



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Daniela Amado Santos

**ESTUDO DA VARIAÇÃO CONFORMACIONAL DO
PEPTÍDEO *CHIGNOLIN* INDUZIDA POR SALTO DE
PH**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal, orientada pelo
Professor Doutor Carlos Alberto Serpa Soares e apresentada ao
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra.

Outubro de 2021

Daniela Amado Santos

**Estudo da variação conformacional do peptídeo
chignolin induzida por salto de pH**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Medicinal**

Orientador: Professor Doutor Carlos Serpa

Outubro de 2021

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Serpa, pelo apoio científico, por toda a ajuda e por todo o otimismo e motivação transmitidos nestes últimos anos. Muito obrigada pelas oportunidades proporcionadas, pelas aprendizagens e pelos diversos ensinamentos fornecidos ao longo de toda esta jornada.

A todo o grupo de Química Medicinal do Laboratório de Fotomedicina e Reatividade, agradeço pelo ambiente de amizade e entreajuda. Ao Fábio agradeço toda a disponibilidade para me ajudar na montagem da PAC e na resolução dos vários problemas que foram aparecendo. Ao Otávio agradeço a ajuda com os cálculos de modelagem molecular. À Maria Inês, Diogo, Amílcar, Tiago e Catarina, um obrigado por me terem recebido tão bem, pela boa disposição e por se disponibilizarem sempre que precisei de ajuda.

Ao grupo do RMNLab, à Zaida, Pedro e Jaime, agradeço a ajuda com as experiências de CD, em especial à Zaida pela disponibilidade e apoio durante este caminho.

Aos amigos que o Departamento de Química me deu um grande obrigado. À Cindy e à Carolina obrigada por estarem sempre lá durante a licenciatura, que continuemos a ir a mais concertos, queimas e a fazer viagens juntas. À Inês, a minha companheira de cinema, agradeço todos os momentos de amizade e por teres sempre as palavras certas para me dizer. Obrigado também ao resto da Última Ceia, Daniel, Gonçalo e Márcia, por tudo aquilo que passámos juntos e essencialmente por me fazerem rir a toda a hora. Ao Alexandre e ao Vitaliy pelas conversas e discussões trocadas entre cafés e lanches no BM.

Às minhas amigas de Pereira, Maria, Ana, Adriana, agradeço por me distraírem sempre que precisava e por tudo o que já passámos juntas. Obrigada pelos cafés no Urbanidades, pelos jantares, pelas caminhadas, que continuemos unidas por muitos mais anos.

À minha Família por todo o apoio que me deram ao longo da minha vida. Aos meus pais, agradeço por me deixarem sempre seguir os meus sonhos e por garantirem sempre que nada me faltasse e acima de tudo obrigada pela paciência que tiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida académica. Ao meu irmão agradeço pelas nossas parvoíces e por ser muitas das vezes a minha voz da razão. Aos meus avós um grande obrigado, uma parte da pessoa que sou hoje devo-vos a vocês, ao meu

avô que apesar de já não estar cá fisicamente, estará de certeza do outro lado a celebrar esta conquista.

Índice

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xi
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
Capítulo 1: Introdução	1
1. O <i>FOLDING</i> PROTEICO.....	3
1.1. Principais forças não covalentes importantes na estabilidade de proteínas.....	5
1.2. Estrutura secundária.....	7
1.3. O papel dos aminoácidos ionizáveis no <i>foldi</i> ng proteico.....	14
1.4. Triptofano	17
1.5. Modelos de aminoácidos Ac-Tyr-NH ₂ e Ac-Trp-NH ₂	17
2. O PEPTÍDEO <i>CHIGNOLIN</i>	18
2.1. Estrutura	18
2.2. Folding, refolding e unfolding.....	21
3. CALORIMETRIA FOTOACÚSTICA RESOLVIDA NO TEMPO	24
3.1. Salto de pH induzido por laser	24
3.2. Efeito Fotoacústico	25
3.3. Análise de dados	25
4. DICROÍSMO CIRCULAR.....	30
4.1. CD no UV-longínquo.....	31
4.2. CD no UV-próximo	33
5. MODELAGEM MOLECULAR.....	34
Capítulo 2: Materiais e Métodos	37
1. DICROÍSMO CIRCULAR	39
2. CALORIMETRIA FOTOACÚSTICA	40
2.1. Preparação das amostras	40
2.2. Montagem experimental de PAC.....	40
3. CÁLCULOS DE MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA ESTRUTURAL EM pH 4,5 E pH 11	42

Capítulo 3: Análise e Discussão de Resultados	43
1. DICROÍSMO CIRCULAR.....	45
2. REFERÊNCIA FOTOACÚSTICA	48
3. SOLUÇÃO DE <i>o</i> -NBA:.....	50
3.1. Influência do pH.....	50
3.2. Salto de pH induzido por laser.....	53
4. SOLUÇÃO DE <i>o</i> -NBA E Ac-Tyr-NH ₂	56
4.1. Estudos com um transdutor de 2,25 MHz:.....	58
4.2. Estudos com um transdutor de 1 MHz:.....	62
5. SOLUÇÃO DE <i>o</i> -NBA E <i>CHIGNOLIN</i> : Protonação da cadeia latera da Tyr2.....	68
6. Solução de <i>o</i> -NBA e Ac-Trp-NH ₂	73
7. <i>Folding</i> do <i>Chignolin</i>	76
8. Avaliação estrutural teórica.....	81
Capítulo 4: Conclusões e perspectivas futuras	83
Capítulo 5: Referências Bibliográficas	87
Material Suplementar	95

Lista de Figuras

Figura 1: Imagens ilustrativas de paisagens energética em forma de funil. A largura do funil representa a liberdade conformacional da cadeia. (A) Exemplo de uma paisagem energética suave, representativa de um rápido folding proteico; (B) Exemplo de uma paisagem energética rugosa, representativa de um folding mais lento. Adaptado de ²	4
Figura 2: Representação esquemática da estrutura secundária em hélice- α . A linha tracejada indica as ligações de hidrogénio entre os grupos C=O e N-H. Adaptado de ²²	8
Figura 3: Representação esquemática das estruturas secundárias em (A) folha- β antiparalela e (B) folha- β paralela. As linhas tracejadas indicam ligações de hidrogénio entre diferentes cadeias polipeptídicas. Adaptado de ²²	9
Figura 4: Representação segundo um modelo de fitas da arenicina-1 em solução, um peptídeo antimicrobial, cuja estrutura nativa é um gancho- β . PDB ID: 2JSB.....	10
Figura 5: Estrutura da tirosina. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável. 15	
Figura 6: Estrutura do ácido aspártico. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável.....	16
Figura 7: Estrutura do ácido glutâmico. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável.....	16
Figura 8: Estrutura do triptofano.	17
Figura 9: (A) Estrutura da Ac-Tyr-NH ₂ . (B) Estrutura do Ac-Trp-NH ₂	17
Figura 10: Estrutura do peptídeo chignolin. (A) Estrutura da cadeia principal representada por uma fita. As cadeias laterais da Tyr2 e do Trp9 estão representadas por traços e bolas. Adaptado de ⁴⁸ . (B) Interações não covalentes responsáveis por estabilizar a estrutura do peptídeo chignolin. As setas azuis representam as ligações de hidrogénio entre o átomo de hidrogénio ligado ao nitrogénio da cadeia principal e o oxigénio carbonílico (direção da seta). As setas vermelhas representam as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. Adaptado de ¹⁰	20
Figura 11: (A) Estrutura molecular do o-NBA e do (B) ácido o-nitrosobenzóico.	24
Figura 12: Espectro modelo de estruturas hélice- α , folha- β e random coil, na zona do UV-longínquo.....	32
Figura 13: Esquema do equipamento de calorimetria fotoacústica disponível no nosso laboratório. Adaptado de ⁶¹	40
Figura 14: (A) Espectros de CD do peptídeo chignolin na zona do UV-longínquo em solução aquosa com 100 mM de NaCl, a diferentes pH's e a 3°C. Os espectros foram	

recolhidos entre os 190 e os 260 nm. (B) Análise das alterações conformacionais do peptídeo em função do pH ao comprimento de onda de 215 e 229 nm.....	45
Figura 15: (A) Espectro de CD na zona do UV-próximo do derivado de tirosina, Ac-Tyr-NH ₂ , e (B) do peptídeo chignolin em solução aquosa com 100 mM de NaCl, a diferentes pH's e a 3°C. Os espectros foram recolhidos entre os 260 e os 320 nm.	47
Figura 16: Dependência das ondas acústicas da púrpura de bromocresol (BP) da temperatura, após irradiação a 355 nm e utilizando um transdutor de (A) 2.25 MHz (A temperatura variou entre os 30°C e os 0°C) e (B) um transdutor de 1 MHz (A temperatura variou entre os 20°C e os 0°C).....	48
Figura 17: Ondas fotoacústicas do composto de referência em 100 mM de NaCl (onda a preto) e em água pura (onda a vermelho), a uma temperatura de 10°C e utilizando o transdutor de 2.25 MHz.	49
Figura 18: Comparação entre os valores teóricos do parâmetro (β/C_{pp}) para a água pura e a intensidade relativa do sinal fotoacústico calculada experimentalmente a diferentes temperaturas entre os 30°C e os 0°C.	50
Figura 19: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA em 100 mM de NaCl a diferentes pH's iniciais obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta=0} = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ e foi utilizado um transdutor de 2,25 MHz.....	51
Figura 20: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de aproximadamente 1,3 mJ para a molécula de o-NBA a pH 11 e utilizando um transdutor de 2,25 MHz. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do fotoácido e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH ⁻ , representada a tracejado azul escuro.....	53
Figura 21: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e Ac-Tyr-NH ₂ em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas, utilizando um transdutor de (A) 2,25 MHz e outro de (B) 1MHz. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e Ac-Tyr-NH ₂ foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta=0} = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ.	57
Figura 22: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,5 mM de Ac-Tyr-NH ₂ a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem	

como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas da Ac-Tyr-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, representada a tracejado azul escuro. 58

Figura 23: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de protões do modelo Ac-Tyr-NH₂, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) das constantes de velocidade totais em função da concentração de aceitadores de protões. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH⁻ e pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, em função da concentração de grupos aceitadores de protões da Ac-Tyr-NH₂. 60

Figura 24: (A) Concentração de Tyr⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr⁻, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr⁻ que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. 61

Figura 25: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H₂O formada. 62

Figura 26: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,35 mM de Ac-Tyr-NH₂ a pH 11, (A) utilizando um decaimento exponencial e (B) utilizando dois decaimentos. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas da Ac-Tyr-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. No caso do gráfico (B), esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, representada a tracejado azul escuro. 63

Figura 27: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de protões do modelo Ac-Tyr-NH₂, utilizando um transdutor de 1 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-

NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha preta correspondente aos valores obtidos com um decaimento exponencial e linha azul correspondente aos valores obtidos com dois decaimentos exponenciais) das constantes de velocidade totais em função da concentração de aceitadores de protões. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH⁻ e pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, em função da concentração de grupos aceitadores de protões da Ac-Tyr-NH₂. Os quadrados pretos são representativos dos valores obtidos com um decaimento exponencial, enquanto que os triângulos azuis representam os valores obtidos com dois decaimentos exponenciais. 66

