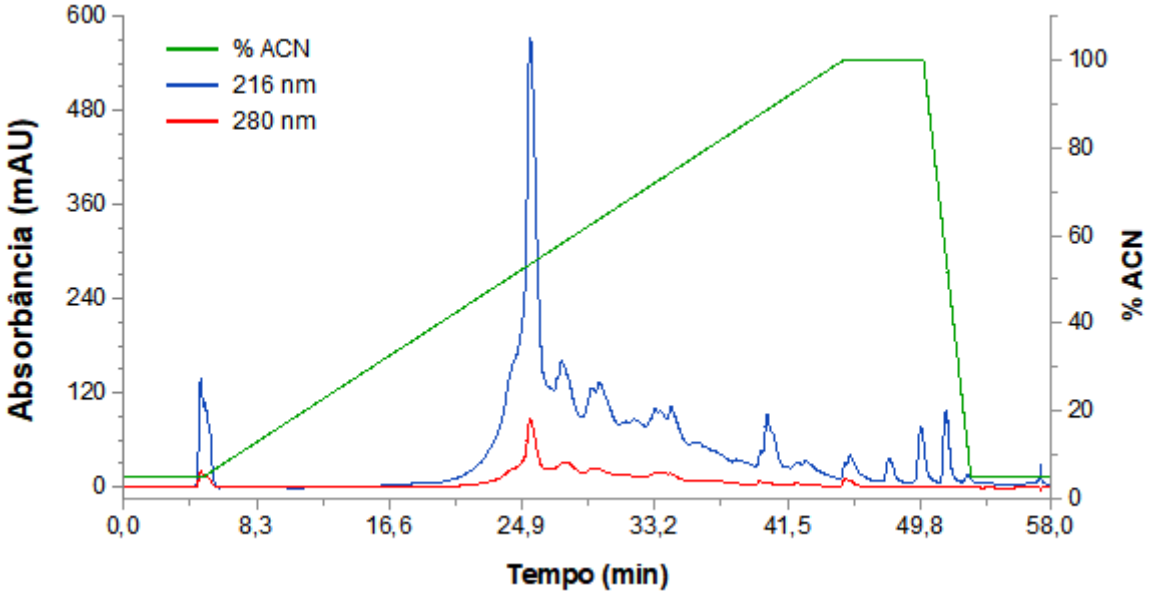



*Figura 64: Cromatograma referente a purificação do cPaT-A.*

O peptídeo cPaT-W eluiu em um tempo de retenção de 25,89 minutos, o peptídeo cPaT-Y em 23,81 minutos e o peptídeo cPaT-A em 25,43 minutos. Todos os peptídeos foram coletados manualmente. As soluções recolhidas foram liofilizadas e obteve-se os peptídeos na forma de sólidos granulados brancos.

### 5.7. LC-MS/MS dos peptídeos submetidos a oxidação por AAPH

Com o objetivo de avaliar as mudanças ocorridas nos peptídeos sintetizados quando submetidos ao AAPH, alíquotas de cada análogo foram diluídas em PBS até atingir o volume final de 100 µL. Em seguida, foi acrescentado 50 µL de uma solução de 100mM de AAPH em PBS. Após o tempo reacional de 3 horas, a solução de cada peptídeo foi sujeita a análise por LC-MS/MS, conforme a metodologia descrita. Além disso, soluções foram preparadas contendo apenas o peptídeo em PBS (sem AAPH), de forma que ambos os resultados pudessem ser comparados e os íons diferenciais avaliados. Os espectros obtidos para o cPaT-2 estão apresentados na Figura 65.

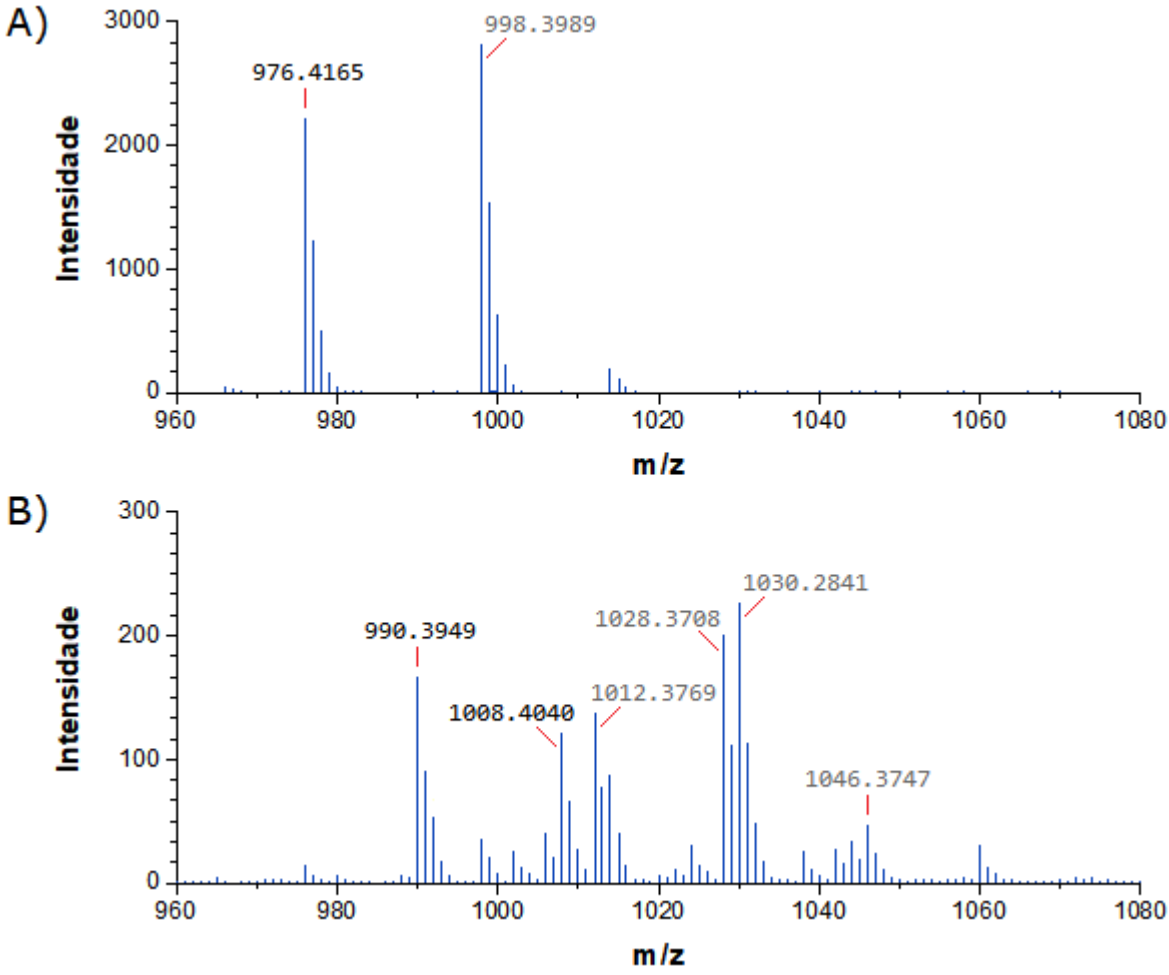



*Figura 65: Espectros de MS obtidos para o cPaT-2 A) sem AAPH e B) com AAPH. Íons marcados com números pretos são íons $[M+H]^+$, íons marcados com números em cinza são íons sodiados e potassiados. Os espectros são referentes a faixa de tempo de retenção de 9 a 11 minutos.*

O espectro do cPaT-2 em PBS exibiu os íons característicos já discutidos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ de *m/z* 976,4165 e *m/z* 998,3989, respectivamente. Quando submetido ao AAPH, a intensidade destes íons decresce significativamente e novos

íons são detectados. Avaliando estes novos íons de acordo com seus possíveis adutos, observa-se que o íon de *m/z* 1008,4040 apresenta dois adutos, o de sódio (*m/z* 1030,3840) e o de potássio (*m/z* 1046,3746). O mesmo acontece com o íon de *m/z* 990,3949, também possuindo o aduto de sódio (*m/z* 1012,3769) e o de potássio (*m/z* 1028,3709) presentes no espectro. Comparando com o íon $[M+H]^+$ do cPaT-2, o íon de 1008,4040 Da possui uma diferença de aproximadamente 32 Da, o que pode indicar a inserção de 2 átomos de oxigênio após a oxidação com AAPH. Já o íon de *m/z* 990,3949 possui uma diferença de 14 Da em relação ao íon $[M+H]^+$ do cPaT-2, indicando que mais transformações ocorreram na molécula além de apenas a inserção de átomos de oxigênio.

Os produtos de oxidação do triptofano já foram investigados por uma série de estudos e métodos. Quando o triptofano é exposto à oxidação por oxigênio singleto, podendo ser mediada por iniciadores radicalares, radiações ou calor, os produtos mais comuns detectados são dioxindolilalanina (diOia), 3-hidroxipirroloindol (PIC) ou N-formilquinurenina (NFK). Além destes, onde a oxidação se dá no anel nitrogenado, também existem os produtos de oxidação que se dão no anel de 6 membros, os hidroxitriptofanos[68]. A maioria dos mecanismos consideram produtos como PIC ou diOia estágios primários da oxidação do triptofano, em que o anel pirrol ainda se encontra fechado. Outros produtos como o NFK, em que o anel pirrol é aberto, representa um estado final de oxidação do aminoácido[69]. Com base nestes conhecimentos, sugere-se uma hipótese em que o íon de *m/z* 1008,4040 seja um produto final da oxidação do triptofano, um derivado do NFK, enquanto o íon de 990,3940 Da trata-se da oxidação do triptofano com subsequente perda de água, corroborando com a diferença de 14 Da observada. Ambos os íons seriam originários de um intermediário 3-hidroperoxitriptofano, já descrito por Gracanin et al. (2009)[70], conforme esquematiza a Figura 66.

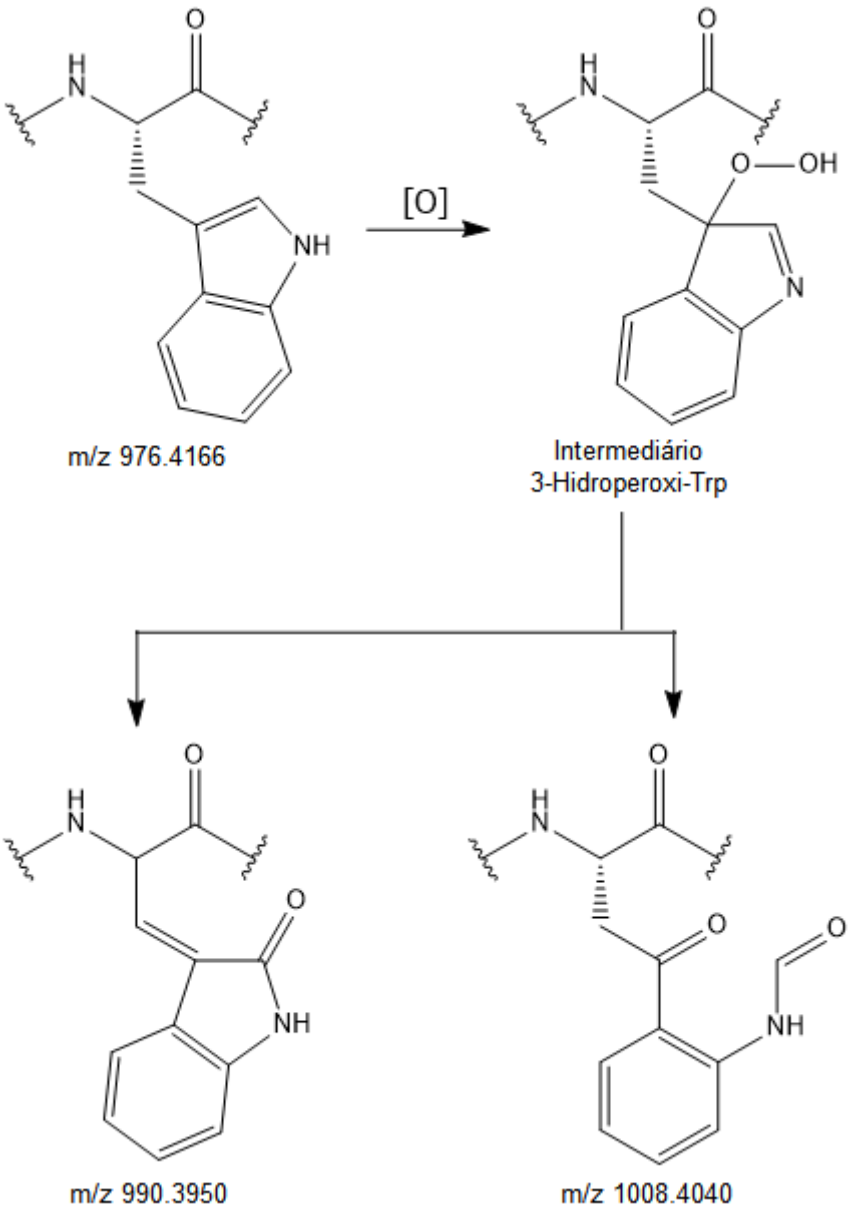



*Figura 66: Formação dos íons de m/z 990,3950 e m/z 1008,4040 a partir do íon 976,4166 após a oxidação por AAPH, passando por um intermediário 3-hidroperoxitriptofano.*

A formação do íon de *m/z* 1008,4040 através do intermediário 3-hidroperoxitriptofano pode se dar por dois mecanismos diferentes, descritos por López-Alarcón et al. (2014)[71], assim ilustrado na Figura 67. O primeiro mecanismo envolve a formação de um anel dioxetano que, posteriormente, abre-se em duas carbonilas, formando o derivado de NFK no peptídeo. O segundo mecanismo passa pela formação de um novo anel de cinco membros, gerando um derivado dihidroxipirroloindol, que posteriormente abre-se em duas etapas, formando ao final o derivado de NFK.