Figura 28: (A) Concentração de Tyr⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr⁻, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr⁻ que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 1 MHz..... 67

Figura 29: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H₂O formada. 67

Figura 30: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e do peptídeo chignolin em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura T_{β≠0} = 6,0°C, enquanto que as ondas de o-NBA e de chignolin foram obtidas a uma temperatura T_{β=0} = 1,80°C. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ. 68

Figura 31: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,5 mM de chignolin a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do peptídeo e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral do resíduo Tyr2 presente no peptídeo, representadas a tracejado azul escuro..... 69

Figura 32: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de protões do peptídeo chignolin, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral destes grupos aceitadores de protões foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) das constantes de velocidade totais em função da concentração de

aceitadores de prótons. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH^- e pela protonação da cadeia lateral de Tyr2, em função da concentração de grupos aceitadores de prótons..... 71

Figura 33: (A) Concentração de Tyr2⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de chignolin, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de chignolin que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 2,25 MHz..... 72

Figura 34: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H_2O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral da Tyr2 calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H_2O formada..... 73

Figura 35: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e Ac-Trp-NH₂ em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e Ac-Trp-NH₂ foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta = 0} = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ. 74

Figura 36: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 2 mM de Ac-Trp-NH₂ a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do Ac-Trp-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH^- , representada a tracejado azul escuro..... 75

Figura 37: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e do peptídeo chignolin em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e de chignolin foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta = 0} = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ. 77

Figura 38: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,35 mM de chignolin a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do peptídeo e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, a primeira associada ao processo de fotólise do o-NBA, à protonação de OH^- e da cadeia lateral

da Tyr2 (tracejado verde) e a segunda associada a um rearranjo estrutural do peptídeo (tracejado azul escuro). 78

Figura 39: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração do peptídeo chignolin, utilizando um transdutor de 1 MHz. A vermelho encontra-se o ajuste exponencial efetuado pelo programa OriginProLab. (B) Extrapolação da variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração do peptídeo chignolin, utilizado a equação do ajuste obtida no gráfico anterior..... 80

Figura 40: Variação do volume da solução provocada pelo rearranjo conformacional do peptídeo chignolin em função da sua concentração, utilizando um transdutor de 1 MHz. 81

Figura 41: (A) Sobreposição da estrutura do peptídeo chignolin em pH 4,5 e 11 (laranja claro e cinza, respetivamente) após minimização de energia estrutural pelo programa Spartan'18. O valor de RMSD e os valores de energia são correspondentes a menor energia estrutural em cada pH. Para melhor visualização os hidrogénios foram omitidos. Análise estrutural do peptídeo chignolin em (B) pH 4,5 e (C) pH 11, destacando em laranja e cor-de-rosa os resíduos de tirosina e triptofano, respetivamente, enquanto o resíduo da prolina e a ligação C=O da cadeia principal da glicina estão representados a amarelo. 82

Lista de Tabelas

Tabela 1: Velocidade de formação de diferentes ganchos- β	13
Tabela 2: Valores de pKa da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos ionizáveis ⁴⁹	14
Tabela 3: Análise da estrutura secundária dos espectros de CD no UV-longínquo adquiridos ao peptíd chignolin eo chignolin chignolin através do servidor online BeStSel (Beta Structure Selection, http://bestsel.elte.hu/index.php).	46
Tabela 4: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA em 100 mM de NaCl, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. 51	
Tabela 5: Determinação da magnitude do salto de pH.	55
Tabela 6: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tyr-NH ₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.	59
Tabela 7: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tyr-NH ₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz. Estes resultados foram obtidos recorrendo a apenas um decaimento exponencial.....	64
Tabela 8: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tyr-NH ₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz. Estes resultados foram obtidos recorrendo a dois decaimentos exponenciais, onde nenhuma componente foi fixada.....	65
Tabela 9: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Chignolin em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.	70
Tabela 10: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tpr-NH ₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.	75
Tabela 11: Resultados da desconvulsão dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e chignolin em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz.	79

Lista de Abreviaturas e Símbolos

MD – Dinâmica molecular (do inglês *molecular dynamics*)

Asp – Ácido aspártico

Glu – Ácido glutâmico

Tyr – Tirosina (do inglês *tyrosine*)

Trp – Triptofano

Pro – Prolina

CD – Dicroísmo circular (do inglês *circular dichroism*)

TR-PAC – Calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (do inglês *time-resolved photoacoustic calorimetry*)

RMN – Ressonância magnética nuclear

pK_a - Constante de dissociação de um ácido

o-NBA – *orto*-Nitrobenzaldeído

BP – (do inglês *bromocresol purple*)

β – Coeficiente de expansão térmica

C_p – Capacidade calorífica

ϕ – Rendimento quântico

τ – Tempo de vida

RESUMO

O estudo de pequenos peptídeos tem vindo a mostrar-se bastante relevante para uma melhor compreensão do processo de *folding* (enrolamento) proteico, pois estes pequenos fragmentos podem ser fulcrais na condução deste processo de enrolamento. Assim, estas sequências de aminoácidos podem ser retiradas de proteínas e realizar o seu *folding* numa solução aquosa e conseqüentemente adquirir a sua estrutura nativa típica. Além disso, são também bastante importantes para o estudo de colapsos hidrofóbicos, da formação de pontes de hidrogénio intramoleculares e para o estudo do empacotamento de cadeias laterais. Motivos como hélices- α e ganchos- β são muitas vezes utilizados nesta área da ciência, sendo que estes últimos são os mais simples de caracterizar.

O peptídeo *Chignolin* é a estrutura mais pequena em gancho- β conhecida que é solúvel em água. É constituído por 10 resíduos de aminoácidos (GYDPETGTWG) e embora ainda não se conheça bem a sua cinética de *folding* julga-se que esta ocorra numa escala de nano ou microssegundos. No entanto a ordem em que estes acontecimentos ocorrem gera bastante controvérsia dentro da comunidade científica.

Com o objetivo de estudar o papel de aminoácidos ionizáveis nas alterações conformacionais do peptídeo, pretende-se utilizar as técnicas de dicroísmo circular (CD), calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (TR-PAC) e mecânica molecular. A combinação destas técnicas contribuirá para o aprofundamento do conhecimento do mecanismo de refolding da *chignolin*, nomeadamente no que concerne à sua cinética.

ABSTRACT

The study of small peptides has revealed itself highly relevant for a better understanding of the protein folding process, since these small fragments can be crucial in driving this folding process. Thus, these amino acid sequences can be removed from proteins and perform their folding in aqueous solution and consequently acquire their typical native structure. Moreover, they are also quite important for the study of hydrophobic collapses, the formation of intramolecular hydrogen bridges and for the study of side-chain packing. Motifs such as α -helices and β -hairpins are often used in this area of science, the latter being the simplest motif to characterise.

The *Chignolin* peptide is the smallest known β -hairpin structure that is soluble in water. It consists of 10 amino acid residues (GYDPETGTWG) and although its folding kinetics are not yet well known it is thought to occur on a nano or microsecond timescale. However, the order in which these events occur is quite controversial within the scientific community.

In order to study the role of ionizable amino acids have in the conformational changes of the peptide, we intend to use the techniques like circular dichroism (CD), time-resolved photoacoustic calorimetry (TR-PAC) and molecular mechanics. The combination of these methods will contribute to a better understanding of *chignolin's* refolding mechanism, particularly with respect to its kinetics.

Capítulo 1: **Introdução**

1. O *FOLDING* PROTEICO

Atualmente sabe-se que se encontram disponíveis na natureza um total de 20 aminoácidos, designados de aminoácidos principais, sendo que estes são as moléculas que se encontram na base da constituição de um peptídeo ou de uma proteína, possuindo a designação de subunidades monoméricas. Proteínas são biomoléculas compostas por uma cadeia de aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas (ligações covalentes) que adquirem uma determinada estrutura consoante um elevado número de fatores.

A sequência linear de aminoácidos referida anteriormente representa a chamada estrutura primária de uma proteína e é com base nessa mesma sequência, bem como nas propriedades químicas da cadeia lateral desses aminoácidos (polaridade, carga elétrica, aromaticidade, solubilidade), designada de grupo R, no valor dos ângulos torsionais em torno das ligações simples da estrutura covalente e nas características do ambiente químico envolvente (pH, força iónica, temperatura, etc), que a proteína realiza um certo *folding* (enrolamento) que culmina na aquisição da sua estrutura nativa. Consequentemente, fenómenos como a protonação/desprotonação de determinadas cadeias laterais, podem ter um papel fulcral na indução de processos de *unfolding* (desdobramento), que podem ocorrer tanto na escala dos microssegundos como na escala dos nanossegundos, dependendo da estrutura que está a ser estudada. Além disso, a protonação/desprotonação destas cadeias laterais também pode estar relacionada com processos de *refolding* (processos que ocorrem quando uma proteína que se encontra numa conformação menos estável volta a adquirir a sua conformação nativa).

Uma vez que as funções de uma proteína dependem estritamente da sua estrutura tridimensional, a caracterização desta leva a que as suas funções biológicas possam ser desvendadas e compreendidas. Uma grande parte dessa caracterização passa pelo estudo dos processos evolutivos das proteínas, bem como pela compreensão dos seus mecanismos de *folding*. Para tal, é importante que se consiga dar resposta a algumas questões que ainda inquietam os cientistas, tais como questões computacionais, onde ainda existem dificuldades na previsão da estrutura nativa de uma proteína a partir da sua sequência de aminoácidos; questões termodinâmicas do equilíbrio das forças interatómicas, responsáveis pela estrutura da proteína para uma dada sequência de aminoácidos e por fim a questões cinéticas relacionadas com a rápida velocidade do *folding* proteico^{1,2,3}.

Modelos que conseguem fazer previsões quantitativas sobre a influência de certos fatores como o pH, a temperatura, a concentração salina do meio, a sequência de aminoácidos e a topologia da cadeia, na cinética e na termodinâmica do *fold*ing proteico são bastante importantes. De todos os modelos já existentes, o modelo da paisagem energética é aquele que atualmente é considerado o mais relevante^{4,5}. Neste modelo, o estado desnaturado da proteína ocupa um elevado número de estruturas. Estas estruturas polipeptídicas percorrem, posteriormente, com alguma facilidade, inúmeros percursos com o objetivo final de realizar o seu *fold*ing e, conseqüentemente adquirir a sua estrutura tridimensional compacta⁶. Esse percurso é designado de paisagem de energia e até chegar à conformação final, estas moléculas adquirem um conjunto infundável de configurações físicas parcialmente enroladas. Em proteínas pequenas, tipicamente com 60 a 100 resíduos, esta paisagem possui a forma de um funil bem definido (Figura 1 (A)), sendo capaz de representar a seleção evolutiva de sequências polipeptídicas aptas à realização de um *fold*ing rápido e eficaz para um estado nativo singular^{2,7}. Em contrapartida, em proteínas com um maior peso molecular, as paisagens são mais rugosas (Figura 1 (B)), o que leva a que a população nem sempre consiga alcançar o seu estado nativo².