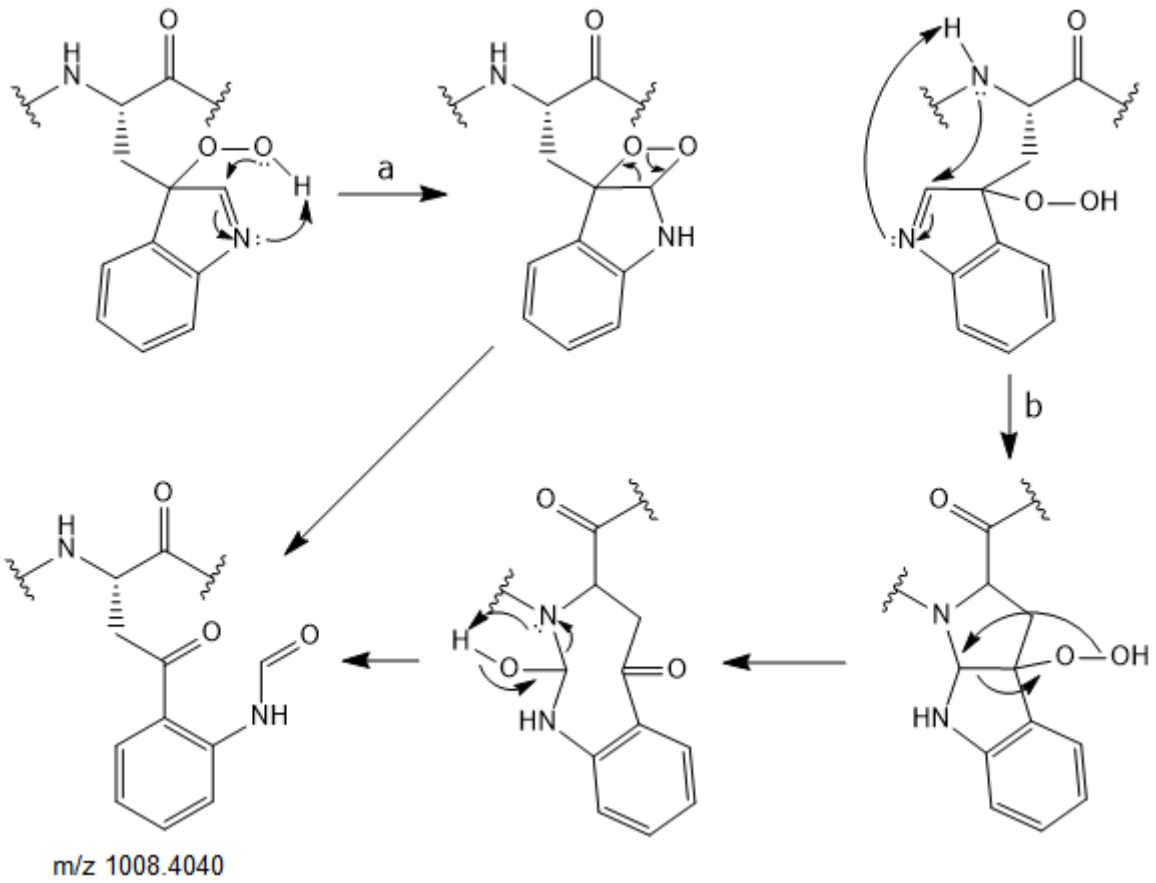



*Figura 67: Formação dos íons de m/z 1008,4040 a partir do intermediário 3-hidroperoxitriptofano. O caminho "a" passa pelo intermediário dioxetano, enquanto o caminho "b" passa pelo intermediário dihidroxipirroloindol.*

A formação do íon de *m/z* 990,3949 passa por um mecanismo similar a um dos apresentados para o íon 1008,4040 Da, descrito por Bellmaine, Schnellbaecher e Zimmer (2020), em que inicialmente o intermediário 3-hidroperoxitriptofano forma um anel dioxetano, porém no processo de abertura do anel é formado uma carbonila e um álcool em um produto análogo ao diOia[68]. Este produto sofre perda de água, uma fragmentação comum em compostos naturais[60], formando uma dupla ligação conjugada com a carbonila da estrutura, conforme mostra a Figura 68.

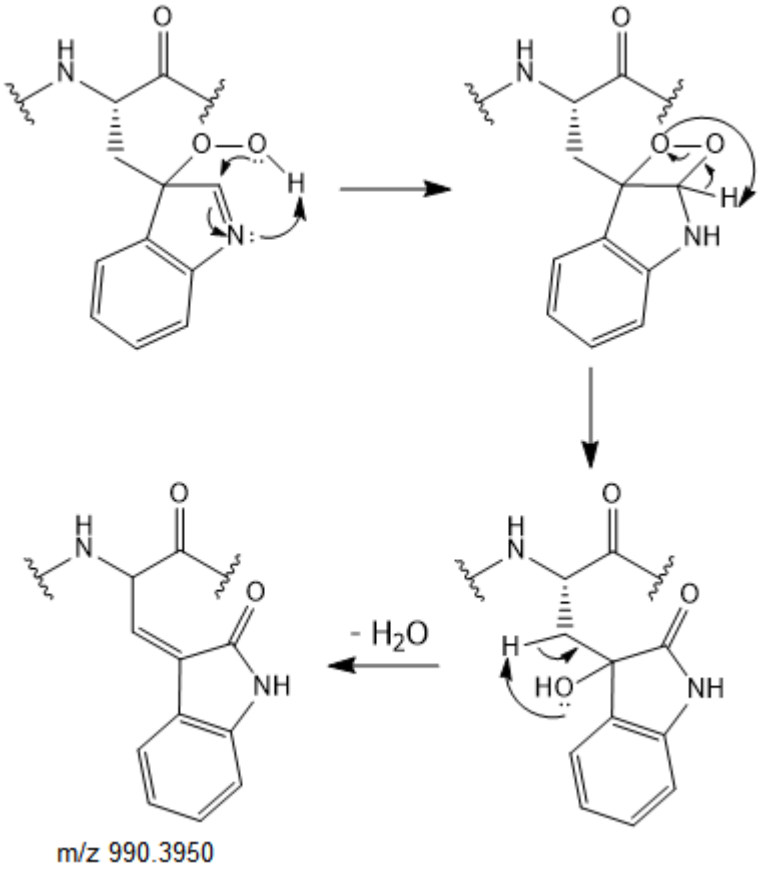



*Figura 68: Formação dos íons de m/z 990,3950 a partir do intermediário 3-hidroperoxitriptofano.*

Para uma maior avaliação das estruturas propostas, os íons de *m/z* 1008,4040 e 990,3949 foram submetidos a fragmentação, gerando espectros de MS/MS. O espectro de MS/MS para o íon de *m/z* 1008,4040 está apresentado na Figura 69.

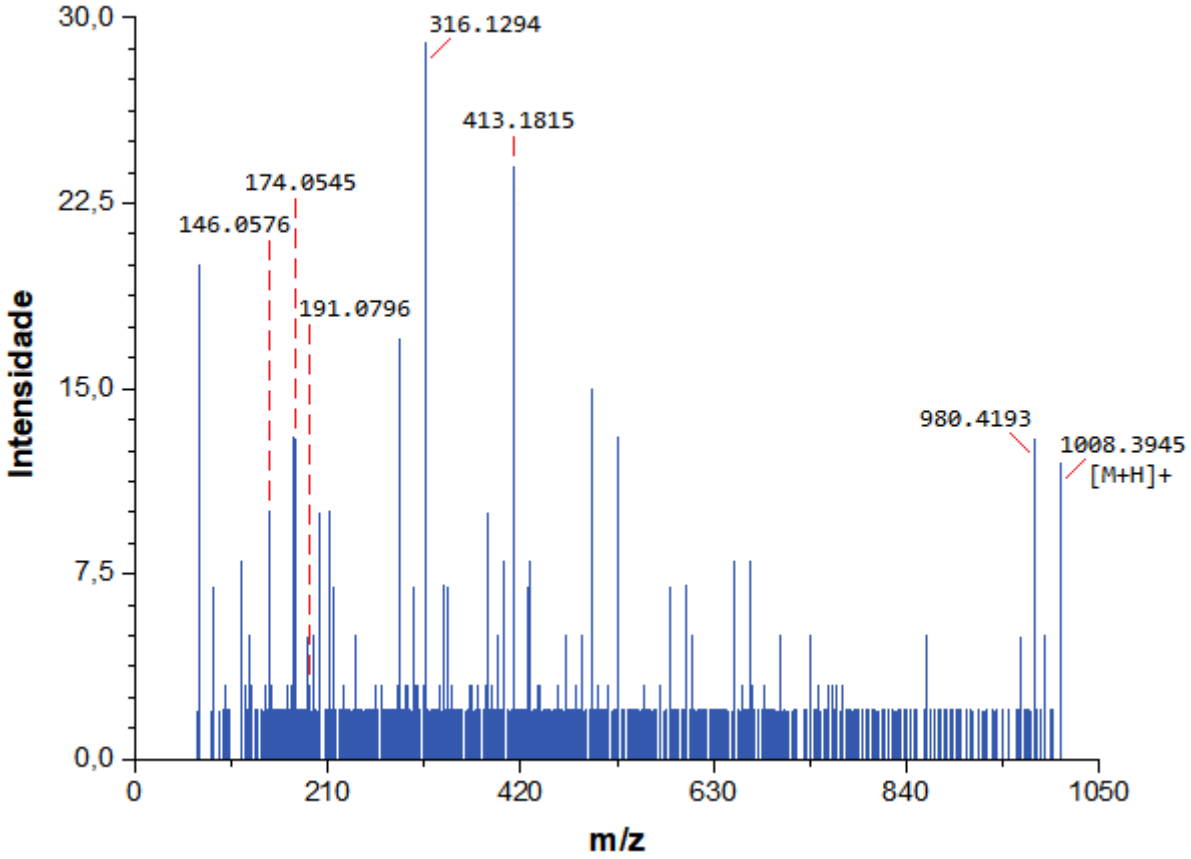



*Figura 69: Espectro de MS/MS do íon precursor $[M+H]^+$ de m/z 1008,4040 Da.*

Através da análise dos íons imônios, é possível avaliar a princípio que a mudança proporcionada pela oxidação com AAPH está de fato centralizada no resíduo de aminoácido de triptofano, uma vez que seu imônio característico, de 159,0922 Da, não é observado no espectro. Com base na hipótese apresentada que o íon de 1008,4040 Da é um produto de oxidação análogo ao NFK, a utilização da fragmentação interna através do mecanismo "fragmentação b/y → íon b → fragmentação b/y → íon b" leva a formação dos íons de *m/z* 413,1815 e *m/z* 316,1294, os íons de maior intensidade do espectro. Além disso, o imônio gerado através triptofano pós-oxidação também pode ser observado no espectro, cuja massa corresponde a 191,0796 Da. A Figura 70 mostra estes íons fragmentos.

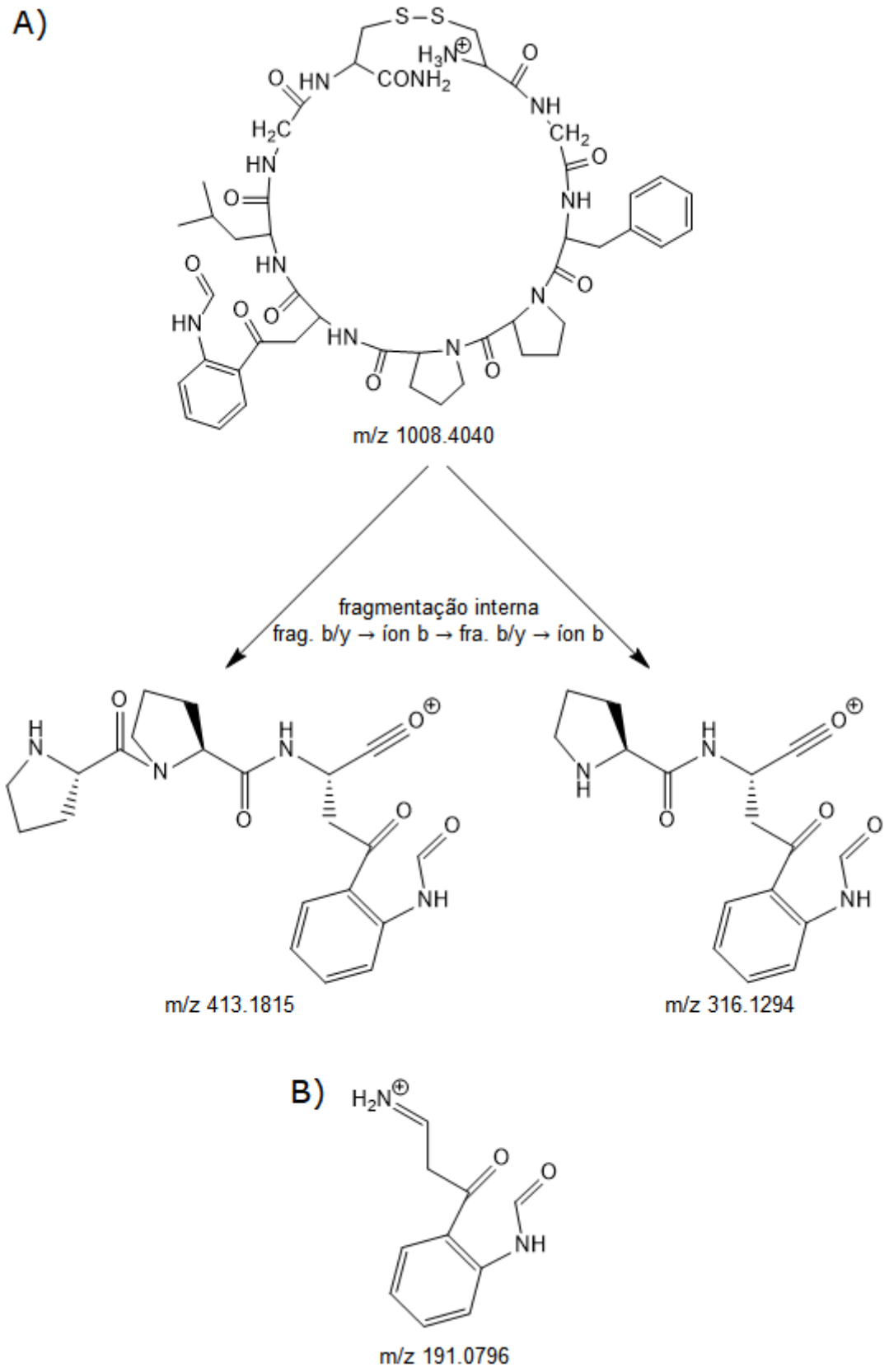



*Figura 70: A) Fragmentação interna do íon de m/z 1008,4040 gerando os fragmentos internos de m/z 413,1815 e m/z 316,1294. B) Íon imônio formado a partir do resíduo de aminoácido após o processo de oxidação com AAPH.*

Diferente dos produtos de oxidação do triptofano como o PIC ou o diOia, o NFK é um produto de oxidação também encontrado fisiologicamente, formado de forma natural pelo metabolismo celular[68]. Através de processos enzimáticos, o triptofano é transformado em NFK e posteriormente em quinurenina (Kyn), que subsequentemente pode ser utilizado para a síntese de diversas moléculas importantes para o organismo, como o ácido xanturênico, NAD+ e acetilcoenzima A[72]. Considerando tal conhecimento, existe a hipótese que o produto de oxidação do peptídeo análogo ao NFK também se fragmente formando um derivado de Kyn. Esta fragmentação é de fato observada, formando o íon de *m/z* 980,4193, que em novas fragmentações gera outros íons que podem ser observados no espectro, como os íons de *m/z* 174,0545 e de *m/z* 146,0576. A Figura 71 ilustra os íons formados através do derivado de Kyn.