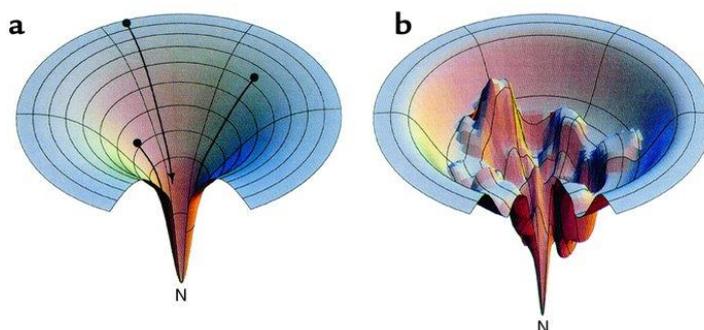


Figura 1: *Imagens ilustrativas de paisagens energética em forma de funil. A largura do funil representa a liberdade conformacional da cadeia. (A) Exemplo de uma paisagem energética suave, representativa de um rápido folding proteico; (B) Exemplo de uma paisagem energética rugosa, representativa de um folding mais lento. Adaptado de ².*

Outro método comumente utilizado na previsão da estrutura de proteínas é o método de montagem de fragmentos. Este método consiste em duas etapas, sendo que a primeira etapa corresponde à preparação de candidatos estruturais fragmentados, que possuem entre 3 a 9 resíduos de aminoácidos e a segunda etapa corresponde a uma geração de estruturas terciárias de proteínas através da montagem desses fragmentos^{8,9}. Para que este estudo seja bem sucedido é

importante que as proteínas geradas possuam alguns "elementos autónomos" (AE do inglês *autonomous elements*), partes de uma proteína natural que possuem elevada "foldabilidade" e que são estabilizadas por interações locais entre aminoácidos que se encontram relativamente próximos uns dos outros¹⁰.

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo das alterações estruturais, particularmente a estrutura secundária, do peptídeo *chignolin* em função do pH. Uma vez que este peptídeo, com um motivo em gancho- β pode ser considerado um elemento autónomo, o seu estudo pode ter um contributo bastante importante na compreensão do *folding* proteico. Todavia, para uma melhor compreensão dos mecanismos de *folding* de proteínas e peptídeos, é importante conhecer o tipo de interações responsáveis por estabilizar a conformação adquirida no final deste processo.

1.1. Principais forças não covalentes importantes na estabilidade de proteínas

1.1.1. Interações de Van der Waals:

As interações de Van der Waals são interações fracas ($0,4-4 \text{ kJmol}^{-1}$) entre átomos ou moléculas que não se encontram ligados covalentemente entre si. Estas interações dependem bastante da distância a que os átomos ou moléculas se encontram um do outro (ocorrem quando estes se encontram a uma distância entre 4 a 6 Å) e podem ser de três tipos: forças de Keesom ou dipolo permanente - dipolo permanente, onde duas moléculas polarizadas interagem entre si devido à diferença inerente na distribuição de cargas; forças de Debye ou dipolo induzido - dipolo permanente, onde uma molécula com um dipolo permanente induz uma redistribuição da carga nas moléculas ou átomos vizinhos que não possuíam nenhum momento dipolar e forças de dispersão de London ou dipolo induzido - dipolo induzido, onde as flutuações na nuvem eletrónica de moléculas ou átomos levam a uma alteração temporária na distribuição das suas cargas, induzindo conseqüentemente a formação de um dipolo temporário nas moléculas ou átomos vizinhos¹¹. Todas elas possuem um papel importante na determinação do empacotamento do interior hidrofóbico das proteínas.

1.1.2. Interações electrostáticas:

Interações eletrostáticas ocorrem em grupos químicos que possuem carga elétrica. São exemplos de interações electrostáticas as pontes de hidrogénio e as interações iónicas entre grupos de cargas opostas, como é o caso das cadeias laterais de aminoácidos ou dos terminais amino e carboxilo de proteínas.

Inúmeros estudos indicam que ligações electrostáticas entre cadeias laterais de aminoácidos possuem um papel fundamental nas propriedades cinéticas e termodinâmicas das proteínas^{12,13,14} e que estas interações podem ser estabelecidas tanto à superfície da molécula, como no seu interior. No entanto, as interações iónicas entre resíduos de aminoácidos que se encontram no interior da proteína são mais fortes, uma vez que nesse meio a constante dielétrica é mais baixa. Mesmo não sendo muito frequentes, podem conduzir ao aumento da estabilidade conformacional de uma proteína, otimizando as interações coulombicas entre os grupos carregados no interior da mesma¹⁵.

1.1.3. Pontes de hidrogénio

As pontes de hidrogénio são um tipo de interação inter- ou intramolecular que ocorre entre átomos de hidrogénio de uma molécula e átomos de elementos altamente eletronegativos, como é o caso do oxigénio, flúor e nitrogénio, de forma a que o hidrogénio sirva como um elo entre os átomos com os quais interage. São interações bastante fortes ($20-25 \text{ kJmol}^{-1}$)¹⁶, quando comparadas com interações de Van der Waals e encontram-se abundantemente presentes em proteínas, uma vez que estas possuem um grande número de grupos que podem formar pontes de hidrogénio entre si, como por exemplo grupos carbonilo, amida, amino, tanto da cadeia peptídica como da cadeia lateral. Estas ligações também dependem imenso do ângulo formado pelos três átomos envolvidos¹⁷.

1.1.4. Entropia configuracional:

A entropia configuracional está relacionada com o número de graus de liberdade acessíveis à cadeia polipeptídica no estado desenrolado, relativamente à estrutura nativa da proteína. Portanto, tanto a internalização das cadeias laterais de uma determinada proteína, bem como a estruturação da sua cadeia principal e consequente aquisição de uma conformação nativa, originam uma diminuição da entropia configuracional da biomolécula. No entanto, esta diminuição é mais evidente no primeiro caso, uma vez que as cadeias laterais possuem uma elevada liberdade conformacional. Tendo esta informação em consideração, proteínas de maiores dimensões, ao internalizarem um maior número de cadeias laterais, sofrem uma maior diminuição de entropia configuracional por resíduo. Além disso, a composição em aminoácidos de uma dada proteína também tem bastante influência no valor da entropia configuracional da mesma. Por exemplo, uma proteína com muitos resíduos de prolina possui pouca liberdade conformacional na sua forma desenrolada, sendo por isso mais estável na sua estrutura nativa¹⁸.

1.1.5. Efeito hidrofóbico:

O efeito hidrofóbico pode ser definido como a tendência que substâncias apolares têm para agregar quando se encontram em solução aquosa, formando um núcleo hidrofóbico isento de moléculas de água. Este efeito é assim considerado a força motriz no processo inicial de aquisição da estrutura tridimensional de uma proteína, levando a que ocorra uma variação positiva da entropia, consequente do aumento dos graus de liberdade das moléculas de água que se encontravam no quelato em torno dos aminoácidos apolares expostos ao solvente no estado desenrolado e que foram libertadas em consequência do *fold*ing proteico¹⁹.

1.2. Estrutura secundária

Uma maneira de tentar combater os três problemas anteriormente mencionados (previsão da estrutura de proteínas, termodinâmica e velocidade do *fold*ing) passa pela divisão do processo de *fold*ing em vários eventos elementares, que podem ser estudados recorrendo a modelos adequados. Durante este processo, dá-se a formação de vários elementos de estrutura secundária, definida como o arranjo

especial de resíduos de aminoácidos vizinhos na cadeia polipeptídica, onde o aparecimento de unidades conformacionais regulares ou repetidas, estabilizadas pelas forças não covalentes abordadas no subcapítulo anterior, origina diferentes conformações. Hélices- α e estruturas- β são os exemplos mais comuns de estruturas secundárias. O facto de estas moléculas serem bastante simples e pequenas e o seu *folding* dar origem a uma estrutura bem definida, faz com que sejam modelos ideais para estes estudos cinéticos e termodinâmicos²⁰.

1.2.1. Conformações em hélice- α

A hélice- α (Figura 2) foi descoberta no ano de 1951, por Linus Pauling²¹ e é caracterizada pela sua estrutura em espiral. Pode orientar-se tanto para a esquerda (*left-handed*), como para a direita (*right-handed*), no entanto esta última é a orientação mais comum em proteínas naturais. A sua estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio entre o oxigénio carbonílico do resíduo i e o átomo de hidrogénio que se encontra ligado ao nitrogénio do resíduo $(i + 4)$ da cadeia principal. Por sua vez, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam esta estrutura secundária, encontram-se projetados para fora e para baixo da hélice, evitando que ocorra qualquer tipo de impedimento estérico. O interior da hélice é altamente compacto e os átomos encontram-se ligados por interações de Van der Waals²².

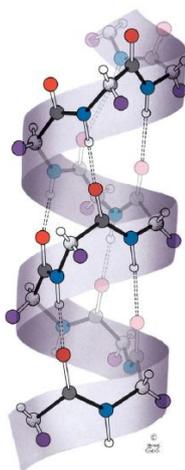


Figura 2: Representação esquemática da estrutura secundária em hélice- α . A linha tracejada indica as ligações de hidrogénio entre os grupos C=O e N-H. Adaptado de ²².

Um dos primeiros motivos a ser descrito foi o peptídeo-C, que se encontra presente no terminal N da ribonuclease A (RNase A). Esta molécula possui uma estrutura em hélice- α quando se encontra em solução aquosa e é devido a interações entre as suas cadeias laterais de aminoácidos (interações iónicas e de dipolo-dipolo) que este peptídeo é bastante estável²³. Outros estudos afirmam que outros motivos em hélice- α também são maioritariamente estabilizados por estas interações²⁴. O tempo de *folding* estimado para estes motivos varia entre os 100 e 500 ns, dependendo sempre da temperatura a que o processo ocorre, do tamanho do peptídeo em questão, bem como da sequência de aminoácidos que o constitui^{25,26,27,28}.

1.2.2. Conformações em folha- β

Tal como a hélice- α , a folha- β também foi descoberta em 1951 por Pauling e Corey²⁹. Estas folhas são formadas a partir de várias cadeias “estendidas” de aminoácidos que se encontram unidas entre si através de ligações de hidrogénio, podendo ser de três tipos: folhas- β antiparalelas (Figura 3 (A)), onde as cadeias- β encontram-se em direções opostas e as pontes de hidrogénio orientam-se perpendicularmente a estas; folhas- β paralelas (Figura 3 (B)), onde as cadeias- β encontram-se na mesma direção e as pontes de hidrogénios possuem uma orientação oblíqua relativamente a estas cadeias e folhas- β mistas. Enquanto que as folhas- β paralelas podem formar cinco ou mais cadeias- β , as folhas- β antiparalelas podem ser constituídas apenas por duas cadeias- β . Além disso, podem apresentar uma face hidrofílica, que interage com o solvente e uma face hidrofóbica, que se encontra direcionada para o interior da proteína.

A ligação entre duas cadeias antiparalelas pode ser apenas um pequeno *turn- β* ou *loop*, enquanto que a ligação entre duas cadeias paralelas normalmente é uma ligação cruzada que se encontra fora do plano da folhas- β ²².