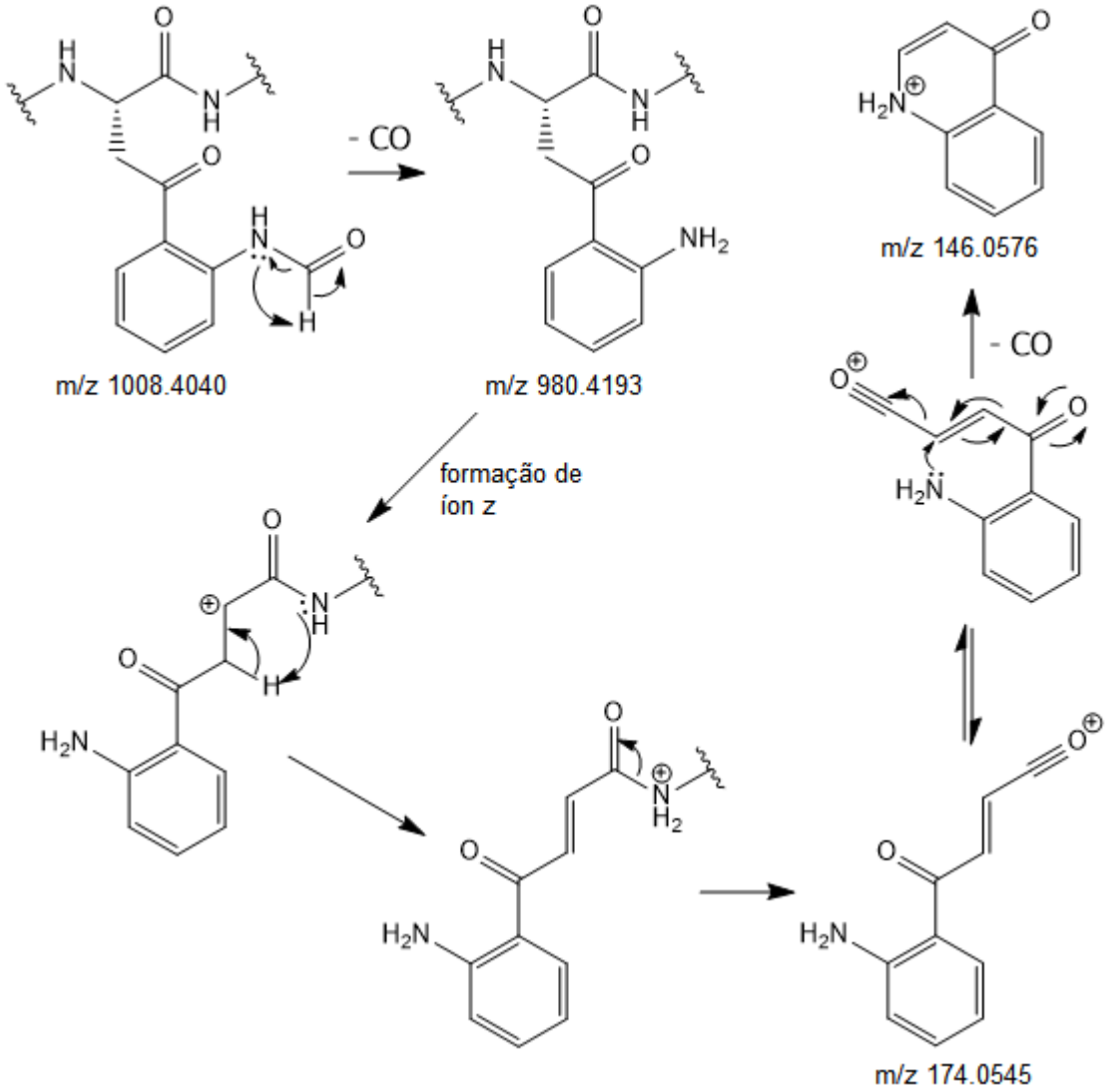



*Figura 71: Fragmentação do íon de m/z 1008,4040 (derivado de NFK) gerando o íon de m/z 980,4193 (derivado de Kyn) que, posteriormente, fragmenta-se nos íons de m/z 174,0545 e m/z 146,0576.*

Íons com aproximadamente 174 Da e 146 Da são encontrados em espectros de MS para a quinurenina[73]. O mecanismo de fragmentação sugerido para a formação destes íons encontra base no proposto pelo estudo de Ronsein et al. (2008)[74], com as devidas adaptações ao se levar em consideração que o resíduo de triptofano do cPaT-2 encontra-se inserido na sequência primária do peptídeo. Após a produção do derivado de Kyn, o peptídeo sofre uma fragmentação entre os resíduos de prolina e triptofano pós-oxidação formando um íon do tipo z (que pode ser gerado a partir de um íon y que sofreu perda de amônia). Este íon, posteriormente, sofre um rearranjo, formando uma dupla ligação conjugada com a carbonila presente na estrutura. Subsequente clivagem da ligação amídica ainda presente no lado C-terminal do peptídeo gera o íon acílio de *m/z* 174,0545. Este íon, em seguida, sofre ciclização e eliminação de CO, formando um biciclo de *m/z* 146,0576.

As propostas de fragmentação apresentadas e os íons encontrados para o espectro de MS/MS do íon de *m/z* 1008,4040 corroboram para que esta molécula seja um produto de oxidação do peptídeo em que o triptofano é oxidado para um derivado de NFK.

Propostas de fragmentação também foram realizadas para o espectro de MS/MS do íon de 990,3949 Da, ilustrado na Figura 72.

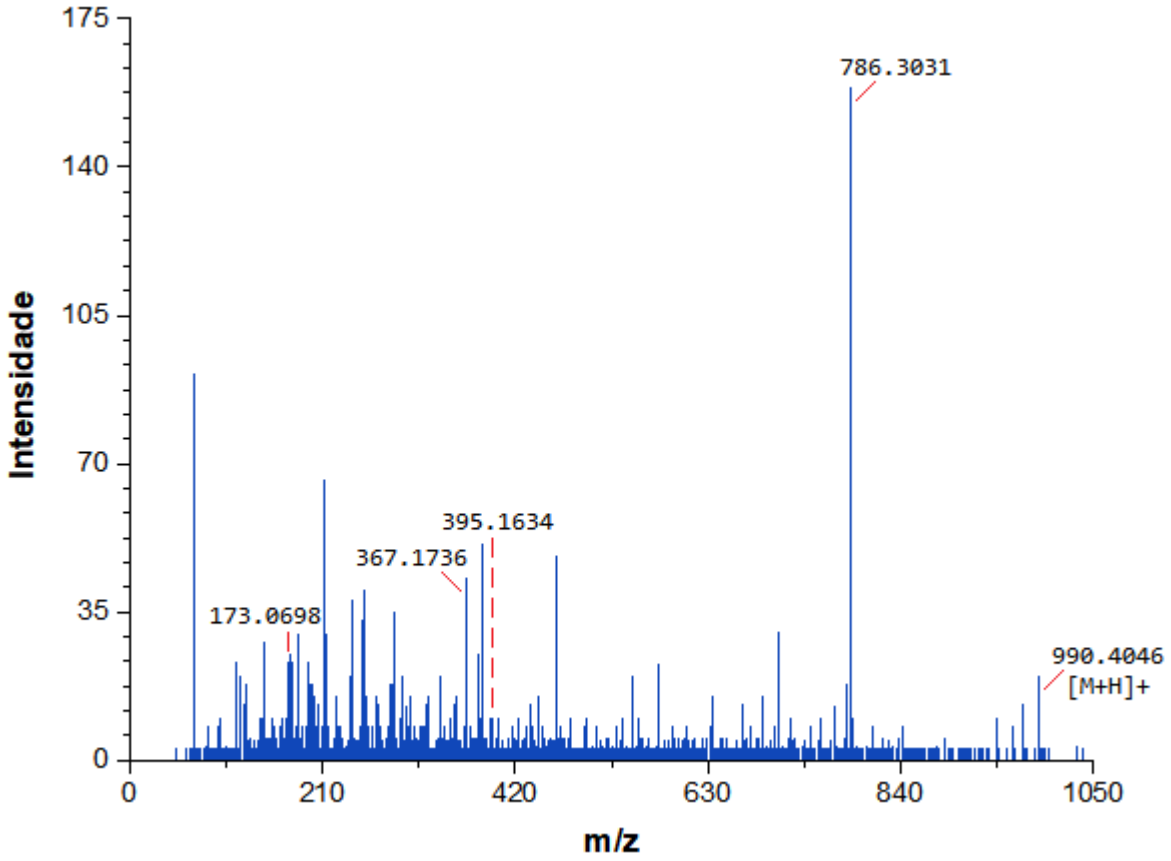



*Figura 72: Espectro de MS/MS do íon precursor $[M+H]^+$ de m/z 990,4096 Da.*

Através de mecanismos de fragmentação interna análogas às já descritas neste trabalho, é possível identificar o íon de *m/z* 786,3031, o mais intenso do espectro, como um fragmento interno. Não se pode afirmar, contudo, que o seu caminho de fragmentação acontece pelos mecanismos "fragmentação b/y → íon b → fragmentação b/y → íon b" ou "fragmentação b/y → íon b → fragmentação b/y → íon y", uma vez que a formação de íons b e y, quando localizadas nos aminoácidos N-terminal ou C-terminal, possuem mecanismos diferentes, como os chamados "a1-yx pathway" ou "aziridinone pathway"[61].

Em busca de mais íons que corroboram com a estrutura pós-oxidação proposta para o íon de 990,3949 Da, foram feitas fragmentações análogas aos picos dos fragmentos mais intensos encontrados para o espectro de MS/MS do cPaT-2. Dessa forma, foi encontrado o íon fragmento interno de *m/z* 395,1634, que sofre perda de CO, formando o íon de *m/z* 367,1736, também encontrado no espectro. Além destes, também é observado o íon imônio formado para a estrutura proposta, de *m/z* 173,0698. Os íons encontrados estão ilustrados na Figura 73.

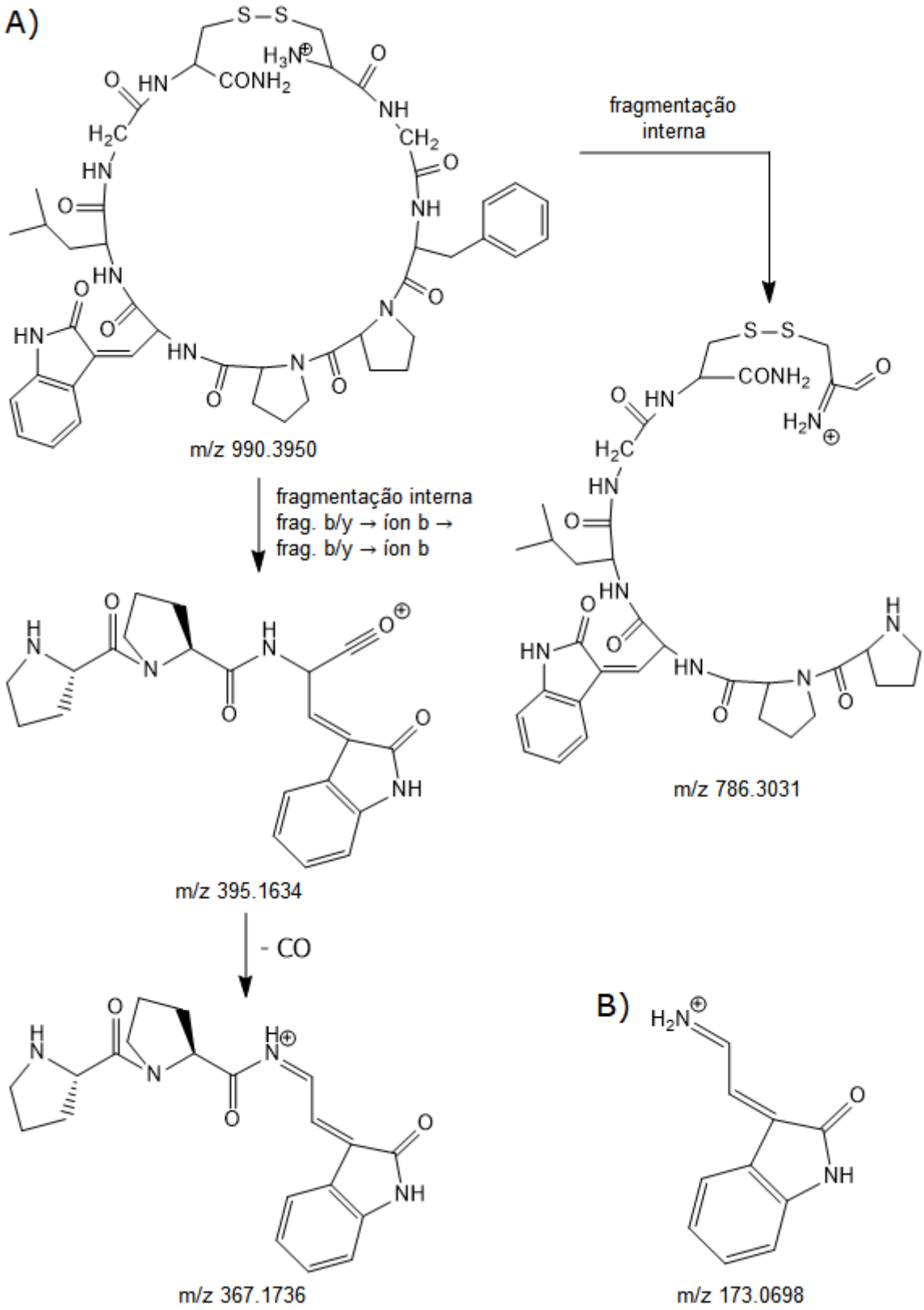



*Figura 73: A) Fragmentação interna do íon de m/z 990,3950, gerando os fragmentos internos de m/z 786,3031 e m/z 395,1634, que subsequentemente se fragmenta no íon de m/z 367,1736. B) Íon imônio formado a partir do resíduo de aminoácido após o processo de oxidação com AAPH.*

De acordo com os íons encontrados nas propostas de fragmentação apresentadas, chega-se à conclusão de que o ponto central de oxidação do cPaT-2 está no resíduo de aminoácido de triptofano. Os caminhos de oxidação propostos também não permitem conjecturas acerca do efeito de aminoácidos vizinhos, já que o triptofano é, aparentemente, o único centro reacional destas moléculas para os radicais testados. Uma vez que tais estruturas foram elucidadas, os espectros dos análogos cPaT-W, cPaT-Y e cPaT-A foram analisados de forma a verificar se o mesmo padrão de oxidação é visto. Os espectros do peptídeo cPaT-W apenas solubilizado em PBS e posteriormente incubado com AAPH estão apresentados na Figura 74.

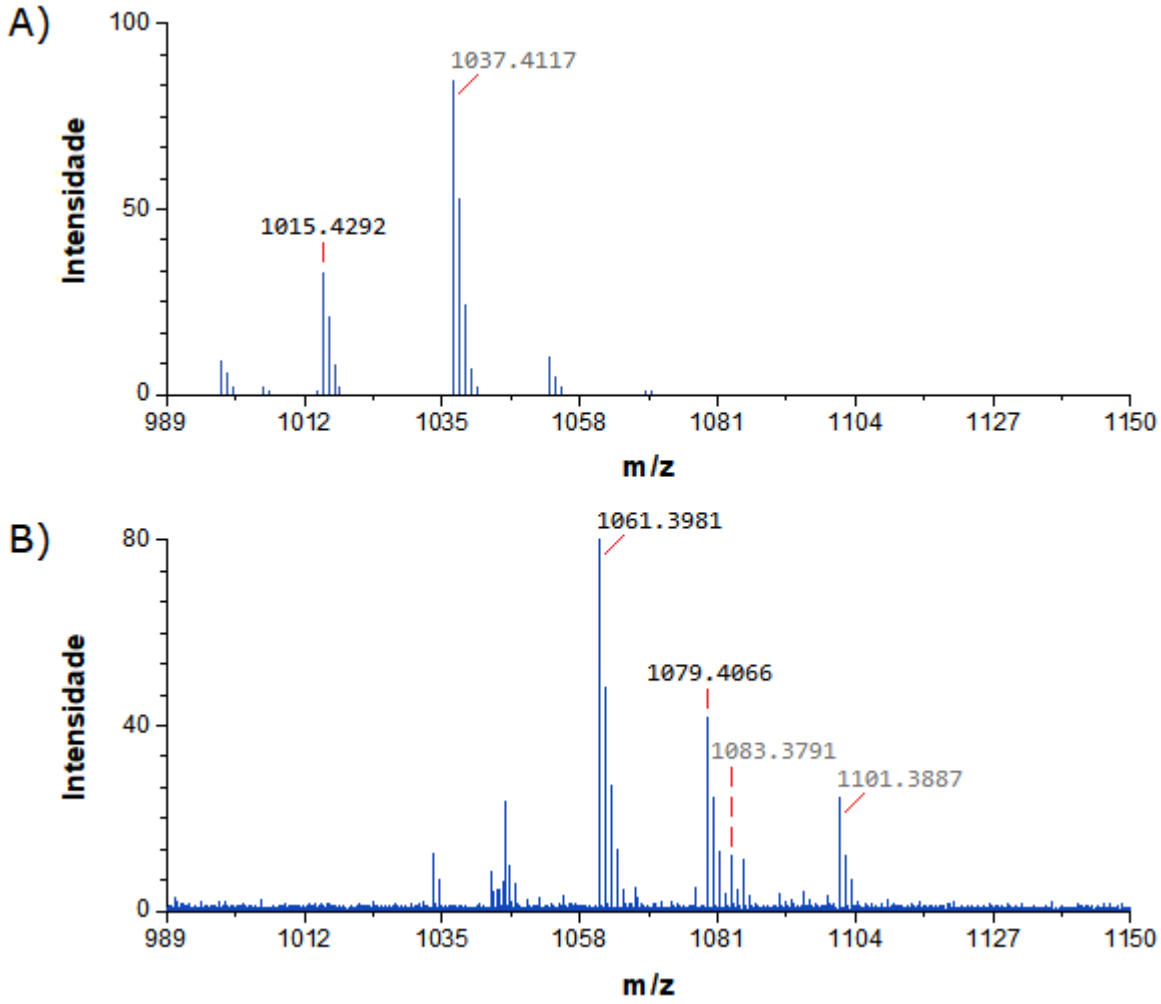



*Figura 74: Espectros de MS obtidos para o cPaT-W A) sem AAPH e B) com AAPH. Íons marcados com números pretos são íons $[M+H]^+$, íons marcados com números em cinza são íons sodiados e potassiados. Os espectros são referentes a faixa de tempo de retenção de 9 a 11 minutos para o espectro A e de 9 a 9,5 minutos para o espectro B.*

O espectro do cPaT-W em PBS apresentou os íons característicos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, com *m/z* de 1015,4292 e 1037,4117, respectivamente, conforme já

discutido. O mesmo peptídeo tratado com AAPH apresentou novos íons advindos da oxidação e, avaliando-os junto de seus possíveis adutos, dois íons se destacam. O primeiro, de *m/z* 1079,4066 (para o sodiado: *m/z* 1101,3887), possui aproximadamente 64 Da a mais que o íon $[M+H]^+$, sendo a adição de dois átomos de oxigênio em cada um dos resíduos de aminoácido de triptofano, possivelmente formando um derivado de NFK conforme acontece para o íon de *m/z* 1008,4040 no cPaT-2.