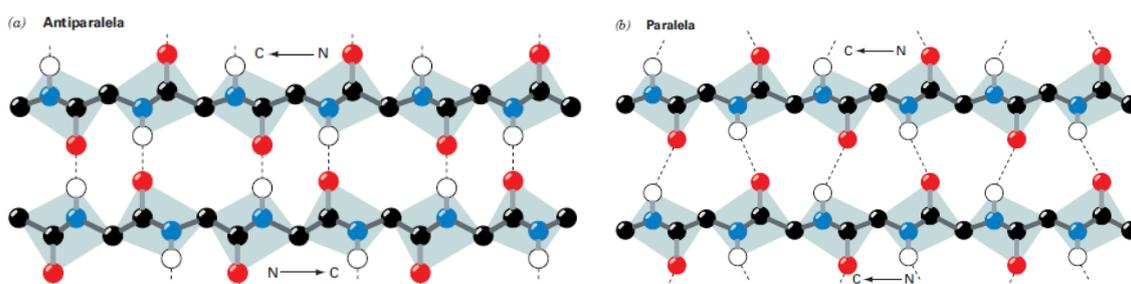


Figura 3: Representação esquemática das estruturas secundárias em (A) folha- β antiparalela e (B) folha- β paralela. As linhas tracejadas indicam ligações de hidrogénio entre diferentes cadeias polipeptídicas. Adaptado de ²².

1.2.3. Gancho- β

A estrutura em gancho- β é considerada uma estrutura super-secundária. Estas estruturas são arranjos espaciais formados por associação de elementos de estrutura secundária adjacentes na cadeia peptídica. Estes elementos podem estabelecer várias interações, levando à formação de motivos estruturais estáveis e independentes.

O gancho- β é a unidade de folha- β mais pequena e mais simples a existir em sistemas biológicos, sendo formado por duas cadeias- β antiparalelas que se encontram ligadas por um *turn*- β curto (Figura 4). Por norma, um *turn* é a região de uma proteína onde existem ligações de hidrogénio entre o grupo C=O do resíduo i e o grupo N-H do resíduo $(i + 3)$, sendo que na maioria das proteínas globulares, estas regiões representam cerca de 30% da estrutura global das proteínas. Embora possam incorporar resíduos catalíticos essenciais, os *turns* possuem um papel importante no reconhecimento entre moléculas. A maioria destes *turns* encontra-se na superfície de proteínas, formando muitas das vezes locais de ligação e reconhecimento. As imunoglobulinas e as proteínas de ligação ao DNA (DNA-binding proteins) são dois exemplos bem conhecidos, onde *turns* funcionam como locais de reconhecimento³⁰.



Figura 4: Representação segundo um modelo de fitas da arenicina-1 em solução, um peptídeo antimicrobial, cuja estrutura nativa é um gancho- β . PDB ID: 2JSB

Apesar de possuírem um tamanho reduzido (normalmente entre 12 a 16 resíduos), existem muitos ganchos- β que exibem propriedades típicas de proteínas globulares, como é o caso do gancho- β que deriva do terminal C da proteína GB1. Este é constituído por 16 resíduos e possui um núcleo hidrofóbico e transições térmicas cooperativas *foldings-unfoldings*^{31,32,33}. Os ganchos- β podem ainda comportar-se como locais de nucleação em etapas iniciais do *foldings* proteico³⁴. Assim sendo, este motivo tem sido cada vez mais utilizado para investigar os fatores que conduzem a estabilidade conformacional, bem como os mecanismos de *foldings* de folhas- β . Enquanto que existem bastantes estudos teóricos e computacionais cujo objetivo passa por compreender estes mecanismos (questões cinéticas e termodinâmicas)^{31,35-37}, só em 1997, com o desenvolvimento de técnicas capazes de detetar tempos na

ordem dos nanossegundos³², é que foram realizados os primeiros estudos cinéticos experimentais com estes motivos.

Muñoz et al.³² foram os responsáveis pela realização destes estudos, onde estudaram o *fold*ing do gancho- β que deriva do terminal C da proteína GB1. Esta experiência teve por base a medição da curva térmica de *un*folding deste peptídeo entre os 273 e os 363 K e a medição da cinética de relaxamento após a indução de um salto de temperatura (a variar entre os 288 e os 328K) por parte de um laser de nanossegundos, tendo sido demonstrado que a uma temperatura de 297 K, o peptídeo realiza o seu *fold*ing num período de tempo de 6 μ s. Esta técnica baseia-se na rápida perturbação da temperatura do sistema e consequente perturbação do equilíbrio que existe entre o estado dobrado e o estado desdobrado do peptídeo (para um cenário de dois estados). A taxa de relaxamento medida para a nova posição de equilíbrio contém contribuições tanto de *fold*ing como de *un*folding. No entanto, as constantes cinéticas destes dois processos só podem ser determinadas se a constante de equilíbrio correspondente à temperatura final for conhecida, algo que muitas vezes é difícil de determinar com rigor científico.

Como objetivo de tentar compreender qual a sequência de passos que leva à formação de um gancho- β , também desenvolveram um modelo de mecânica estatística (modelo *zipper*)³⁵. Este modelo sugere que o passo inicial é possivelmente a formação do *turn*, seguida da formação de ligações de hidrogénio e por último surgem as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. No entanto, recorrendo a simulações de Monte Carlo multicanónicas, Dinner et al.³¹ propuseram uma ordem de acontecimentos diferente, sugerindo que o primeiro passo é um colapso, seguido da formação de uma parte do núcleo hidrofóbico, sendo que as ligações de hidrogénio só podem ser formadas em passos subsequentes. Este modelo foi designado de modelo do colapso hidrofóbico. Ainda no campo das simulações, Klimov e Thirumalai³⁶ utilizaram o modelo *coarse-grained off-lattice* para estudar o gancho- β da proteína GB1, bem como algumas das suas variantes, tendo concluído que existem vários fatores, tal como a rigidez do *turn* e a posição relativa do *core* hidrofóbico que influenciam a cinética de *fold*ing de ganchos- β . As conclusões destes cientistas suportam o modelo apresentadas por Dinner et al.

Em 2003, Xu et al.³⁷ estudaram a estabilidade térmica e a cinética de *fold*ing de um gancho- β constituído por 15 resíduos de aminoácidos (SESYINPDGTWTVTE), designado peptídeo 1. Para tal, recorreram ao uso da espectroscopia de infravermelho acoplada a um laser capaz de induzir um salto de temperatura, (tal como Muñoz et

al.). Nesta experiência também foi utilizada uma alternativa aos métodos comumente empregados no estudo de propriedades termodinâmicas de folhas- β (Ressonância magnética nuclear, dicroísmo circular e técnicas de fluorescência): Medições de infravermelho no equilíbrio. Este peptídeo segue uma cinética de primeira ordem e o seu *folding* ocorre num tempo de aproximadamente 0,8 μ s, sete a oito vezes mais rápido que o *folding* do gancho- β derivado da proteína GB1. Este tempo pode ser justificado pelo facto de este peptídeo possuir um *turn* comum, que é conhecido na literatura por não conseguir formar estruturas em gancho- β compactas³⁸. Além disso, o peptídeo também possui cadeias laterais bastante flexíveis, que não contribuem para um bom empacotamento. O Trpzip4 e cinco mutantes também foram estudados experimentalmente por Du et al.³⁹. Esta molécula é formada por uma conformação bastante compacta e o seu tempo de *folding* a 300K é de aproximadamente 13 μ s, dezassete vezes mais lento que o *folding* do peptídeo 1, comprovando o facto de que empacotamentos mais compactos estão relacionados com cinéticas de *folding* mais lentas.

Foi também demonstrado que, tal como Klimov e Thirumalai previram através de simulações computacionais, mutações que afetam a força do *cluster* hidrofóbico diminuem a estabilidade térmica do gancho- β , como resultado do aumento da velocidade do processo de *unfolding*. Por outro lado, mutações no *turn*- β que interferem com as pontes de hidrogénio formadas nesta zona, afetam a velocidade do *folding* do peptídeo, sugerindo assim que a formação deste *turn* seja o passo limitante da reação, e, conseqüentemente, uma sequência de aminoácidos mais forte na região do *turn*, pode aumentar a estabilidade de um gancho- β , sobretudo através do aumento da sua velocidade de *folding*, enquanto que um *cluster* hidrofóbico mais forte aumenta a estabilidade de um gancho- β , principalmente através da diminuição da sua velocidade de *unfolding*.

Em 2003, Miksovská et al.⁴⁰ publicaram estudos, onde foram utilizadas as técnicas de PBD (*photothermal beam deflection*) e PAC (calorimetria fotoacústica) para estudar o *unfolding* parcial da apomioglobina, induzido por uma alteração do pH da solução. Em relação a esta última técnica, como irá ser explicado em detalhe no Capítulo 3, após a indução de um salto de pH por parte de um laser de nanossegundos, é possível calcular as constantes cinéticas de *refolding* e/ou *folding* de ganchos- β , bem como as constantes cinéticas da protonação das cadeias laterais dos aminoácidos que se encontram presentes nestes ganchos. É esta reação de protonação, causada por uma acidificação do meio, que provoca um desequilíbrio na estrutura destes ganchos- β . Além disso, também é possível calcular a variação de

volume associada a estes processos, bem como as variações entálpicas que ocorrem quando se faz variar a temperatura da reação. Quando comparada com a técnica de salto de temperatura, esta técnica possui a vantagem de poder ser realizada a uma temperatura fixa e não é necessário recorrer a agentes desnaturantes. No decorrer destas experiências, Miksovská et al. estudaram a cinética da transição da proteína de um estado nativo para um estado intermediário. Assim, identificaram uma primeira expansão volumétrica ($\Delta V = 8,8 \pm 2,3 \text{ ml mol}^{-1}$) como sendo proveniente da fotólise do fotoácido utilizado e da protonação de resíduos de aminoácidos presentes na proteína e um segundo processo correspondente a uma contração de volume ($\Delta V = -22 \text{ ml mol}^{-1}$), que ocorreu num tempo de aproximadamente 620 ns a 20°C, originada pela grande alteração conformacional que a apomioglobina sofreu, após a protonação dos resíduos ionizáveis.

Em 2004, Chen et al.⁴¹ também publicaram estudos, onde foram utilizadas as técnicas de PAC e de laser-*flash* fotólise para estudar o efeito que diferentes *turns*- β têm na cinética de *refolding* de ganchos- β , tendo chegado à conclusão que a alteração de apenas um resíduo na região do *turn*- β pode modificar completamente a estabilidade e a cinética de *refolding* de ganchos- β .

Apesar das incertezas na ordem dos eventos, é unânime que a sequência de aminoácidos, os aminoácidos que se encontram presentes no *turn*, o local relativo do *cluster* hidrofóbico, bem como a rigidez do gancho, possuem uma influência enorme no *fold*ing. Na Tabela 1 pode ser observado um quadro resumo do tempo de *fold*ing de alguns motivos em gancho- β já descritos na literatura.

Tabela 1: Velocidade de formação de diferentes ganchos- β .

Gancho- β	τ_{Folding} (μs)	Referências
DPDP-II (R-Phe-IEVDPGKKFITSDPGKT-Tyr-TE)	0,26	(Xu et al. ⁴²)
Peptídeo 1 (SESYINPDGTWTVTE)	0,8	(Xu et al. 2003 ³⁷)
GB1 (GEWTYDDATKTFTVTE)	6	(Muñoz et al. 1997 ³²)
Trpzip4 (GEWTWDDATKTWTWTE)	13	(Xu et al. 2003 ³⁷)

1.3. O papel dos aminoácidos ionizáveis no *fold*ing proteico

Dentro dos 20 aminoácidos principais, 7 possuem uma cadeia lateral que pode ser ionizável. São eles: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), tirosina (Tyr), arginina (Arg), cisteína (Cys), histidina (His) e lisina (Lys). Tal como mencionado na secção 1.1 deste capítulo, as ligações iónicas que podem ser formadas entre os grupos R destes aminoácidos possuem um papel fulcral na estabilidade de proteínas, sendo que a modulação das cargas destes grupos, através de alterações de pH, pode levar à desnaturação de proteínas^{12,13,14}. Além disso, estes resíduos também podem desempenhar uma função importante na regulação da condensação de proteínas^{43,44}, em interações proteína-proteína⁴⁵ ou em interações proteína-DNA⁴⁶. A média dos valores de pKa para estas cadeias laterais ionizáveis encontram-se apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de pKa da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos ionizáveis⁴⁷.