O segundo íon destaque é o de *m/z* 1061,3981, cujo íon consoante sodiado corresponde ao de *m/z* 1083,3791. Este íon possui 46 Da a mais que o íon $[M+H]^+$, possivelmente advindo da adição de dois oxigênios em cada resíduo de aminoácido de triptofano, porém um deles sofrendo perda subsequente de água. Não foram encontrados íons que correspondessem a perda de água em ambos os resíduos de triptofano (diferença de 28 Da), indicando uma hipótese que um dos triptofanos possui um ambiente químico que promove essa perda de água em detrimento do outro, em que essa perda não acontece.

O espectro de MS/MS do íon de *m/z* 1061,3981 (Figura 75) mostra íons similares aos encontrados nos dois produtos de oxidação do cPaT-2. Os íons de *m/z* 786,3077, *m/z* 395,1672 e *m/z* 367,1747 possuem a mesma estrutura dos fragmentos detectados para o íon de *m/z* 990,3950, proveniente da oxidação do cPaT-2. Isso indica que o triptofano que sofre perda de água é o segundo na estrutura primária do cPaT-W. Adicionalmente, os íons de *m/z* 174,0537 e *m/z* 146,0584 são produtos da fragmentação de um resíduo de triptofano oxidado ao derivado de NFK, conforme observado na fragmentação do íon de 1008,4040 Da do cPaT-2 pós-oxidação. Esses íons evidenciam que pelo menos um dos triptofanos do íon de *m/z* 1061,3981 foi oxidado a um derivado de NFK. Considerando que o segundo resíduo de triptofano na sequência já foi atribuído à perda de água, conclui-se que o primeiro é responsável pela formação do derivado de NFK. O íon de *m/z* 276,0966 reforça essa hipótese, tratando-se do fragmento interno c.GW.p, no qual o triptofano encontra-se oxidado ao derivado de NFK.

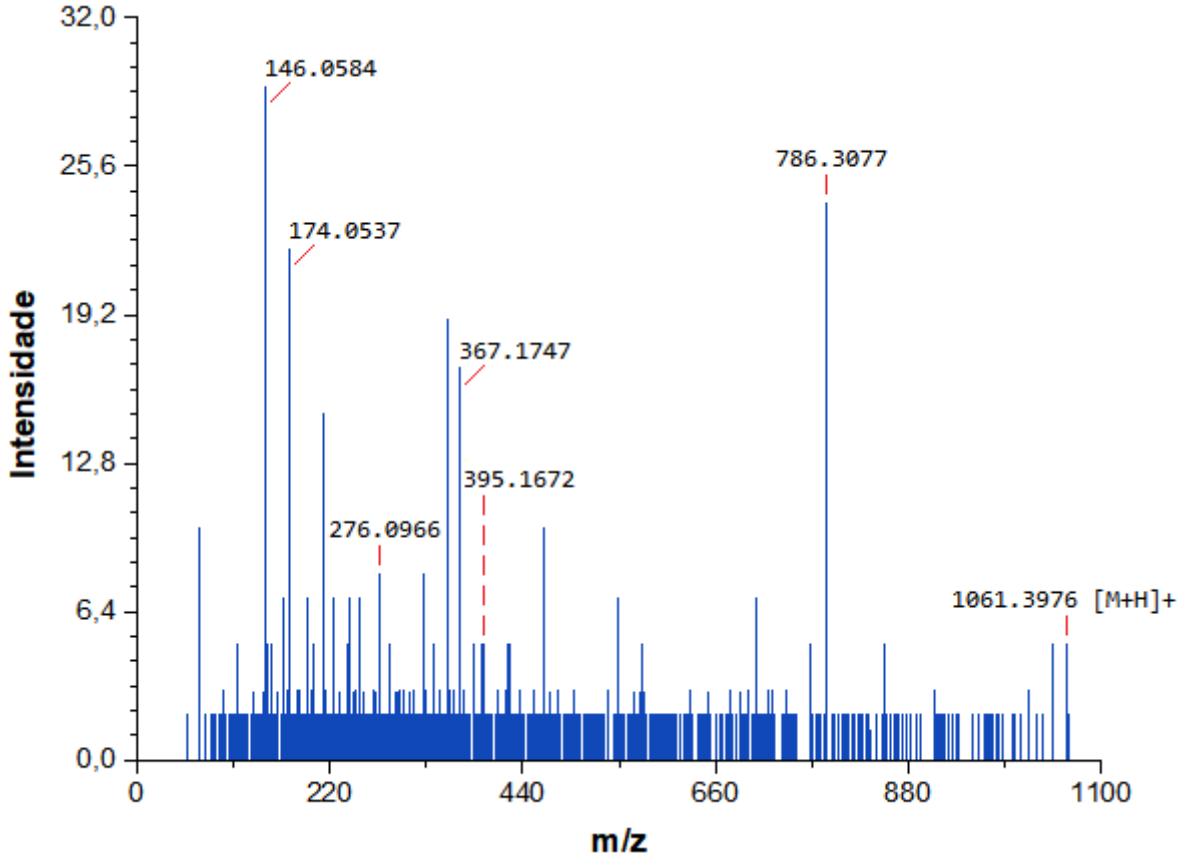



*Figura 75: Espectro de MS/MS do íon precursor $[M+H]^+$ de m/z 1061,3981 Da.*

Os espectros do peptídeo cPaT-A apenas solubilizado em PBS e posteriormente incubado com AAPH estão apresentados na Figura 76.

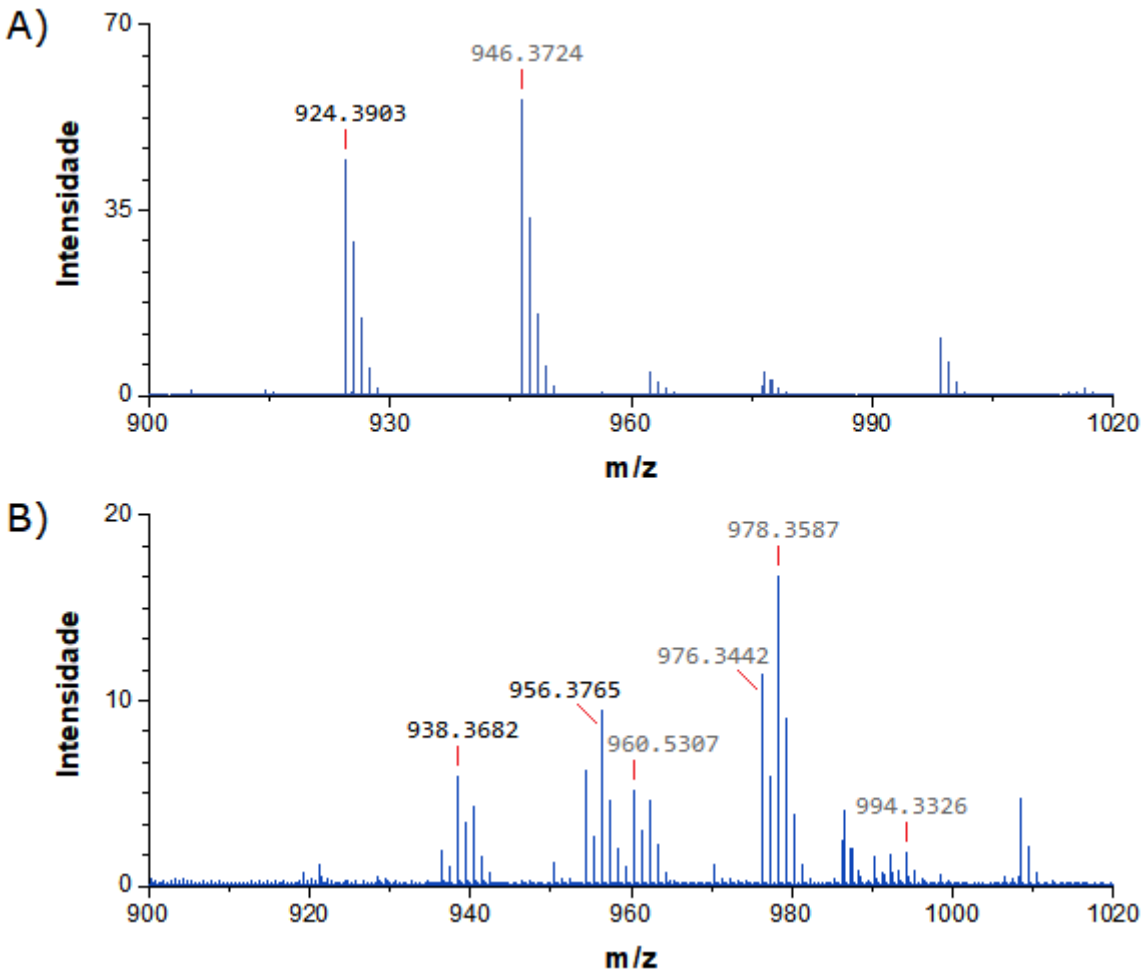



*Figura 76: Espectros de MS obtidos para o cPaT-A A) sem AAPH e B) com AAPH. Íons marcados com números pretos são íons $[M+H]^+$, íons marcados com números em cinza são íons sodiados e potassiados. Os espectros são referentes a faixa de tempo de retenção de 9 a 11 minutos.*

Assim como os espectros dos outros análogos, o espectro de MS do cPaT-A em PBS apresentou os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, com *m/z* de 924,3903 e 946,3724, respectivamente. O espectro de MS do cPaT-A após a oxidação com AAPH mostrou um padrão de reação similar ao do cPaT-2. O íon de *m/z* 956,3765, cujos adutos encontrados foram o de sódio com *m/z* 978,3587 e o de potássio com *m/z* 994,3326, corresponde ao $[M+H]^+$ com o acréscimo de aproximadamente 32 Da, se tratando do triptofano sendo oxidado para o derivado de NFK. O íon de *m/z* 938,3682, cujos adutos encontrados foram o de sódio com *m/z* 960,5307 e o de potássio com *m/z* 976,3442, apresenta uma diferença de aproximadamente 14 Da do íon $[M+H]^+$, correspondendo a oxidação do triptofano com dois oxigênios com subsequente perda de água. Devido a forma de comportamento similar entre os peptídeos cPaT-2 e cPaT-A, os resíduos de aminoácido de prolina parecem não ter algum efeito na atividade antioxidante destes análogos.

Por fim, os espectros do peptídeo cPaT-Y apenas solubilizado em PBS e posteriormente incubado com AAPH estão apresentados na Figura 77.

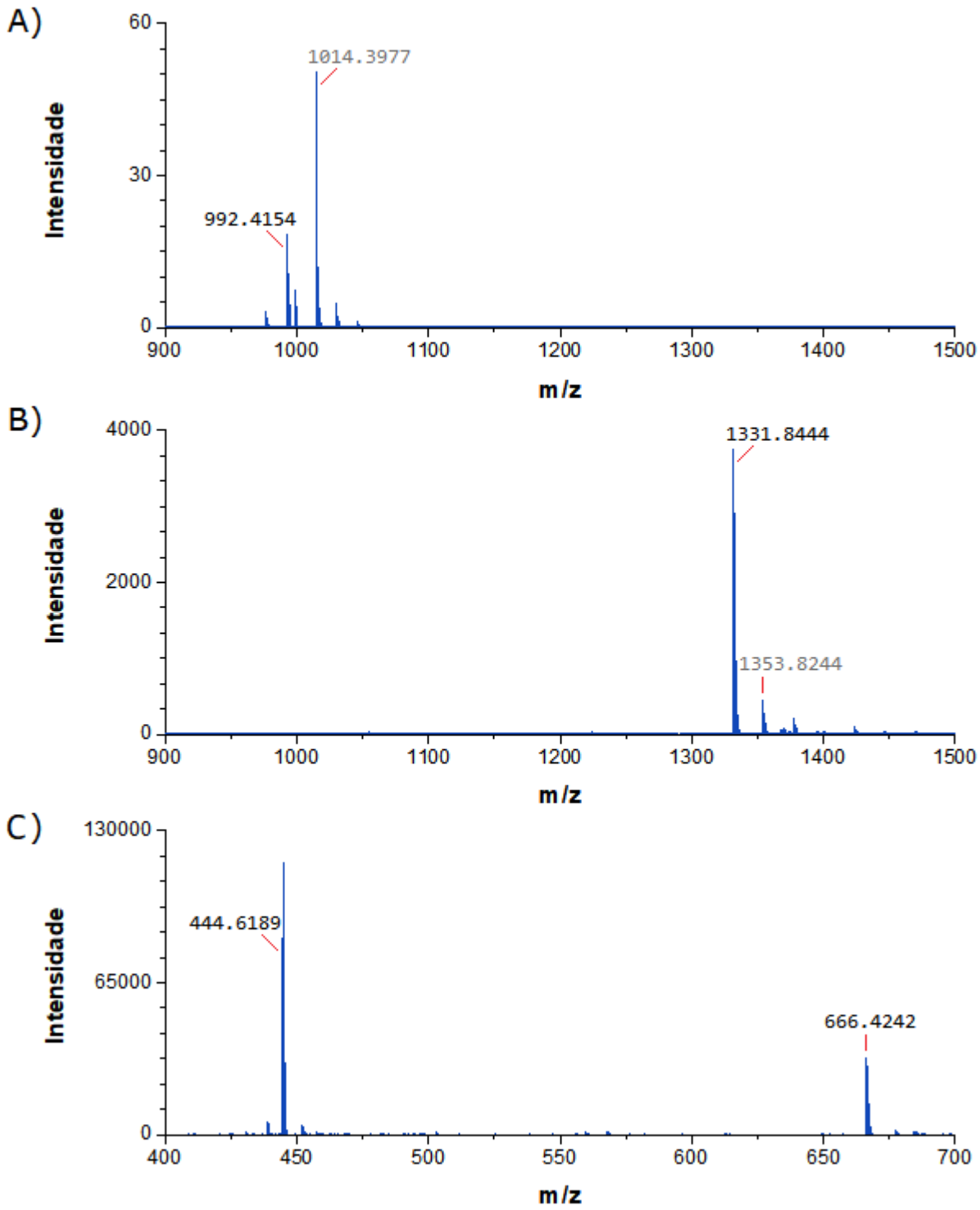



*Figura 77: Espectros de MS obtidos para o cPaT-Y A) sem AAPH, B) com AAPH, faixa entre 900 e 1500 Da e C) com AAPH, faixa entre 400 e 700 Da. Íons marcados com números pretos são íons $[M+H]^+$ (íons $[M+2H]^{2+}$ e $[M+3H]^{3+}$ no caso de C), íons marcados com números em cinza são íons sodiados e potassiados. Os espectros são referentes a faixa de tempo de retenção de 9 a 11 minutos para o espectro A e de 8 a 9 minutos para os espectros B e C.*

De maneira consistente com os espectros dos outros análogos, o espectro de MS do cPaT-Y em PBS apresentou os íons $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, com *m/z* de 992,4154 e 1014,3977, respectivamente. Contudo, diferente dos análogos anteriores, o espectro do cPaT-Y após o processo de oxidação não apresentou íons com a adição de aproximadamente 14 ou 32 Da, nem outras diferenças vistas ou cogitadas para o cPaT-W como 64, 46 ou 28 Da. Apenas um íon diferencial foi detectado, possuindo 1331,8444 Da (aduto sodiado com valor de 1353,8244 Da). Este íon apresenta uma diferença de aproximadamente 339 Da, indicando que seu mecanismo de oxidação não envolve apenas a adição de oxigênios ao triptofano. Outra característica diferencial do íon de *m/z* 1331,8444 em comparação aos demais foi a ocorrência de sua dupla carga e tripla carga, de *m/z* 666,4242 e *m/z* 444,6189, respectivamente. O íon de *m/z* 666,4242 foi submetido a fragmentação, gerando seu espectro de MS/MS apresentado na Figura 78.