Aminoácido	pKa (cadeia lateral)
Asp	3,5
Glu	4,2
Tyr	10,3
Arg	12,3
Cys	6,8
His	6,6
Lys	10,5

Para além dos aminoácidos ionizáveis e das pontes salinas que estes podem formar entre si, resíduos polares detêm cargas parciais significativas, podendo assim formar ligações de hidrogénio e outras interações eletrostáticas menos específicas entre si e com os resíduos carregados⁴⁸. Tendo isto em consideração, estudos que instiguem transições de pH são bastante importantes para a caracterização não só das mudanças conformacionais de peptídeos, como também para a caracterização energética e cinética destas reações de protonação e consequente compreensão das primeiras etapas do *fold*ing, *unfold*ing e *refold*ing proteico.

Este trabalho tem como principal objetivo estudar a variação conformacional do *chignolin* induzida por salto de pH, um decapeptídeo que, quando em solução, apresenta uma conformação em gancho- β , um motivo bastante presente nas proteínas do organismo humano, tal como é o caso do peptídeo G e da ubiquitina. O estudo do

chignolin através da indução de um salto de pH é bastante pertinente, pois é um peptídeo que possui na sua constituição três resíduos de aminoácidos ionizáveis (Tyr, Asp e Glu) que se julga que possuam um papel fundamental na aquisição da sua estrutura. Este peptídeo irá ser mencionado em maior detalhe na secção 2 deste capítulo, mas antes disso é importante ter em consideração quais as propriedades físico-químicas destes três resíduos ionizáveis que fazem parte do seu esqueleto.

1.3.1. Tirosina

A tirosina é um aminoácido que possui uma cadeia lateral hidrofóbica (anel aromático) e que, portanto, pode ser enquadrada na categoria de aminoácidos apolares. Além disso, esta molécula possui um grupo hidroxilo (-OH) capaz de formar ligações de hidrogénio com outras moléculas, permitindo-lhe assim atuar como um dos principais grupos funcionais em várias atividades enzimáticas. Este grupo também pode influenciar a polaridade deste aminoácido tornando-o polar em certos ambientes químicos.

Através do seu anel aromático pode estabelecer interações com outros anéis de outros resíduos, nomeadamente com a fenilalanina e com o triptofano, interações estas bastante importantes na estabilidade de proteínas, de onde se destacam interações *edge-to-face*, *face-to-face* e *parallel displace*⁴⁹. A estrutura da tirosina encontra-se representada na Figura 5.

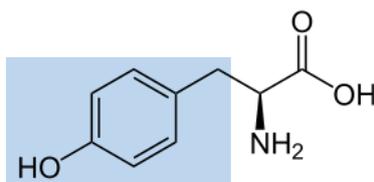


Figura 5: Estrutura da tirosina. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável.

Considerando que um ácido é qualquer molécula que possui a capacidade de libertar protões H⁺ para a solução onde se encontra e que a constante de dissociação de um ácido (pK_a) pode ser referida como valor de pH onde as espécies protonada (carga neutra) e desprotonada (carga negativa) de uma dada molécula se encontram em equilíbrio, quanto menor for o valor do seu pK_a, mais forte será esse mesmo ácido. Assim, ácidos fortes são mais suscetíveis a libertarem protões H⁺. Tendo em conta que o valor do pK_a do grupo R da tirosina é de 10,3, pode-se afirmar que este é um ácido fraco e que a pH's superiores a 10,3, o grupo hidroxilo tem tendência a

encontrar-se maioritariamente na sua forma desprotonada e consequentemente a pH's inferiores a 10,3 o grupo tem tendência a apresentar-se maioritariamente protonado.

A tirosina é caracterizada por absorver luz na região ultravioleta do espectro eletromagnético com um pico característico a 280 nm, sendo assim bastante utilizada na caracterização de proteínas.

1.3.2.Ácido aspártico

Como já foi mencionado anteriormente, a cadeia lateral do ácido aspártico também pode sofrer protonação. Este aminoácido possui propriedades hidrofílicas e o seu grupo R possui um pK_a de aproximadamente 3,5. Normalmente a constante de velocidade para a protonação de um ácido carboxílico é de aproximadamente $2,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e a variação de volume associada a este processo pode variar entre 6 ml mol^{-1} a 17 ml mol^{-1} , dependendo da natureza do grupo que se encontra ligado ao carboxilato^{40,50}. A estrutura do ácido aspártico encontra-se representada na Figura 6.

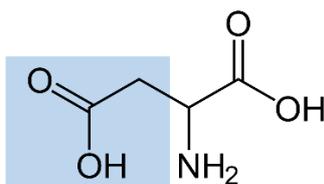


Figura 6: Estrutura do ácido aspártico. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável.

1.3.3.Ácido glutâmico

O ácido glutâmico é também um aminoácido que possui uma cadeia lateral ionizável. Tal como o ácido aspártico possui propriedades hidrofílicas e o seu grupo R possui um pK_a de 4,2. Uma vez que o ácido glutâmico também possui um grupo carboxilo na sua constituição, os valores acima apresentados para as constantes de velocidade de protonação de ácidos carboxílicos ($2,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), bem como a correspondente variação de volume ($6 \text{ ml mol}^{-1} < \Delta V < 17 \text{ ml mol}^{-1}$) também são válidos para este aminoácido. A sua estrutura está presente na Figura 7.

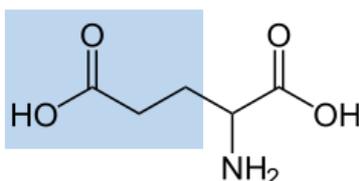


Figura 7: Estrutura do ácido glutâmico. O quadrado azul evidencia a cadeia lateral ionizável.

1.4. Triptofano

O triptofano (Trp) possui na sua cadeia lateral um grupo indol, o que faz dele um resíduo de aminoácido aromático e não polar. Como será abordado em maior detalhe na secção 2 deste capítulo, este aminoácido encontra-se presente no *core* hidrofóbico do peptídeo estudado ao longo deste trabalho e realiza interações hidrofóbicas bastante importantes com um resíduo de tirosina, também presente neste *core*. A sua estrutura encontra-se representada na Figura 8.

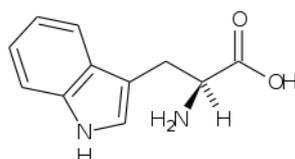


Figura 8: Estrutura do triptofano.

1.5. Modelos de aminoácidos Ac-Tyr-NH₂ e Ac-Trp-NH₂

Considerando que numa proteína os terminais de um dado aminoácido (*i*) se encontram envolvidos em ligações peptídicas com os terminais dos aminoácidos vizinhos (*i*+1 e *i*-1), foram utilizados derivados de aminoácidos como compostos modelo, para que as suas características fossem o mais semelhante possível às características que o resíduo apresenta quando se encontra presente numa cadeia polipeptídica. Neste estudo o composto modelo utilizado na caracterização da reação de protonação da tirosina foi o N-acetil-L-tirosina (Ac-Tyr-NH₂), ou seja, este resíduo foi protegido com grupos acetilo e amina. O mesmo sucedeu como o resíduo triptofano (Ac-Trp-NH₂). As suas estruturas encontram-se representadas na Figura 9.

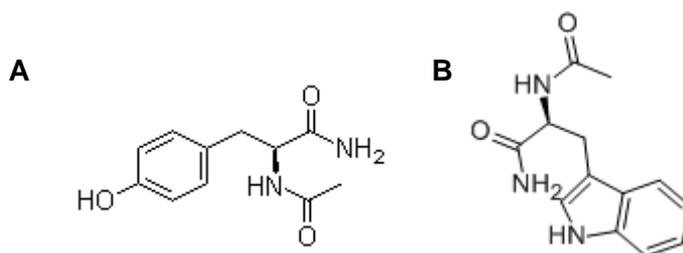


Figura 9: (A) Estrutura da Ac-Tyr-NH₂. (B) Estrutura do Ac-Trp-NH₂

2. O PEPTÍDEO *CHIGNOLIN*

2.1. Estrutura

O *chignolin* é um decapeptídeo (GYDPETGTWG) desenhado por Honda et al.⁵¹. É considerado o gancho- β mais pequeno estável em solução aquosa e na presença de uma dada força iónica e é baseado na parte central do peptídeo GB1, formando um gancho- β idêntico ao peptídeo que lhe serviu de modelo. A sua estabilidade é possível devido a um conjunto de interações não covalentes entre resíduos de aminoácidos que se estabelecem durante o processo de *fold*ing. Além disso, os dois resíduos terminais de glicina funcionam como espaçadores que se destinam a anular qualquer impacto negativo ou positivo das cargas terminais sob os resíduos centrais. O seu *turn*- β é constituído por quatro resíduos (Pro4-Glu5-Thr6-Gly7), fazendo assim com que o *chignolin* seja considerado um gancho- β do tipo 4:4³⁰.

Honda et al.⁵¹ indicam-nos que este peptídeo, quando em solução, encontra-se dissolvido na sua forma monomérica até concentrações aproximadas a 2 mM e que é bastante estável numa vasta gama de temperaturas. Tal como as proteínas globulares, desenrola cooperativamente com a temperatura sem acumular intermediários de equilíbrio. Contudo, uma pequena fração do peptídeo enrolado, continua presente em solução tanto em temperaturas próximas do ponto de ebulição da água, como na presença de elevadas concentrações de desnaturante. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) também sugere que, apesar da estrutura bem definida que adquire em solução aquosa, a pH 5,5, o *chignolin* encontra-se em equilíbrio entre a sua estrutura singular e compacta e uma estrutura desordenada ao acaso (*random coil*).

Interações transversais entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no *chignolin*, principalmente interações hidrofóbicas, e ligações de hidrogénio, possuem um papel crucial na estabilidade deste gancho- β . Uma interação hidrofóbica que aparenta ser bastante importante é a interação entre os resíduos Tyr2 e Trp9. Através de estudos de RMN foram observados 17 NOE's entre estes dois resíduos. A orientação destes aminoácidos, um em relação ao outro, é quase perpendicular (orientação *edge-to-face*) e semelhante ao que acontece em *zippers* de triptofano, ganchos- β de 12 a 16 aminoácidos estabilizados por interações cruzadas Trp-Trp entre as cadeias laterais antiparalelas⁵², sendo que a Tyr2 se encontra nas proximidades da orbital π do anel do Trp9. Além disso, a Tyr2 e o Trp9 também estabelecem uma interação com o resíduo Pro4. No que diz respeito às ligações de

hidrogénio, sabe-se que existe a formação de um *cluster* de pontes de hidrogénio intramoleculares na região do *turn* do gancho. Este *cluster* advém de um efeito cooperativo que aumenta a concentração efetiva de aceitadores de hidrogénio. O(Asp3)—H(Gly7), O(Asp3)—H(Thr8), H(Asp3)—O(Thr8) e N(Glu5)—O^δ(Asp3) são exemplo de ligações de hidrogénio existentes no peptídeo, sendo que resultados computacionais obtidos por Suenaga et al.⁵³ preveem que a primeira ligação seja a mais forte e é a que é formada mais rapidamente. Estes investigadores afirmam também que a formação deste *cluster* é importante para a formação de um elemento autónomo.

Em 2012, com o objetivo de compreender melhor a dinâmica e os mecanismos de formação do *chignolín*, Enemark e Rajagopalan⁵⁴ realizaram simulações de dinâmica molecular com este peptídeo. Para além das interações estudadas por Suenaga et al., mencionadas no parágrafo anterior, Enemark e Rajagopalan realizaram estudos mais aprofundados sobre as interações Tyr2-Trp9, Tyr2-Pro4 e Trp9-Pro4. Estes afirmam que, no estado nativo do peptídeo, as baixas flutuações observadas ao longo do terminal N se devem à posição da cadeia lateral do aminoácido Tyr2 e à sua interação tanto com a cadeia lateral da Pro4, como com a cadeia do Trp9. Apontam também para a existência de uma quinta ponte de hidrogénio, N(Thr6)—O^δ(Asp3), presente em 90% do tempo e que também contribui para a estabilidade do estado nativo e de outras duas ligações de hidrogénio entre a Gly1 e a Gly10, responsáveis por prevenir que os resíduos terminais se “desgastem”. Por fim, é ainda de mencionar que as simulações levadas a cabo por estes investigadores também lhes permitiram identificar dois intermediários estruturais, FI₂ e FI₁.

Poucos anos antes, também foram realizados estudos de CD e RMN onde se substituíram os resíduos de Tyr2 e Trp9 por resíduos de histidina (*chignolinHH*)⁵⁵ e onde se fez variar o pH e o ambiente químico do meio, tendo-se chegado a conclusões importantes. Verificou-se que o peptídeo *chignolinHH* em solução tampão não possui estrutura em folha-β e que, quando é adicionado metanol a este tampão, o peptídeo adquire uma estrutura muito dinâmica, onde coexistem em solução populações de estruturas β e múltiplas estruturas ao acaso. Assim, sem a interação hidrofóbica entre os dois aminoácidos aromáticos, o peptídeo *chignolinHH* adquire uma maior flexibilidade conformacional e a alteração de pH (que faz variar o estado de protonação do resíduo de histidina), bem como do ambiente químico do meio modifica o equilíbrio conformacional entre as populações de estruturas coexistentes.

Mais recentemente, Maruyama e Mitsutake⁵⁶ realizaram cálculos onde identificaram seis estruturas: dois estados nativos (n1 e n2), dois estados *misfolded* (m1 e m2), um intermediário e um estado *unfolded*. Afirmam que os estados m1 e m2 diferem dos estados n1 e n2 principalmente pela existência de diferentes ligações de hidrogénio e pelo posicionamento das cadeias laterais Tyr2 e Trp9, pois nos estados *misfolded* estas encontram-se em posições opostas. Apesar de tudo isto, estes estados também aparentam possuir uma estrutura compacta e estável. Por sua vez, estes investigadores asseguram que o intermediário possui uma forma parcialmente expandida, enquanto que o estado *unfolded* se encontra totalmente expandido e que, ao invés de realizarem ligações de hidrogénio entre si, realizam várias pontes com as moléculas de água circundantes. Estas duas últimas estruturas são bastante instáveis quando comparadas com as estruturas nativas e *misfolded*. Entenda-se por estado *misfolded*, toda a proteína ou peptídeo que realiza um *fold*ing de uma maneira incorreta fazendo com que estas biomoléculas adquiram uma conformação não funcional, tipicamente resistente e que pode estar na origem da formação de agregados amiloides.

O *chignolin* pode, portanto, ser classificado como um gancho- β . A Figura 10 ilustra a estrutura deste peptídeo na sua forma nativa, bem como algumas das interações electrostáticas que os seus resíduos realizam entre si e que foram mencionadas nos parágrafos anteriores.

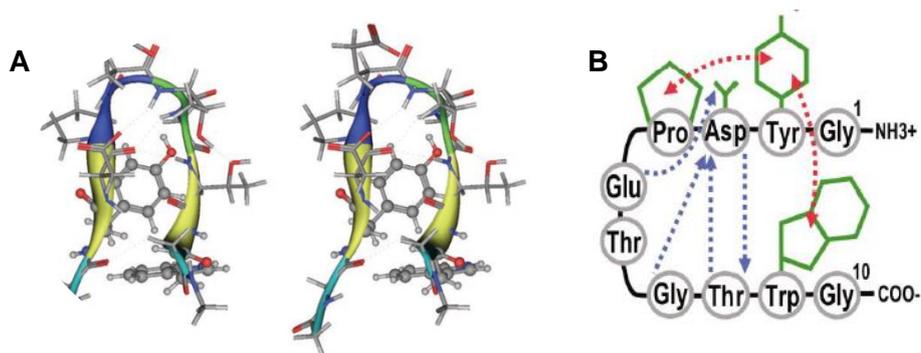


Figura 10: Estrutura do peptídeo chignolin. (A) Estrutura da cadeia principal representada por uma fita. As cadeias laterais da Tyr2 e do Trp9 estão representadas por traços e bolas. Adaptado de ⁴⁸. (B) Interações não covalentes responsáveis por estabilizar a estrutura do peptídeo chignolin. As setas azuis representam as ligações de hidrogénio entre o átomo de hidrogénio ligado ao nitrogénio da cadeia principal e o oxigénio carbonílico (direção da seta). As setas vermelhas representam as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. Adaptado de ¹⁰.

2.2. *Folding, refolding e unfolding*

Como foi discutido na secção 1.2 do Capítulo 1, existem várias simulações de MD que têm como objetivo estudar as várias etapas de *folding* de diversos ganchos- β , de entre os quais se encontra presente o *chignolin*. No entanto, tal como mencionado neste capítulo, ainda não existe um consenso quanto à ordem do *folding* destes peptídeos, uma vez que uma parte da comunidade científica defende o modelo *zipper* de Muñoz et al.^{57,58} e outra parte defende o modelo do colapso hidrofóbico proposto por Dinner et al.

Suenaga et al.⁵³, defendem que o *folding* do *chignolin* ocorre segundo o modelo do colapso hidrofóbico desenvolvido por Dinner et al.³¹. No entanto, Enemark e Rajagopalan⁵⁴ consideram que as simulações desenvolvidas por estes cientistas possuem algumas falhas, tendo apresentado em 2012 outro modelo.

Segundo Suenaga et al.⁵³, a primeira fase do processo de *folding* é um colapso inicial levado a cabo pela diminuição da área de superfície acessível a solventes (SASA) dos resíduos hidrofóbicos e pela diminuição da distância entre os dois resíduos hidrofóbicos (Try2 e Trp9). Este pequeno colapso hidrofóbico é capaz de juntar a cadeia principal. Posteriormente, ocorre a formação do núcleo da estrutura do *turn* nascente na região entre os resíduos 4-7. O fraco empacotamento destas cadeias laterais hidrofóbicas e a formação deste núcleo, foram os responsáveis por conduzir o peptídeo ao seu primeiro colapso. De seguida, é formada um *turn* rígido a partir do *turn* nascente, dá-se a interconversão do empacotamento hidrofóbico e das ligações de hidrogénio entre as duas cadeias antiparalelas. Nesta fase, o peptídeo encontra-se bastante compactado e com uma estrutura muito semelhante à sua estrutura nativa. No entanto, ainda há a formação de um estado *misfolded* (MF1) com um curto tempo de vida (120 a 170 ns em simulações de *folding*), onde os anéis aromáticos dos aminoácidos Tyr2 e Trp9 realizam interações hidrofóbicas atípicas, designadas de interações *face-to-face*. Para que a conformação “escape” a este estado *misfolded*, o peptídeo sofre o *unfolding*, mantendo a sua estrutura compacta. Finalmente, a formação das ligações de hidrogénio, do núcleo hidrofóbico e do empacotamento da cadeia lateral ocorrem simultaneamente. Os dois aminoácidos aromáticos encontram-se numa posição *edge-to-face* e o peptídeo encontra-se na sua conformação nativa. Estes investigadores afirmam ainda que o *turn* entre os resíduos 4 e 7 aparenta ser crucial para a formação do gancho- β , pois depois de ser formado persiste através de simulações de *folding* e *refolding*. Concluem que o *folding* do peptídeo ocorre numa escala de tempo de 0,4 μ s, enquanto que o seu *refolding* ocorre numa escala de tempo de 0,6 μ s. O *unfolding* do *chignolin* é caracterizado por ser o processo inverso

do seu *fold*ing. No entanto, estudos de MD indicam que durante o *un*fold*ing* existe a formação de mais um estado *misfolded* (MF2).

Por sua vez, Enemark e Rajagopalan defendem um modelo intermédio, designado de modelo “*broken-zipper*”. Estes relatam a existência de dois intermediários de *fold*ing (FI) bastante importantes para uma boa compreensão do modelo que propõem. Afirmam que o intermediário FI₂ exibe uma conformação dobrada, com a Gly7 no ápice, permitindo que a Thr8, o Trp9 e a Gly10 formem pontes de hidrogénio não nativas entre si junto ao terminal C do peptídeo. Além disso, este intermediário inclui fases onde as interações Pro4-Trp9 podem originar alguns impedimentos no empacotamento, impossibilitando a Tyr2 de assumir a sua posição nativa. Estas estruturas podem chegar a ter um tempo de vida de aproximadamente 50 ns, o que pode provocar um atraso no *fold*ing, levando à formação de agregados quando o peptídeo se encontra presente em concentrações mais elevadas⁵⁹. Por sua vez, o intermediário FI₁ possui uma estrutura mais próxima da estrutura nativa do *chignolin*. As cadeias laterais Tyr2-Trp9 encontram-se posicionadas em lados opostos na folha-β, três resíduos na região do *turn*-β (Pro4-Glu5-Thr6) encontram-se no seu estado nativo e apesar de existirem algumas pontes de hidrogénio nativas neste intermediário (O(Asp3)—H(Gly7), N(Thr6)—O^δ(Asp3), N(Glu5)—O^δ(Asp3), O^γ(Thr6)—O^δ(Asp3)), também existem algumas ligações não nativas (N(Gly1)—O(Trp9), N(Asp3)—O(Gly7) N(Trp9)—O(Gly1)). Em geral, os estados FI₁ servem de “porta de entrada” para o *fold*ing do peptídeo.

Enemark e Rajagopalan também efetuaram estudos computacionais onde os resíduos de Tyr2 e Trp9 foram substituídos por resíduos de Ala. Estes confirmam que a interação Tyr2-Trp9, apesar da sua importância, não é a principal contribuição na estabilidade do peptídeo e, portanto, o colapso hidrofóbico não será o passo impulsionador deste *fold*ing proteico. Concluíram também que a Tyr2 é um resíduo essencial à estabilidade do terminal N, que a Pro4 auxilia o processo de *fold*ing, na medida em que as restrições conformacionais que esta provoca no Asp3 fazem com que este adquira uma conformação favorável à formação do *cluster* de pontes de hidrogénio e que a interação Tyr2-Pro4, embora relativamente fraca, possa ajudar a manter a estrutura em forma de gancho-β sem o auxílio de interações Tyr2-Trp9. Assim, o empacotamento das cadeias laterais Tyr2-Trp9 podem ser uma etapa final do *fold*ing. No entanto, a instabilidade e a conseqüente falta de contacto Tyr2-Pro4 durante o *fold*ing, abre caminho a interações Pro4-Trp9, que podem atrasar este processo devido às restrições que existem no empacotamento Tyr2-Trp9.