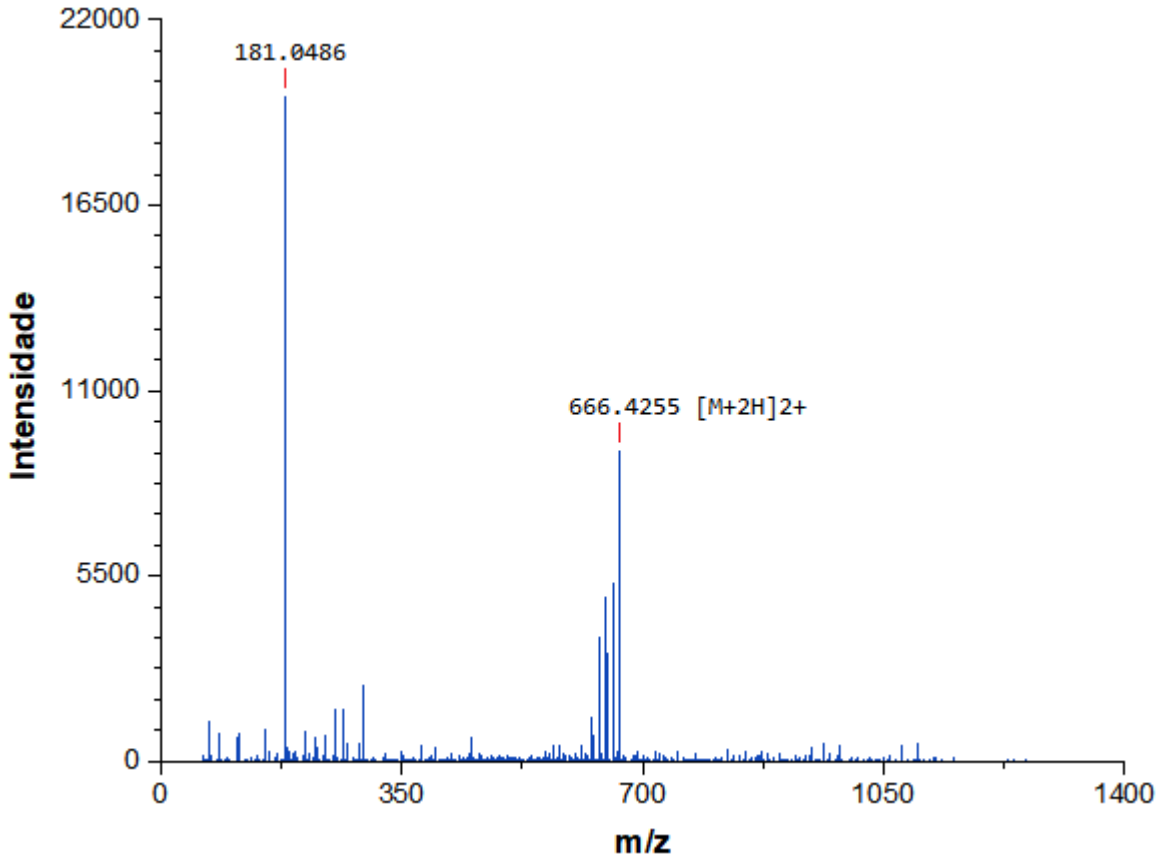



*Figura 78: Espectro de MS/MS do íon precursor $[M+2H]^{2+}$ de m/z 666,4242 Da.*

Analisando o espectro de MS/MS do íon dupla carga de *m/z* 666,4242, observa-se que não apenas o íon imônio do triptofano (159.0922 Da), como também

o imônio de tirosina (136.0762 Da), não foram detectados, indicando que estes dois resíduos de aminoácidos foram modificados pela oxidação com AAPH. Ainda, a aparição de múltiplas cargas sugere que a diferença de massa adquirida contenha átomos que possam atuar como base, captando hidrogênios do meio e adquirindo mais cargas positivas na mesma molécula. A nova estrutura formada após a oxidação do cPaT-Y ainda não foi elucidada e novos estudos serão necessários, mas pode-se concluir, pelos espectros apresentados, que o mecanismo desta transformação envolve tanto o resíduo de triptofano quanto o resíduo de tirosina. Sugere-se ainda que a transformação observada não é simplesmente o somatório da oxidação do triptofano e da tirosina, já que íons de oxidação incompleta não foram detectados. É possível que o mecanismo de oxidação do cPaT-Y envolva a ação sinergística entre os aminoácidos Trp e Tyr, conforme sugerido por outros pesquisadores[32,34].

### 5.8. Ensaios de atividade antioxidante com ABTS

A fim de verificar a capacidade antioxidante dos análogos, foi realizado um ensaio frente a radicais gerados por ABTS. Os resultados para cada peptídeo são mostrados na Figura 79.

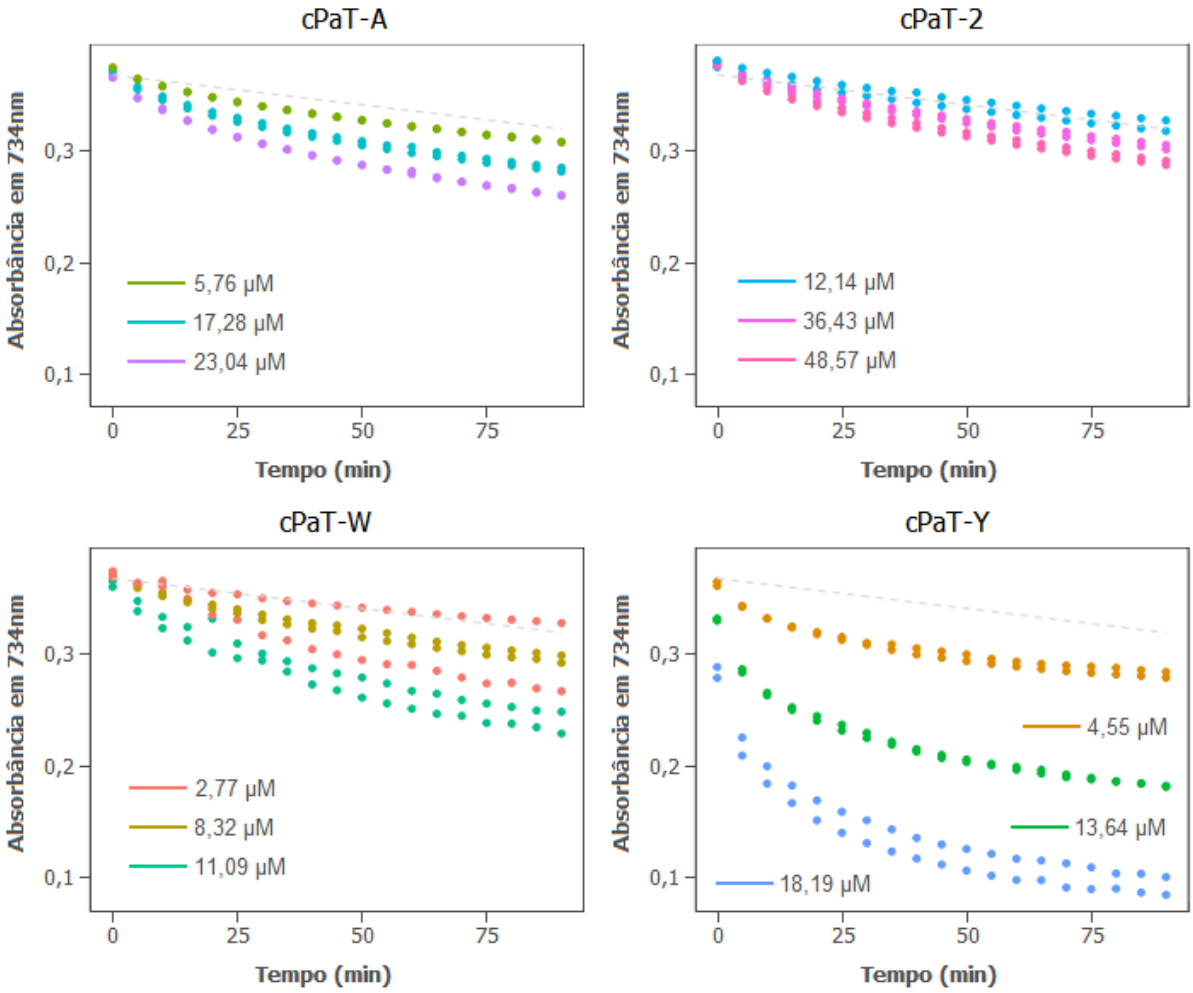



*Figura 79: Resultados para o ensaio de ABTS para os quatro peptídeos cíclicos testados. Cada concentração foi testada em duplicata, portanto cada concentração apresenta duas curvas.*

Observa-se que todos os peptídeos induzem uma queda no valor de absorbância detectado no comprimento de onda de 734 nm, este relacionado ao ABTS em sua espécie radicalar. Inclusive, esta queda está abaixo dos valores para a decomposição espontânea do ABTS radicalar (linhas pontilhadas em cada gráfico). Esta observação indica que todos os peptídeos possuem a atividade antioxidante de neutralizar os radicais ABTS. Por estes resultados, também se nota o efeito de dose-resposta com o aumento da concentração para todos os peptídeos, ou seja, quanto maior a concentração empregada, maior também foi a neutralização dos radicais ABTS. Este efeito foi mais pronunciado para o análogo cPaT-Y. O padrão dose-resposta é quebrado apenas nos resultados obtidos para o cPaT-W em uma das duplicatas realizadas para a concentração de 2,77 µM, estando isso associado provavelmente a um erro de preparação da referida amostra.

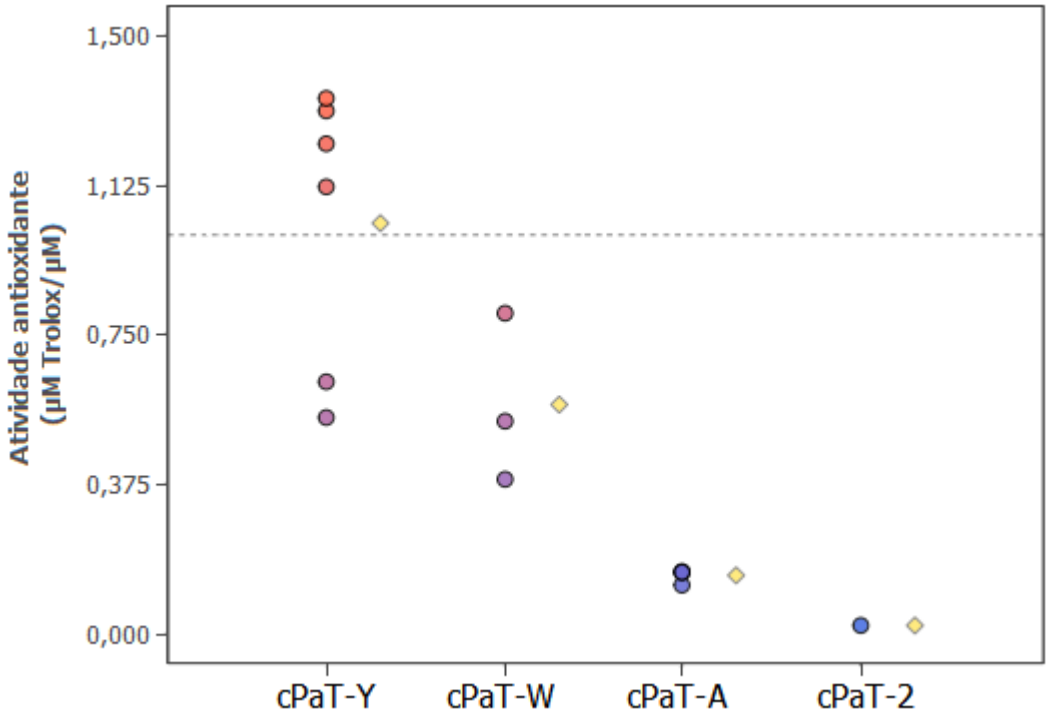



*Figura 80: Atividade antioxidante para os quatro peptídeos testados em comparação à atividade antioxidante do Trolox. Cada ponto circular é referente a uma concentração, incluindo a duplicada. Certos pontos encontram-se sobrepostos. Os losangos amarelos são referentes ao valor médio de todas as amostras testadas.*

A Figura 80 traz os resultados obtidos para os peptídeos em comparação ao Trolox, ao qual trata-se de um análogo hidrofílico da vitamina E utilizado como padrão antioxidante para comparação. Observa-se que, em comparação ao Trolox, o peptídeo cPaT-Y apresentou uma maior atividade antioxidante em suas duas maiores concentrações testadas, 13,64 µM e 18,19 µM. Além disso, o valor médio de atividade antioxidante de todas as concentrações testadas para este peptídeo também se encontra acima da atividade encontrada para o Trolox. Por meio da comparação com a atividade do Trolox, também é possível confrontar a atividade antioxidante entre os peptídeos, em que a ordem da atividade antioxidante da menor para a maior foi cPaT-2 < cPaT-A < cPaT-W < cPaT-Y.

Estes resultados permitem tirar algumas conclusões. A comparação da atividade antioxidante entre os peptídeos cPaT-2 e cPaT-A sugere que uma possível interação entre os resíduos de prolina e os resíduos aromáticos do peptídeo não interfere positivamente no potencial antioxidante da molécula. Pelo contrário, o peptídeo cPaT-A apresentou-se levemente mais antioxidante do que o cPaT-2. Na comparação entre os peptídeos cPaT-2 e cPaT-A contra o peptídeo cPaT-W, confirma-

se que o centro da atividade antioxidante dos peptídeos está no resíduo de aminoácido de triptofano, uma vez que existe um aumento considerável da capacidade antioxidante no cPaT-W se comparado aos outros dois mencionados.