Segundo estes cientistas, a primeira etapa do *fold*ing dá-se com a formação do *turn* Thr6-Glu5 e posterior união do aminoácido Pro4. A formação deste *turn* é acompanhada da formação cooperativa das ligações N(Asp3)-O(Thr8) e N(Glu5)-O^δ(Asp3). De seguida ocorre a formação do *turn* Gly7, aproximando os dois terminais (N e C) e permitindo que ocorra uma interação entre as cadeias laterais Tyr2-Trp9 e a formação das restantes pontes de hidrogénio nativas e não nativas. A primeira a ser formada é a ligação entre a Gly1 e Gly10. O empacotamento das cadeias laterais Tyr2-Trp9 ocorre simultaneamente. Este empacotamento, em vez de originar um colapso hidrofóbico, pode causar um atraso no *fold*ing devido as restrições conformacionais causadas pelas cadeias laterais.

Existem muitas divergências em relação à ordem do *fold*ing e apesar de a maioria dos investigadores afirmarem que este processo ocorre numa escala de tempo na ordem dos nanossegundos ou de poucos microssegundos, não existem valores concordantes na literatura. Enquanto que existem estudos computacionais que apontam para um tempo de *fold*ing de 50 ns⁶⁰, também existem investigadores que defendam que este processo possui um tempo de 1,3 μs⁶¹. Tudo isto faz com que a realização de estudos experimentais, mormente onde se recolha informação estrutural e cinética, com o peptídeo *chignolin* seja de extrema importância, principalmente estudos onde se estude a relevância que aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis têm na aquisição de uma estrutura nativa estável.

3. CALORIMETRIA FOTOACÚSTICA RESOLVIDA NO TEMPO

3.1. Salto de pH induzido por laser

Nos últimos anos têm vindo a ser estudadas inúmeras reações de transferência de carga através do método de calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (TR-PAC), de entre as quais se destacam reações de transferência de próton⁶²⁻⁶⁵. Estas reações são definidas pela acidificação de uma solução que contenha um fotoácido, através da utilização de um curto pulso de laser, que rapidamente vai perturbar o equilíbrio ácido-base da solução e desencadear uma reação de catálise ácida, numa escala de tempo na ordem de 1 nanossegundo⁶⁶. Assim, a técnica de salto de pH induzida por laser acoplada a TR-PAC possui um papel bastante importante no estudo de processos biológicos⁶⁷, como é o caso do *folding/unfolding* proteico, uma vez que as ligações químicas estabelecidas entre resíduos de aminoácidos com uma cadeia lateral ionizável são fulcrais na aquisição de uma estrutura proteica funcional.

Fotoácidos são moléculas lábeis que, após a absorção de luz a um determinado comprimento de onda, se dissociam facilmente. O fotoácido utilizado neste estudo para promover a libertação de prótons H^+ foi o *orto*-nitrobenzaldeído (*o*-NBA) (Figura 11 (A)). A fotólise deste composto pode ser considerada um processo irreversível e em solução aquosa possui uma eficiência quântica de aproximadamente 0,4⁶⁸. Este processo foi inicialmente descrito por Ciamician e Silber⁶⁹. Após fotoexcitação, o composto é convertido em ácido *o*-nitrosobenzóico (Figura 11 (B)), ocorrendo a posterior libertação de prótons H^+ . Por sua vez, os iões formados são rapidamente solvatados por moléculas de água, o que leva a que ocorra uma contração do volume da solução ($\Delta V \leq 0 \text{ ml mol}^{-1}$). Acima de pH 9 é observado um outro processo correspondente à reação de prótons H^+ com iões hidroxilo, levando à formação de moléculas de água e a uma neutralização das cargas e consequentemente a uma expansão do volume da solução ($\Delta V \geq 0 \text{ ml mol}^{-1}$).

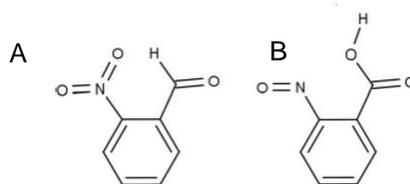


Figura 11: (A) Estrutura molecular do *o*-NBA e do (B) ácido *o*-nitrosobenzóico.

3.2. Efeito Fotoacústico

No ano de 1881, o cientista britânico Alexander Graham Bell⁷⁰ observou, pela primeira vez, o efeito fotoacústico. Segundo Bell, este efeito é caracterizado pela “produção de som através da luz”. A absorção por parte de uma amostra no estado líquido, sólido ou gasoso, de luz modulada ou pulsada, leva a que ocorra uma libertação local de calor devido à existência de processos não radiativos provenientes da excitação dessa amostra e conseqüentemente à produção de ondas de pressão (ondas acústicas). Por outras palavras, a libertação de calor e também as alterações de volume da amostra e do meio envolvente podem resultar na produção de ondas de pressão, que podem ser detetadas com o auxílio de detores adequados, como por exemplo microfones ou sensores piezoelétricos. No entanto, foi só na década de 70, que a aplicação deste efeito começou a ser introduzida por Callis, Gouterman e Parson, no estudo de entalpia resolvida no tempo e alterações de volume em materiais fotossintéticos. Desde então, os avanços científicos fizeram com que atualmente seja possível detetar ondas fotoacústicas com uma resolução temporal na ordem dos nanossegundos.

Nos dias de hoje, o efeito fotoacústico possui inúmeras aplicações tais como estudo de parâmetros cinéticos e termodinâmicos, bem como alterações conformacionais que ocorrem durante reações químicas ou bioquímicas, sendo que nos últimos anos tem sido cada vez mais explorado no estudo de processos biológicos de *fold*ing/*un*fold*ing* proteico, tendo vindo a permitir que estes sistemas sejam estudados numa escala temporal mais alargada⁷¹.

3.3. Análise de dados

Quando a absorção de luz por parte de uma dada solução origina uma reação química, as moléculas reativas transferem uma parte da sua energia em excesso para as redondezas da solução. Este processo leva a que ocorra um aumento instantâneo da temperatura local e conseqüentemente ao aparecimento de ondas de pressão resultantes de uma expansão volumétrica do solvente, que se propaga pelo meio, podendo ser detetada por um detetor sensível a alterações de pressão. Sempre que ocorrem processos adicionais provenientes da absorção de luz de laser pulsada, como por exemplo a quebra de ligações covalentes ou o aparecimento de espécies carregadas levando à eletrostrição do solvente em relação a centros carregados, há também uma alteração do volume total, expressa por:

$$\Delta V_{overall} = \Delta V_{th} + \Delta V_{struct} \quad (1)$$

onde ΔV_{th} representa a alteração de volume térmica consequente da libertação de calor para a solução e ΔV_{struct} representa todas as alterações volumétricas que não são provenientes do aquecimento térmico, incluindo alterações volumétricas devido a alterações conformacionais e de eletrostrição. Estas alterações contribuem para a produção de ondas fotoacústicas.

A componente térmica correspondente às alterações volumétricas pode ser definida por:

$$\Delta V_{th} = \left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right) Q \quad (2)$$

onde β se refere ao coeficiente de expansão térmica da solução (K^{-1}), C_p representa a capacidade calorífica ($cal\ g^{-1}\ K^{-1}$), ρ a densidade ($g\ ml^{-1}$) e Q a quantidade de calor libertado para o solvente, sendo que $\left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right)$ é o parâmetro termoelástico da solução. O valor deste parâmetro depende bastante da temperatura, sendo que, para a água pura, é nulo a uma temperatura de $3,9^\circ C^{72}$. Por sua vez, pode-se considerar que ΔV_{struct} é um parâmetro independente da temperatura, o que leva a que estas duas contribuições possam ser separadas através do estudo da dependência da amplitude da onda acústica (S) da temperatura. Portanto, a amplitude (S) do sinal acústico de uma dada amostra é dada pela equação (3), onde K é o parâmetro da resposta instrumental.

$$S = K (\Delta V_{th} + \Delta V_{struct}) \quad (3)$$

Esta equação pode ser reescrita em:

$$S = K \left[\left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right) Q + \Delta V_{struct} \right] \quad (4)$$

O parâmetro K pode ser eliminado da análise através da utilização de um composto de calibração, designado de referência fotoacústica, capaz de converter toda a energia do fóton, E_λ , em calor, sem sofrer alterações na estrutura molecular ($\Delta V_{struct} = 0$) dentro da escala de tempo da resolução instrumental. Estes compostos são caracterizados por serem estáveis fotoquimicamente, não serem fluorescentes e 100% eficientes na entrega da energia absorvida ao meio sobre a forma de calor, após as moléculas excitadas voltarem ao seu estado fundamental⁷³. Para eliminar K , as ondas acústicas do composto de referência são medidas em condições semelhantes

às ondas das amostras em estudo. Assim, a amplitude da onda acústica do composto de referência pode ser descrita por:

$$S_{ref} = K \left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right) E_\lambda \quad (5)$$

onde E_λ é a energia do fóton ao comprimento de onda de excitação utilizado. Tendo sido utilizado um comprimento de onda de excitação de 355 nm, E_λ irá possuir um valor de 80,54 kcal mol⁻¹.

Através da divisão de S por S_{ref} , é possível eliminar K .

$$\frac{S}{S_{ref}} = \phi = \frac{Q}{E_\lambda} + \frac{\Delta V_{struct}}{\left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right) E_\lambda} \quad (6)$$

Se $\left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right)$ for definida por $F(t)$, uma vez que estas quantidades são função da temperatura, tem-se:

$$E_\lambda \phi = Q + \frac{\Delta V_{struct}}{F(t)} \quad (7)$$

Quando um processo possui um rendimento quântico (Φ) inferior à unidade, as alterações de volume são obtidas através da equação 8:

$$\Delta V = \frac{\Delta V_{struct}}{\Phi} \quad (8)$$

Mencione-se que, para além da amplitude das ondas fotoacústicas, os detetores utilizados são também sensíveis ao seu perfil temporal. Portanto, o sinal acústico dependente do tempo que é observado, $E(t)$ e que reflete a resposta do transdutor numa onda de pressão, é produzido pela convulsão de uma função do processo de decaimento dependente do tempo, $H(t)$, com uma função representativa da resposta instrumental, $T(t)$.

$$E(t) = T(t) \times H(t) \quad (9)$$

A função $T(t)$ pode ser obtida experimentalmente através da utilização de um composto de referência fotoacústica, cujas propriedades já foram mencionadas anteriormente. O composto utilizado neste estudo foi a púrpura de bromocresol (BP).