Ainda, a troca do resíduo de aminoácido de fenilalanina no cPaT-2 para tirosina no cPaT-Y aumentou significativamente a capacidade antioxidante da molécula para os radicais formados por ABTS. É sabido que a tirosina também possui atividade antioxidante[75], assim como o triptofano, logo a atividade antioxidante do cPaT-Y poderia estar associada ao fato destes dois aminoácidos estarem presentes na molécula, cada um realizando a neutralização do ABTS com seu próprio mecanismo. Contudo, também existe a possibilidade do mecanismo da atividade antioxidante do cPaT-Y estar relacionada a uma interação entre os dois resíduos de aminoácidos, sendo essa a origem da potencialização da atividade antioxidante. O efeito sinérgico entre triptofano e tirosina já foi avaliado no trabalho de Torkova et al. (2015), em que vários dipeptídeos foram sintetizados contendo um aminoácido de tirosina e outro aminoácido escolhido. Os resultados mostraram um efeito sinérgico no dipeptídeo Trp-Tyr, uma vez que este apresentou melhor atividade frente a tirosina sozinha[32].

Outra possibilidade seria o resíduo de triptofano atuando como antioxidante e o resíduo de tirosina fazendo o papel de regeneração do primeiro. Isso foi observado no trabalho de Åkerström et al. (2007), em que foi avaliada a atividade antioxidante da proteína α1-microglobulin utilizando o ensaio de ABTS. Foi proposto neste estudo um mecanismo em que, inicialmente, o grupo tiol de um resíduo de cisteína atua como antioxidante frente ao ABTS, gerando um radical tiil. Posteriormente, o radical tiil é regenerado a um tiol de forma intramolecular por um resíduo de tirosina da proteína. O radical formado no resíduo de tirosina, numa nova etapa, também reage com um radical de ABTS, formando um produto de coloração roxa[76]. Este produto de coloração roxa também já foi observado em ensaios de ABTS com plasma sanguíneo humano, clara de ovo, albumina sérica bovina, bem como com a própria tirosina livre[77].

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo teve como objetivo, inicialmente, a síntese de um análogo cíclico da triptofilina PaT-2, nomeado cPaT-2, de forma a avaliar, através de sua estrutura tridimensional, a possível modulação de sua atividade antioxidante através de interações não covalentes entre anéis aromáticos encontrados nos dois resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na molécula: fenilalanina e triptofano.

A síntese do cPaT-2 linear e sua posterior oxidação para a formação do cPaT-2 na forma cíclica, de forma geral, foi alcançada sem maiores complicações. A caracterização do peptídeo em suas duas formas (linear e cíclica) por espectrometria de massa mostrou-se satisfatória, confirmando a estrutura primária do peptídeo e a posterior formação da ligação dissulfeto entre o par de cisteínas N-terminal e C-terminal. A purificação do cPaT-2 bruto foi realizada com sucesso.

A análise do cPaT-2 por RMN mostrou-se desafiadora, uma vez que o peptídeo, em solução, apresentou três conformações diferentes, o que gera três conjuntos diferentes de sinais para cada conformação. A quantidade maior de sinais tornou vários achados ambíguos, sendo mais estudos necessários para a validação das atribuições realizadas para uma das conformações. Essa validação foi alcançada a partir de cálculos computacionais que, realizados repetidas vezes, revelaram violações estéricas ou de ângulos de diedro que puderam ser corrigidas a cada novo cálculo. Assim, a estrutura de pelo menos uma das conformações do cPaT-2 foi alcançada.

Diferente da hipótese inicial do trabalho, os resíduos de aminoácidos aromáticos presentes no cPaT-2 não apresentaram interações aromático-aromático para a estrutura tridimensional calculada. Ainda assim, estes resíduos parecem realizar uma interação do tipo CH···π com os respectivos resíduos de prolina mais próximos, o que levantou uma nova hipótese de que esta interação poderia ter algum efeito na modulação de sua atividade antioxidante.

A partir da estrutura calculada, novos análogos cíclicos derivados do cPaT-2 foram sintetizados com o objetivo de examinar a fundo as relações entre estrutura e função, também buscando modular a atividade do peptídeo para potencializar o seu efeito. Todos os análogos foram caracterizados por espectrometria de massa antes e

depois de passarem por um processo de oxidação promovido por AAPH e oxigênio do ar. Foi demonstrado que o resíduo de aminoácido de triptofano sofre oxidação, formando alguns derivados similares aos já conhecidos para este aminoácido livre (não presente na estrutura de um peptídeo ou proteína). Este padrão foi observado nos peptídeos cPaT-2, cPaT-W e cPaT-A, porém, o análogo cPaT-Y comportou-se de maneira diferente. Sua oxidação parece acontecer tanto no resíduo de triptofano quanto no resíduo de tirosina.

Ainda, algumas conclusões puderam ser tiradas a partir do teste dos análogos cíclicos frente ao ABTS: 1) A suposta interação CH···π entre os resíduos aromáticos e os hidrogênios dos resíduos de prolina não participam de maneira óbvia do mecanismo responsável para a atividade antioxidante do cPaT-2. 2) O resíduo de triptofano tem grande participação nesta atividade. 3) O análogo cPaT-Y, que possui um resíduo de aminoácido de tirosina no lugar da fenilalanina presente no cPaT-2, apresentou uma atividade antioxidante significativa, sendo maior que a da substância controle. Tal molécula tornou-se um interessante objeto para estudos futuros, tanto por sua atividade pronunciada quanto pelo seu diferente mecanismo de oxidação se comparado aos outros análogos.

Novos estudos podem ser realizados objetivando a caracterização estrutural do análogo cPaT-Y após processo de oxidação, visando a compreensão das relações entre a estrutura da molécula e sua atividade antioxidante substancialmente maior que os outros análogos cíclicos deste trabalho. A técnica de RMN poderia ser utilizada para tal propósito, a fim de identificar as mudanças estruturais ocorridas nos resíduos de triptofano e tirosina. Além disso, a técnica de MS poderia ser utilizada para a avaliação dos produtos gerados no teste com ABTS, assim como foi feito para a oxidação com AAPH. Ainda, os peptídeos cíclicos deste trabalho podem ser enviados a testes *in vitro* com diferentes tipos de células induzidas ao estresse oxidativo, algo almejado pelo nosso grupo, uma vez que todos os análogos apresentaram atividades antioxidantes frente os testes realizados neste trabalho.

A obtenção de informações sobre o modo de ação de peptídeos antioxidantes como o PaT-2 pode auxiliar a prospecção de novos peptídeos desta classe, bem como aumentar a atividade presente, através de meios sintéticos, nestas moléculas. Peptídeos antioxidantes, no futuro, podem ser utilizados como um meio alternativo de prevenção de doenças agravadas pelo estresse oxidativo ou na

preservação de alimentos, uma vez que apresentam menos efeitos colaterais que moléculas sintéticas dada sua origem natural[7,8]. Além disso, novas informações sobre o modo de ação do PaT-2 a nível de sua estrutura primária podem levar a uma melhor compreensão da atividade das triptofilinas, visto que esta classe de peptídeos biológicos ainda não possui uma função clara atribuída[21].

Com isso, o presente trabalho representa mais um passo em direção a um melhor entendimento e desenvolvimento do uso de peptídeos antioxidantes na saúde humana. Novas perspectivas são visadas, evidenciando que a área do estudo discorrido ainda possui margem para evolução.

## REFERÊNCIAS


[1] Di Marzo, N.; Chisci, E.; Giovannoni, R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* **2018**, 7, 156.

[2] Fang, Y. Z.; Yang, S.; Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, 18, 10, 872-879.

[3] Sies, H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* **2020**, 9, 9, 852.

[4] Halliwell, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, 32, 3, 125-130.

[5] Nimse, S. B.; Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **2015**, 5, 35, 27986-28006.

[6] Frijhoff, J., Winyard, P. G.; Zarkovic, N.; Davies, S. S.; Stocker, R.; Cheng, D.; Knight, A. R.; Taylor, E. L.; Oettrich, J.; Ruskovska, T.; Gasparovic, A. C.; Cuadrado, A.; Weber, D.; Poulsen, H. E.; Grune, T.; Schmidt, H. H. H. W.; Ghezzi, P. G. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, 23, 14, 1144-1170.

[7] Zou, T. B.; He, T. P.; Li, H. B.; Tang, H. W.; Xia, E. Q. The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules* **2016**, 21, 72.

[8] Nwachukwu, I. D.; Aluko, R. E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *J. Food Biochem*. **2019**; 43, e12761.

[9] Yang, H.; Wang, X.; Liu, X.; Wu, J.; Liu, C.; Gong, W.; Zhao, Z.; Hong, J.; Lin, D.; Wang, Y.; Lai, R. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 3, 571-583.

[10] Wang, R.; Zhou, Y.; Tianbao, C.; Zhou, M.; Wang, L.; Shaw, C. Identification and functional analysis of a novel tryptophyllin peptide from the skin of the red-eye leaf frog, agalychnis callidryas. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, 11, 2, 209-219.

[11] Barbosa, E. A.; Plácido, A.; Moreira, D. C.; Albuquerque, L.; Dematei, A.; Silva-Carvalho, A. É.; Cabral, W. F.; Báo, S. N.; Saldanha-Araújo, F.; Kuckelhaus, S. A. S.; Borges, T. K.; Portugal, C. C.; Socodato, R.; Teixeira, C.; Lima; F. C. D. A.; Batagin-Neto, A.; Sebben, A.; Eaton, P.; Gomes, P.; Brand, G. D.; Relvas, J. B.; Kato, M. J.; Leite, J. R. S. A. The peptide secreted at the water to land transition in a model amphibian has antioxidant effects. *Proc. R. Soc. B* **2021**, 288, 20211531.

[12] Samgina, T. Y.; Gorshkov, V. A.; Artemenko, K. A.; Kovalev, S. V.; Ogourtsov, S. V.; Zubarev, R. A.; Lebedev, A. T. Novel natural peptides from Hyla arborea schelkownikowi skin secretion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 1749-1754.

[13] Martinez, C. R.; Iverson, B. L. Rethinking the term ‘‘pi-stacking’’. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 7, 2191-2201.

[14] Thomas, A.; Meurisse, R.; Charloteaux, B.; Brasseur, R. Aromatic side-chain interactions in proteins. I. Main structural features. *Proteins* **2002**, 48, 628-634.

[15] Plevin, M.; Bryce, D.; Boisbouvier, J. Direct detection of CH/$\pi$ interactions in proteins. *Nature Chem.* **2010**, 2, 466-471.

[16] Resende, J. G. T. L. Desenho racional e síntese de um peptídeo cíclico inspirado na triptofilina PaT-2 para a modulação de sua atividade antioxidante. Trabalho de conclusão de curso em Química Tecnológica. Universidade de Brasília. **2022**.

[17] Young, I. S.; Woodside, J. V. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*. **2001**, 54, 176-186.

[18] Liu, C.; Hong, J.; Yang, H.; Wu, J.; Ma, D.; Li, D.; Lin, D.; Lai, R. Frog skins keep redox homeostasis by antioxidant peptides with rapid radical scavenging ability. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48, 9, 1173-1181.

[19] Montecucchi, P. C. Isolation and primary structure determination of amphibian skin tryptophyllins. *Peptides* **1985**, 6, SUPPL. 3, 187-195.

[20] Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri Erspamer, G.; Montecucchi, P. C.; de Castiglione, R. Phyllomedusa Skin: A huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides* **1985**, 6, SUPPL. 3, 7-12.

[21] Chen, T.; Orr, D. F.; O'Rourke, M.; McLynn, C.; Bjourson, A. J.; McClean, S.; Hirst, D.; Rao, P.; Shaw, C. Pachymedusa dacnicolor tryptophyllin-1: structural characterization, pharmacological activity and cloning of precursor cDNA. *Regul. Pept.* **2004**, 117, 1, 25-32.

[22] Conlon, J. M.; Jouenne, T.; Cosette, P.; Cosquer, D.; Vaudry, H.; Taylor, C. K.; Abel, P. W. Bradykinin-related peptides and tryptophyllins in the skin secretions of the most primitive extant frog, Ascaphus truei. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2005**, 143, 2, 193-199.

[23] Renda, T.; D'Este, L.; Buffa, R.; Usellini, L.; Capella, C.; Vaccaro, R.; Melchiorri, P. Tryptophyllin-like immunoreactivity in rat adenohypophysis. *Peptides* **1985**, 6, SUPPL. 3, 197-202.

[24] Steinborner S. T.; Gao C. W.; .Raftery M. J.; Waugh R. J.; Blumenthal T.; Bowie J. H.; Wallace J. C.; Tyler M. J. The Structures of Four Tryptophyllin and Three Rubellidin Peptides From the Australian Red Tree Frog Litoria rubella. *Aust. J. Chem.* **1994**, 47, 2099-2108.

[25] Wang, L.; Zhou, M.; Chen, T.; Walker, B.; Shaw, C. PdT-2: A novel myotropic Type-2 tryptophyllin from the skin secretion of the Mexican giant leaf frog, Pachymedusa dacnicolor. *Peptides* **2009**, 30, 8, 1557-1561.

[26] Wang, R.; Chen, T.; Zhou, M.; Wang, L.; Shaw, C. PsT-1: A new tryptophyllin peptide from the skin secretion of Waxy Monkey Leaf Frog, Phyllomedusa sauvagei. *Regul. Pept.* **2013**, 184, 14-21.

[27] Tran, T. T. N.; Tran, D. P.; Nguyen, V. C.; Tran, T. D. T.; Bui, T. T. T.; Bowie, J. H. Antioxidant activities of major tryptophyllin L peptides: A joint investigation of Gaussian-based 3D-QSAR and radical scavenging experiments. *J. Pep. Sci*. **2021**; 27, e3295.

[28] Makwana, K. M.; Mahalakshmi, R. Implications of aromatic–aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Sci.* **2015**, 24, 1920-1933.

[29] Maji, S. K.; Wang, L.; Greenwald, J.; Riek, R. Structure–activity relationship of amyloid fibrils. *FEBS Lett.* **2009**, 583, 16, 2610-2617.

[30] Samanta, U.; Pal, D.; Chakrabarti, P. Packing of aromatic rings against tryptophan residues in proteins. *Acta Cryst.* **1999**, D55, 1421-1427.

[31] Wen, C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Duan Y.; Ma H. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, 105, 308-322.

[32] Torkova, A.; Koroleva O.; Khrameeva, E.; Fedorova, T.; Tsentalovich, M. Structure-Functional Study of Tyrosine and Methionine Dipeptides: An Approach to Antioxidant Activity Prediction. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 25353-25376.

[33] Zheng, L.; Zhao, Y.; Dong, H.; Su G.; Zhao, M. Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *J. Funct. Foods* **2016**, 21, 485-496.

[34] McCaslin, T. G.; Pagba, C. V.; Chi, S.-H.; Hwang, H. J.; Gumbart, J. C.; Perry, J. W.; Olivieri, C.; Porcelli, F.; Veglia, G.; Guo, Z.; McDaniel, M.; Barry, B. A. Structure and Function of Tryptophan–Tyrosine Dyads in Biomimetic β Hairpins. *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 13, 2780–2791.

[35] Chan, W. C.; White, P. D. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, New York;* **2000**.

[36] Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, 33, 239-254.

[37] Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161-214.

[38] de Hoffmann, E. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology;* **2005**.

[39] Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova* **2008**, 31, 3, 669-675.

[40] Glish, G.; Vachet, R. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 140-150.

[41] Domon, B.; Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **2006**, 312, 212-217.

[42] Raghothama, S. NMR of peptides. *J. Indian Inst. Sci.* **2010**, 90, 1, 145-161.

[43] Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **1989**, 24, 5, 479-564.

[44] Vincenzi, M.; Mercurio, F. A.; Leone, M. NMR Spectroscopy in the Conformational Analysis of Peptides: An Overview. *Curr. Med. Chem.* **2021**, 28, 14, 2729-2782.

[45] Williamson, M. P.; Waltho, J. P. Peptide Structure from NMR. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21, 227-236.

[46] Nascimento, C. J.; Bloch Jr., C. Ressonância Magnética Nuclear: Gradus Primus. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2001**, 21, 52-61.

[47] *Biological Magnetic Resonance Data Bank.* https://bmrb.io/ref_info/csstats.php?set=full&restype=aa&output=html (acesso Nov 5, **2024**).

[48] Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. In *Introdução À Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana, Cengage Learning, São Paulo;* **2015**.

[49] Nelson, D. L.; Cox, M. M. In *Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª edição, Artmed, Porto Alegre;* **2014**.

[50] Gibbons, W. A.; Nemethy, G.; Sternt, A.; Craig, L. C. An Approach to Conformational Analysis of Peptides and Proteins in Solution Based on a Combination of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Conformational Energy Calculations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**, 67, 1, 239-246.

[51] Norton, R. S. In *Modern Magnetic Resonance, Springer*; **2018**; c. 105, p. 1081.

[52] Dyson, H. J.; Wright, P. E. Perspective: the essential role of NMR in the discovery and characterization of intrinsically disordered proteins. *J. Biomol. NMR* **2019**, 73, 651-659.

[53] Haney, E. F.; Hunter, H. N.; Matsuzaki, K.; Vogel, H. J. Solution NMR studies of amphibian antimicrobial peptides: Linking structure to function? *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. **2009**, 1788, 8, 1639-1655.

[54] Zulueta, A.; Esteve M. J.; Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* **2009**, 114, 1, 310-316.

[55] Banerjee, A.; Kunwar, A.; Mishra B.; Priyadarsini, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, 174, 2, 134-139.

[56] Nuruki Y.; Matsumoto H.; Tsukada M.; Tsukahara, H.; Takajo T.; Tsuchida K.; Anzai K. Method to Improve Azo-Compound (AAPH)-Induced Hemolysis of Erythrocytes for Assessing Antioxidant Activity of Lipophilic Compounds. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2021**, 69, 1, 67-71.

[57] Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, 20, 53-69.

[58] Mobli, M. King, G. F. NMR methods for determining disulfide-bond connectivities. *Toxicon* **2010**, 56, 6, 849-854.

[59] *Protocols for the Fmoc SPPS of Cysteine-containing Peptides.* https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/chemistry-and-synthesis/peptide-synthesis/fmoc-spps-cysteine-peptides?gclid=CjwKCAiAvJarBhA1EiwAGgZl0DYawjEIA2pMjo-2ibYcDkoOo9i9seKpXP1-iDld3Rs-wzKqcjG5DxoC0N0QAvD_BwE (acesso Nov 7, **2024**).

[60] Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, E.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports* **2016**, 33, 432-455.

[61] Paizs, B.; Suhai, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, 24, 508-548.

[62] Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L.; Breci, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 1399-1406.

[63] Ballard, K. D.; Gaskell, S. J. Sequential mass spectrometry applied to the study of the formation of “internal” fragment ions of protonated peptides. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, 111, 173-189.

[64] Ganguly, H. K.; Majumder, B.; Chattopadhyay, S.; Chakrabarti, P.; Basu, G. Direct Evidence for CH···π Interaction Mediated Stabilization of ProcisPro Bond in Peptides with Pro-Pro-Aromatic motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 10, 4661-4669.

[65] Francart, C.; Wieruszeski, J.-M.; Tartar, A.; Lippens, G. Structural and Dynamic Characterization of Pro Cis/Trans Isomerization in a Small Cyclic Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 30, 7019–7027.

[66] Brandl, M.; Weiss M. S.; Jabs A.; Sühnel J.; Helgenfeld R. C-H···π-Interactions in proteins. *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 357-377.

[67] Umezawa Y.; Tsuboyama S.; Takahashi H.; Uzawa J.; Nishio M. CH/π interaction in the conformation of peptides. A database study. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2021-2026.

[68] Bellmaine S.; Schnellbaecher A.; Zimmer A. Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, 160, 696-718.

[69] Simat T. J.; Steinhart H. Oxidation of Free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 490-498.

[70] Gracanin M.; Hawkins C. L.; Pattison D. I.; Davies M. J. Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47, 92-102.

[71] López-Alarcón C.; Arenas, A.; Lissi E.; Silva, E. The role of protein-derived free radicals as intermediaries of oxidative processes. *Biomol. Concepts* **2014**, 5, 2, 119-130.

[72] Badaway A. A.-B. Kynurenine pathway and human systems. *Exp. Gerontol.* **2020**, 129, 110770.

[73] Vazquez S.; Truscott R. J.; O'Hair R. A.; Weimann A.; Sheil M. M. A study of kynurenine fragmentation using electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2001**, 12, 7, 786-794.

[74] Ronsein, G. E.; Oliveira M. C. B.; Medeiros, M. H. G.; Mascio, P. Characterization of $O_2$ ($^1\Delta_g$)-derived oxidation products of tryptophan: A combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 2, 188-197.

[75] Gülçin I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* **2007**, 32, 3, 431-438.

[76] Akerström B.; Maghzal G. J.; Winterbourn C. C.; Kettle A. J. The lipocalin α1-microglobulin has radical scavenging activity. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 43, 31493-31503.

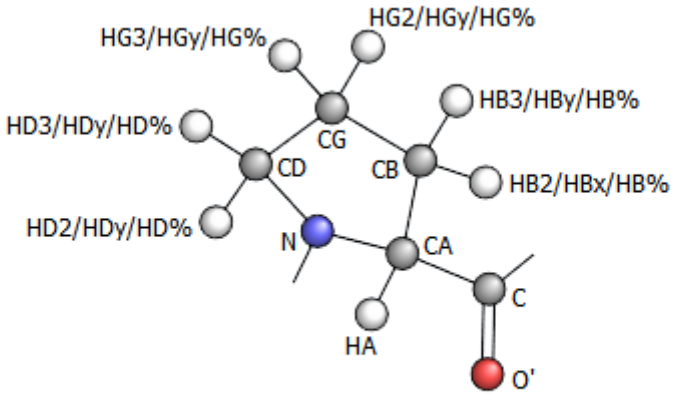
[77] Kut, K.; Stefaniuk, I.; Bartosz, G. Sadowska-Bartosz, I. Formation of a Purple Product upon the Reaction of ABTS Radicals with Proteins. *Int J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 8912, 1-13.

# ANEXOS

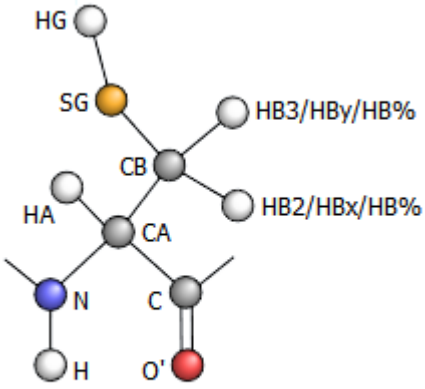
## Tabela de aminoácidos

| Aminoácido | Símbolo de uma letra | Símbolo de três letras |
|---|---|---|
| Ácido aspártico | D | Asp |
| Ácido glutâmico | E | Glu |
| Alanina | A | Ala |
| Arginina | R | Arg |
| Asparagina | N | Asn |
| Cisteína | C | Cys |
| Fenilalanina | F | Phe |
| Glicina | G | Gly |
| Glutamina | Q | Gln |
| Histidina | H | His |
| Isoleucina | I | Ile |
| Leucina | L | Leu |
| Lisina | K | Lys |
| Metionina | M | Met |
| Prolina | P | Pro |
| Serina | S | Ser |
| Tirosina | Y | Tyr |
| Treonina | T | Thr |
| Triptofano | W | Trp |
| Valina | V | Val |

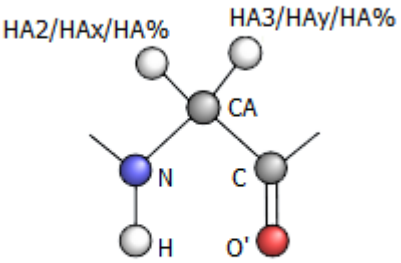
**Nomeclatura para os átomos dos aminoácidos Prolina, Cisteína e Glicina**




Prolina

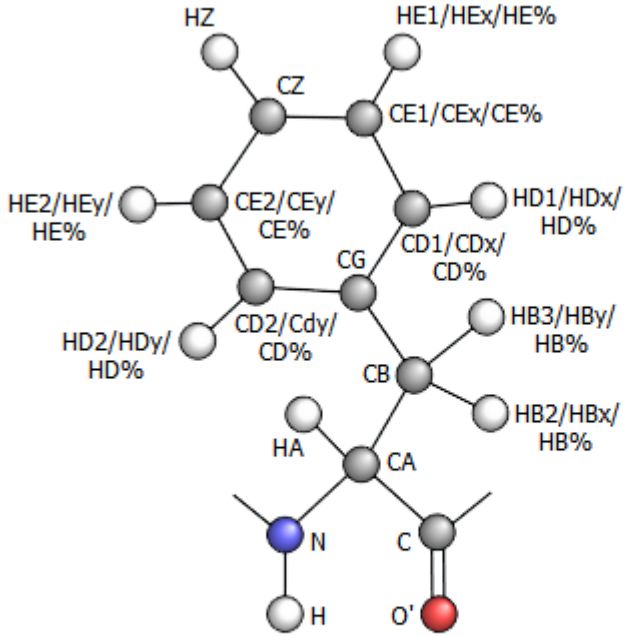



Cisteína

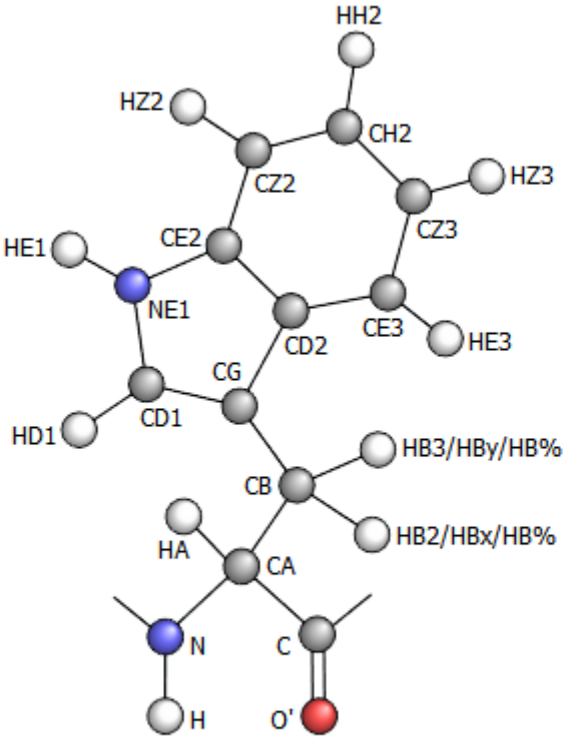



Glicina

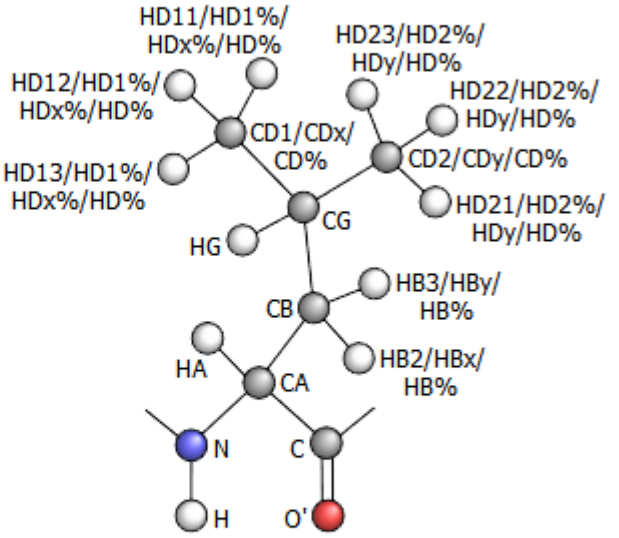
**Nomeclatura para os átomos dos aminoácidos Fenilalanina, Triptofano e Leucina**




Fenilalanina

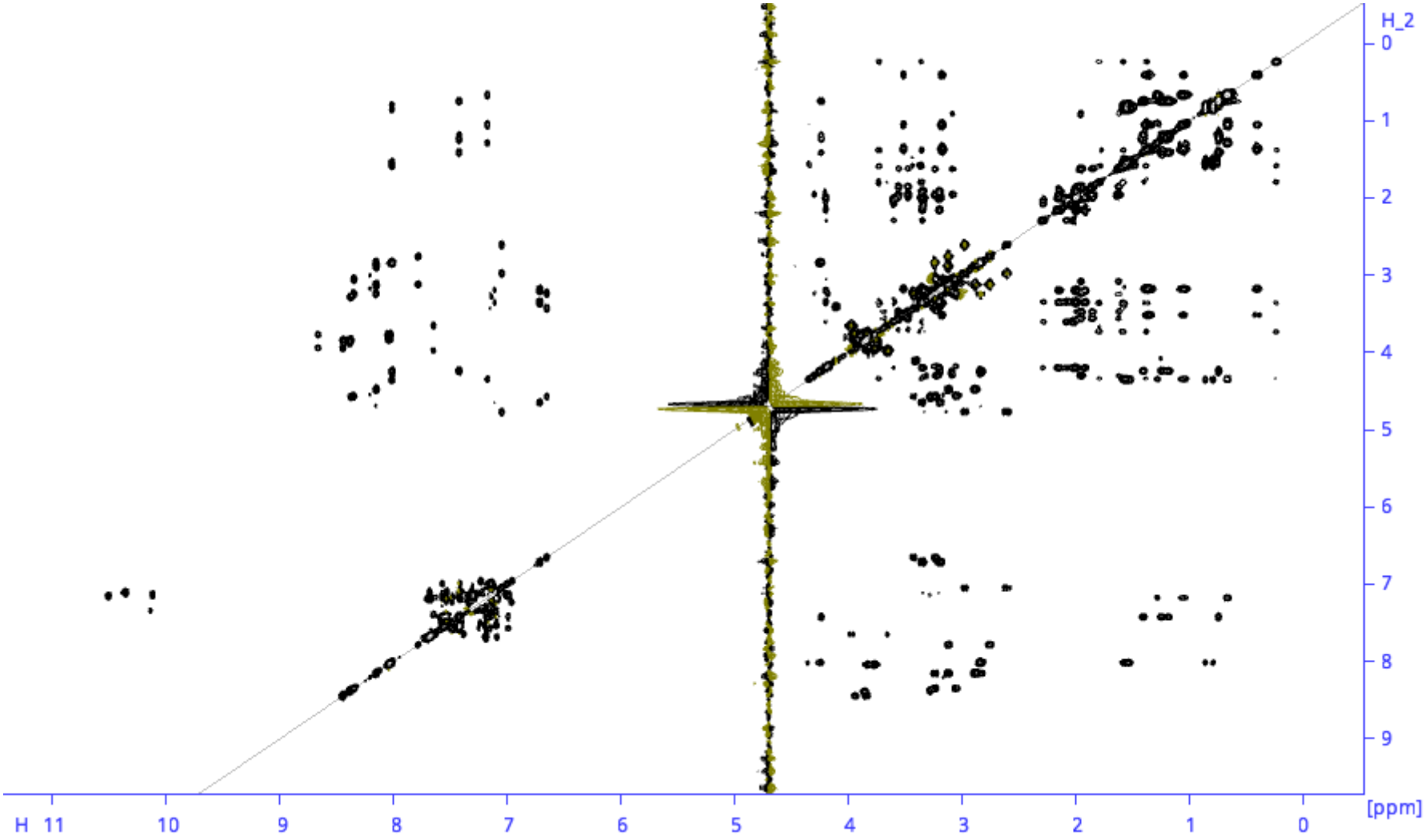



Triptofano

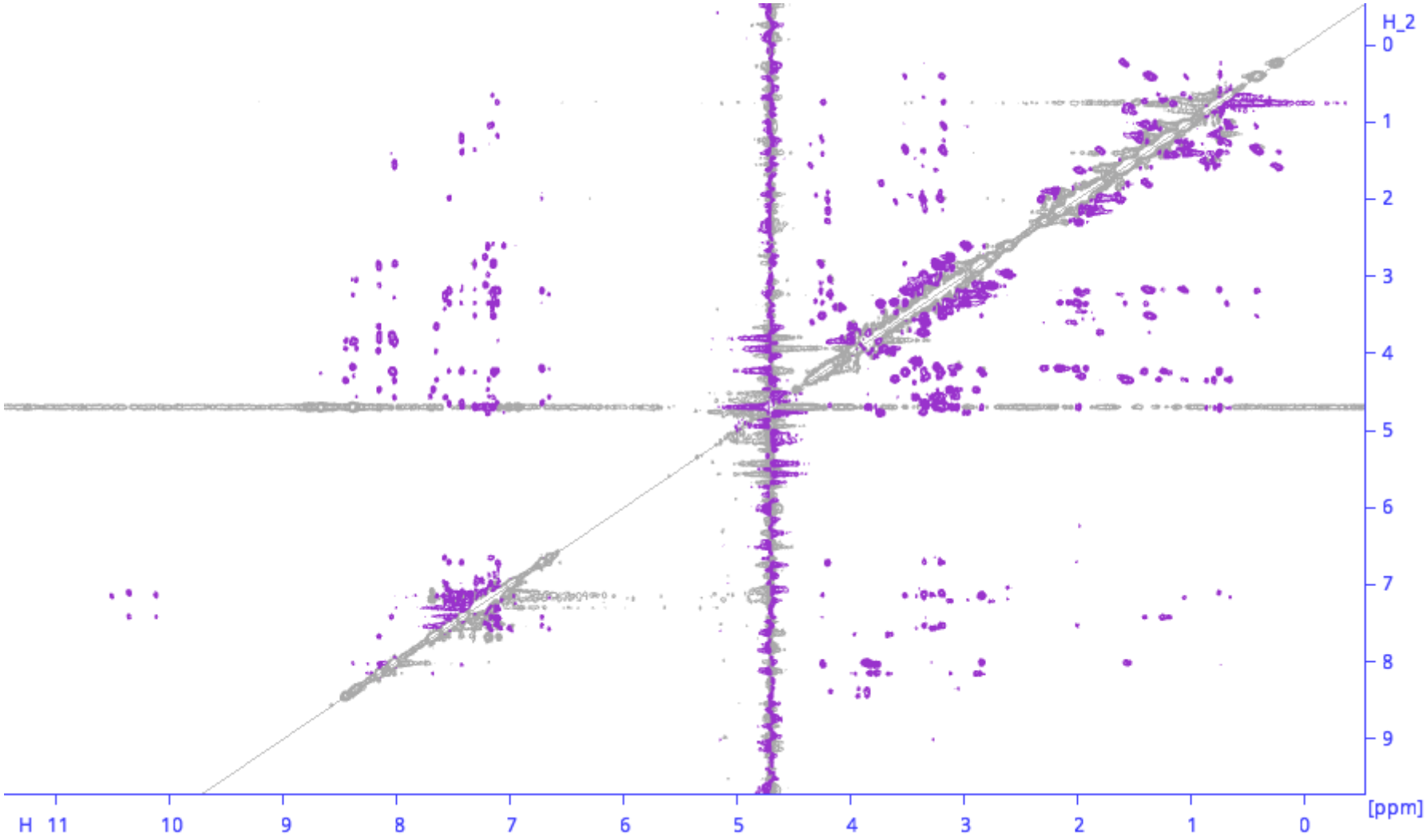



Leucina

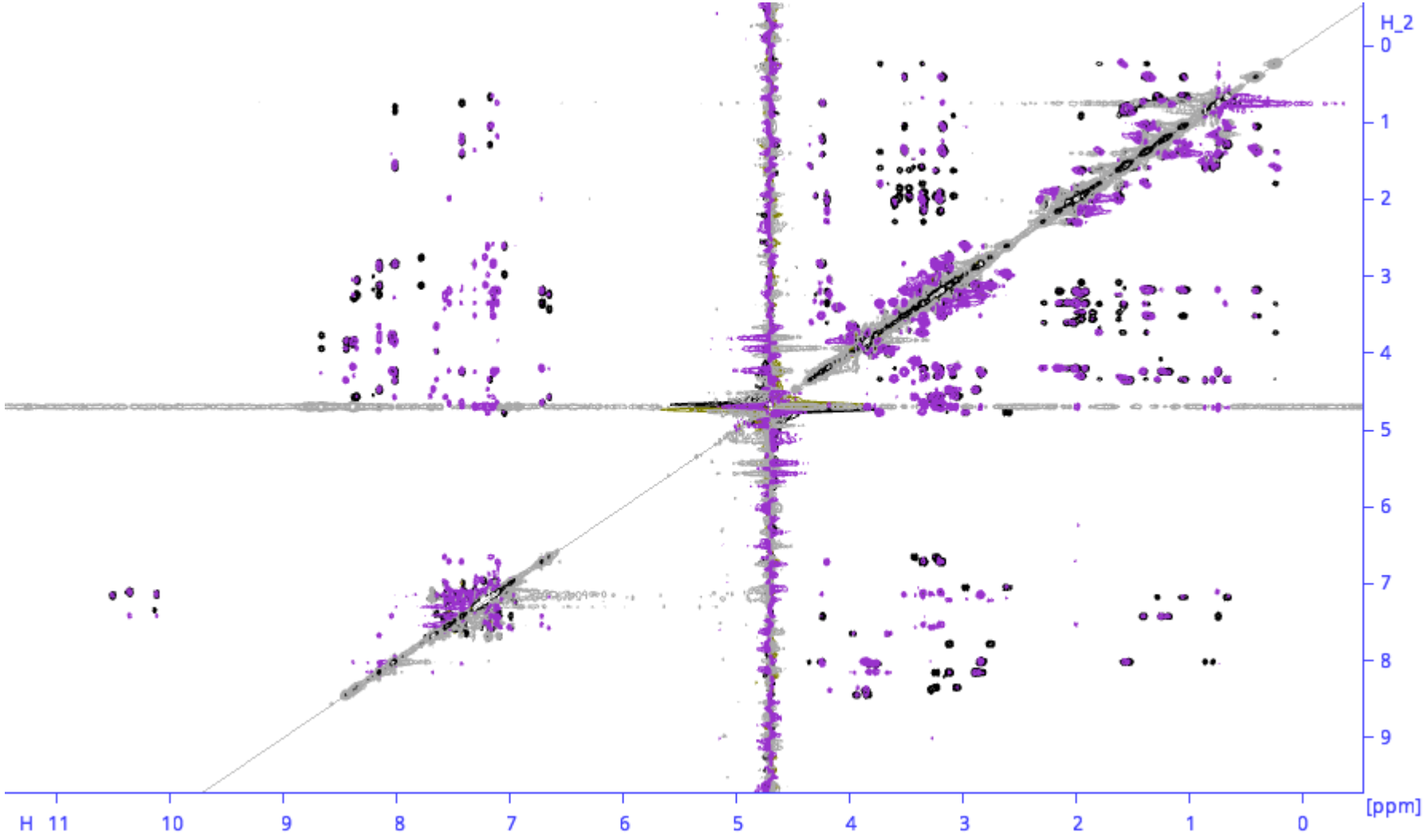
**Espectro de TOCSY do cPaT-2**



**Espectro de ROESY do cPaT-2**



**Mescla dos espectros de TOCSY e ROESY do cPaT-2**



**Espectro de HSQC do cPaT-2**

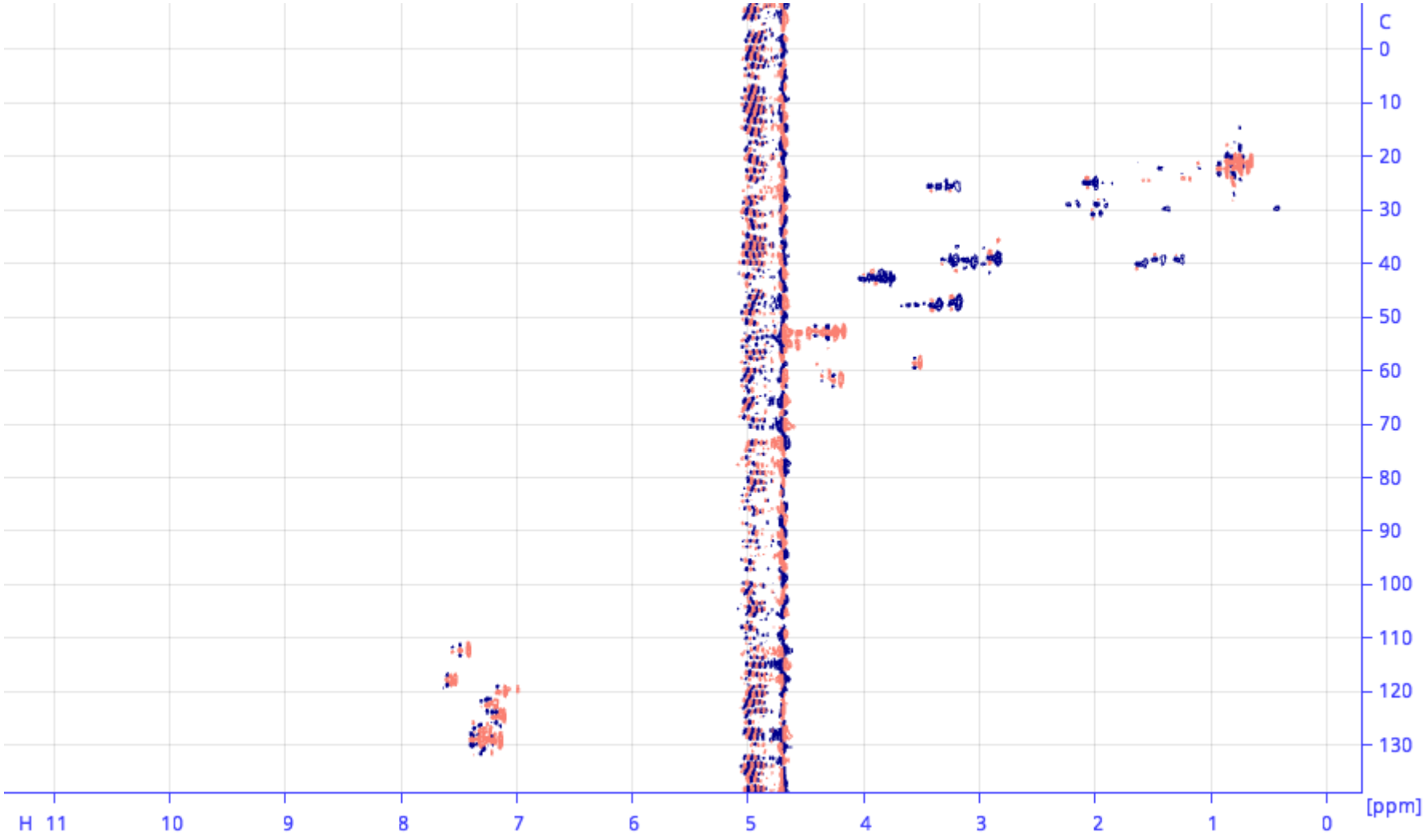
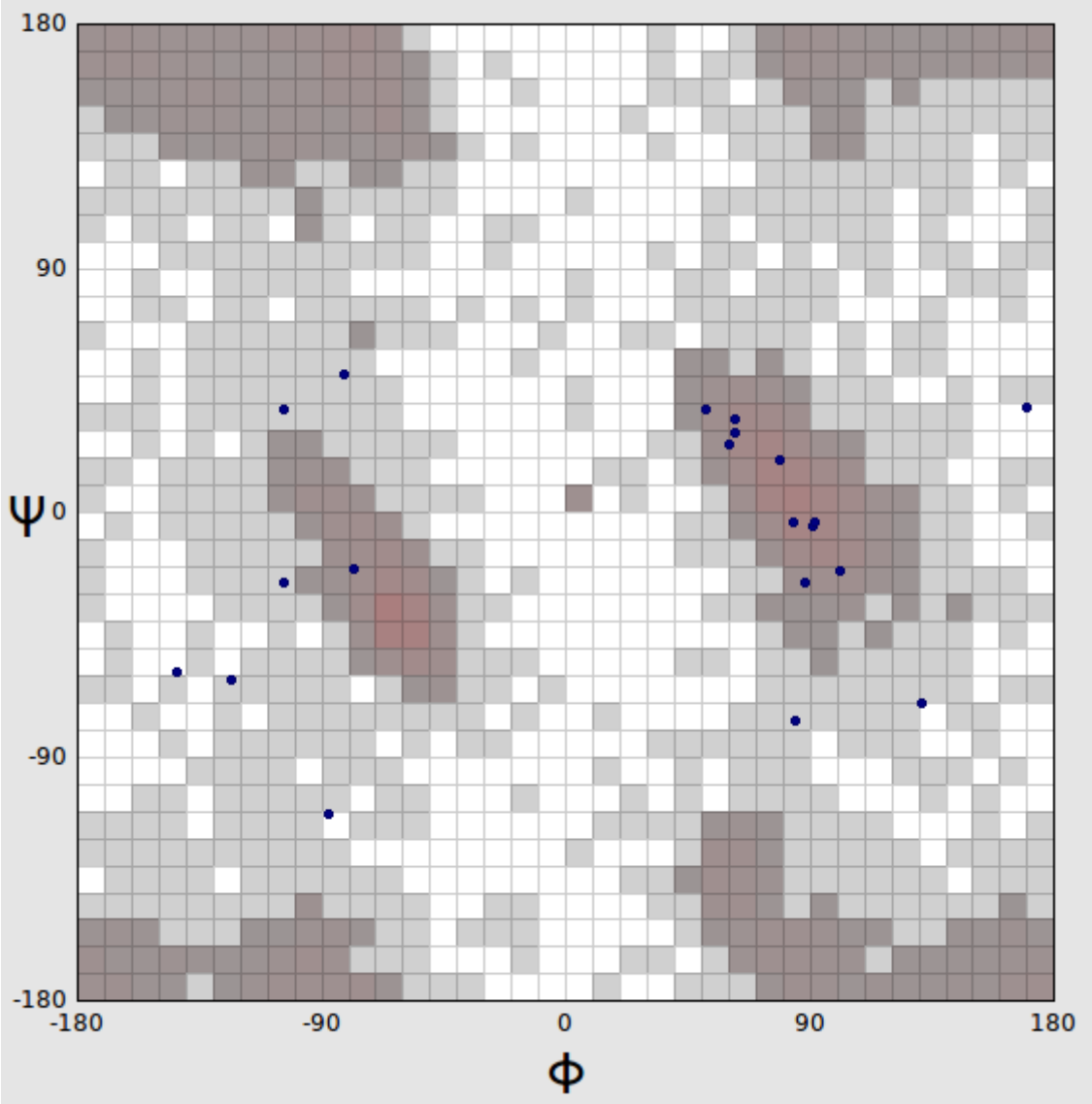


**Gráfico de Ramachandran para os resíduos de Glicina nas estruturas calculadas do cPaT-2**



**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 22 de Dezembro de 2024
Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: _____

Programa: Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ)

Nome completo: Andréa Ferraz de Oliveira

Título do Trabalho: Síntese, caracterização estrutural e avaliação de atividade antioxidante de análogos cíclicos de triptofilina

Nível: (X) Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Dr. Guilherme Dotto Brand