A função $H(t)$ pode ser definida como o somatório de funções de decaimento exponenciais:

$$H(t) = \sum_i \left(\frac{\phi_i}{\tau_i} \right) e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (10)$$

onde Φ_i é o fator pré-exponencial do transiente com tempo de vida τ_i . Os valores de Φ_i e τ_i são resultado da desconvolução do sinal e cada decaimento sequencial individual contém a deposição de calor num dado intervalo de tempo. Para analisar estes parâmetros, pretende-se utilizar o software *CPAC*, desenvolvido no nosso laboratório por Schaberle et al⁷⁴. Este pode ser encontrado *online* e de forma gratuita em (<http://cpac.qui.uc.pt/>). Permite obter uma descrição analítica da onda T(t), bem como uma solução analítica da convulsão entre a onda T(t) e a onda H(t).

3.3.1. Método de duas temperaturas

Existem principalmente dois procedimentos para a deteção de ondas de PAC. No primeiro, a onda é detetada perpendicularmente ao feixe de luz. Por outro lado, no segundo método, a onda é detetada em colinearidade com o feixe, sendo que, neste caso, o detetor é protegido do laser por um espelho. Esta segunda abordagem é designada de célula PAC de "face frontal" e a sua resolução temporal é limitada pela resposta do detetor quando o espelho é altamente refletor no comprimento de onda do laser (>99,9% de reflexão) e suficientemente fino para minimizar a distorção da onda fotoacústica devido à absorção diferencial dos seus componentes de frequência⁷⁵.

Para estudar as alterações de volume em função do pH, é usual recorrer ao método de duas temperaturas. Para tal, é necessário que primeiro se conheça a temperatura à qual o coeficiente de expansão térmico da solução aquosa é nulo ($T_{\beta=0}$), ou seja temperatura à qual as mudanças de volume que irão ocorrer não possuam nenhuma contribuição entálpica. O valor de $T_{\beta=0}$ é determinado experimentalmente, medindo a temperatura à qual o sinal do composto de referência, T(t), deixa de ser detetado. Estas ondas, por sua vez irão ser medidas a uma temperatura ligeiramente superior ($T_{\beta \neq 0}$) às ondas acústicas da amostra, E(t). Assim, é de extrema importância que a célula fotoacústica tenha um excelente controlo da temperatura, tanto no que diz respeito à precisão do valor da temperatura do líquido dentro da célula como à manutenção dessa temperatura durante a experiência. As alterações de volume estrutural (ΔV_i) já mencionadas podem assim ser calculadas a partir da seguinte expressão:

$$\Delta V_i = \phi_i E_\lambda \left(\frac{\beta}{c_p \rho} \right)_{\beta \neq 0} \quad (11)$$

onde $E\lambda$ corresponde à energia de uma mol de fótons no comprimento de onda de excitação, $\left(\frac{\beta}{c_p\rho}\right)_{\beta\neq 0}$ representa o parâmetro termoelástico da solução em $T_{\beta\neq 0}$ e Φ_i refere-se ao valor de Φ obtido por extrapolação para intensidade da luz de excitação laser para valor nulo (quando é verificada uma dependência significativa de Φ na intensidade da luz laser).

4. DICROÍSMO CIRCULAR

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou no sentido anti-horário, podendo ser utilizada na caracterização de moléculas quirais e macromoléculas, nomeadamente proteínas. Assim, esta é uma técnica que, devido à sua simplicidade, é muitas vezes utilizada para estudar as alterações estruturais de proteínas, nomeadamente a determinação das suas estruturas secundárias⁷⁶.

Para melhor compreender esta técnica é importante conhecer os princípios físicos que nela se encontram presentes. Como se sabe, a radiação eletromagnética é definida pela existência de duas ondas perpendiculares uma à outra (uma onda elétrica e outra magnética, originadas pela oscilação de um campo elétrico e magnético, respetivamente), que se propagam no tempo e no espaço, com uma diferença de fase de 0°. Estas ondas oscilam em planos perpendiculares à direção de propagação. Uma particularidade destes campos eletromagnéticos é a sua polarização, onde a combinação de duas ondas linearmente polarizadas (uma na vertical e outra na horizontal), com a mesma magnitude e com uma diferença de fase de 90°, origina uma onda circularmente polarizada, podendo rodar quer para a direita (sentido horário -R), quer para a esquerda (sentido anti-horário -L). A espectroscopia de dicroísmo circular tem por base a absorção diferencial de componentes circularmente polarizados para a esquerda e para a direita (Equação 12) de radiação polarizada.

$$\Delta A = A_L - A_R = (\epsilon_L - \epsilon_R) c l \quad (12)$$

onde ϵ_L e ϵ_R são o coeficiente de extinção molar para a luz LCP e RCP, expressos em $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c é a concentração em mol L^{-1} e l é o percurso ótico medido em cm.

Contudo, por razões históricas, a maioria dos equipamentos encontra-se calibrado em termos de elipticidade, sendo que a relação da elipticidade observada, θ_{obs} , em graus ou miligráus com ΔA pode ser definida por:

$$\theta_{\text{obs}} = 32.98 \Delta A \quad (13)$$

Com o objetivo de normalizar os efeitos do percurso ótico e da concentração das soluções, a elipticidade molar, $[\theta]$, é descrita segundo a equação 14⁷⁷:

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{obs}} \times 100}{c \times l} = 3298 \Delta \epsilon \quad (14)$$

Para uma determinada proteína, a elipticidade molar ou a elipticidade do resíduo médio, $[\theta]_{ERM}$, podem ser calculadas através das seguintes equações:

$$[\theta] = \frac{\theta_{obs} \times 100 \times MM}{c \times l} \quad (15)$$

$$[\theta]_{ERM} = \frac{\theta_{obs} \times 100 \times MM}{c \times l \times nA} \quad (16)$$

onde c é a concentração da proteína em mg mL^{-1} , l é o percurso ótico em cm , MM é a massa molecular da proteína e nA é o número de aminoácidos por proteína. As unidades de $[\theta]$ e $[\theta]_{ERM}$ são $\text{graus cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$.

Para que o sinal de CD possa ser observado, é necessário que exista em solução um cromóforo oticamente ativo ou assimétrico. A sua quiralidade pode ser proveniente da existência de um ou mais centros quirais, de um ambiente quiral ou devido ao facto de o cromóforo se encontrar covalentemente ligado a um centro quiral. Quando se está a estudar proteínas ou pequenos peptídeos, as ligações peptídicas (absorção abaixo dos 240 nm), as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos aromáticos, como a tirosina (Tyr), o triptofano (Trp) e a fenilalanina (Phe) (absorção entre os 260 e os 320 nm) e as ligações de dissulfeto (fraca absorção por volta dos 260 nm), são os cromóforos de interesse. Assim, é possível distinguir duas zonas espectrais: a zona do UV-longínquo (entre os 180 e os 250 nm), originada pela contribuição das ligações peptídicas e a zona do UV-próximo (entre os 250 e os 320 nm), originada pela contribuição dos aminoácidos aromáticos. Fornecem-nos informações diferentes relativamente à estrutura de proteínas.

4.1. CD no UV-longínquo

O estudo do sinal de CD na região do UV-longínquo dá-nos informações quantitativas sobre a estrutura secundária das proteínas, pois elementos como a hélice- α , a folha- β , a volta- β e a *random coil* (estrutura desordenada), possuem um espectro de CD bastante característico e fácil de identificar. Estes “espectros modelo” podem ser observados na Figura 12.

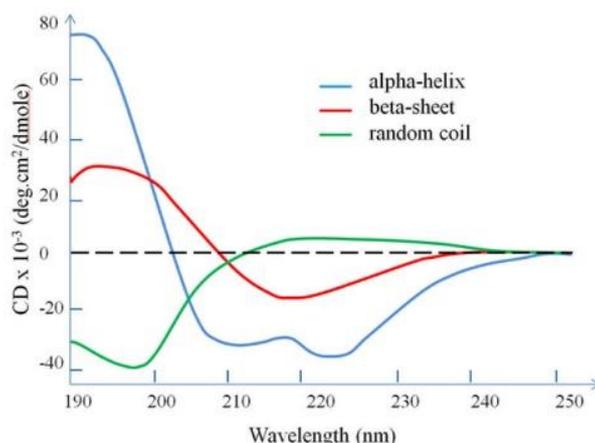


Figura 12: Espectro modelo de estruturas hélice- α , folha- β e random coil, na zona do UV-longínquo.

Como é possível observar através de uma breve análise da Figura 12, o espectro da hélice- α é caracterizado por possuir uma banda bastante notória e positiva a 190 nm, sendo esta originada devido a transições eletrónicas que ocorrem na amida da ligação peptídica. Também é possível observar mais duas bandas negativas, uma a 208 nm, resultante da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e outra a 222 nm, originada devido a uma transição $n \rightarrow \pi^{*76}$.

Por sua vez, o espectro de CD da folha- β é caracterizado por apresentar uma banda positiva a 195 nm, resultante de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e uma banda negativa a aproximadamente 217 nm, causada por uma transição $n \rightarrow \pi^{*78}$. Espectros de estruturas em folha- β são menos intensos que espectros de estruturas em hélice- α .

Quando a proteína apresenta uma estrutura desordenada, o espectro possui uma banda negativa entre os 195-200 nm, originada por uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e uma banda positiva fraca resultante de uma transição $n \rightarrow \pi^{*78}$.

Por último, as voltas- β são normalmente caracterizadas por possuírem uma banda negativa perto dos 190 nm e uma banda positiva a aproximadamente 205 nm. No entanto, não possuem um espectro bem definido, pois vários tipos destas estruturas podem ser encontrados em proteínas.

Atualmente, a existência de *softwares* permite a realização de uma análise quantitativa aos espectros de CD obtidos no ultravioleta longínquo, sendo possível ficar a conhecer quais percentagens dos diferentes elementos da estrutura secundária que se encontram presentes numa certa proteína. É uma técnica importante para seguir alterações conformacionais em proteínas que podem ocorrer por alterações de pH ou temperatura.

4.2. CD no UV-próximo

O estudo do sinal de CD na região do UV-próximo é realizado quando o peptídeo possui aminoácidos aromáticos na sua cadeia e estes se encontram num ambiente assimétrico. Posto isto, a literatura indica-nos que a tirosina apresenta um pico entre os 275 e os 282 nm, o triptofano entre os 290 e os 305 nm e a fenilalanina entre os 255 e os 270 nm⁷⁹. Apesar de poder existir sobreposição com o sinal proveniente dos resíduos aromáticos, as ligações dissulfeto também podem contribuir para os espetros de CD no UV-próximo, apresentando uma banda na região dos 260 nm⁸⁰.

Esta é uma técnica que possui um papel importante, pois dá-nos uma ideia geral sobre as alterações estruturais na proteína, sobre processos de *folding* e *unfolding*, assim como a sua estabilidade⁸¹. Porém, o sinal de CD destes aminoácidos e das ligações dissulfeto são bastante fracos na ausência de uma estrutura ordenada⁸¹ e os espetros dependem não só do número de aminoácidos aromáticos, como também da sua mobilidade, disposição espacial na proteína e da natureza do seu ambiente⁷⁹.

5. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular é uma ciência que recorre a equações da mecânica quântica ou da física clássica com o objetivo de representar e simular o comportamento das mais diversas estruturas moleculares. Enquanto que a aproximação clássica inclui métodos como métodos de mecânica molecular e dinâmica molecular, a aproximação quântica compreende métodos *ab initio* e semi-empíricos com modelos mais robustos. De um modo geral, a escolha da aproximação que se pretende realizar depende de fatores como as propriedades que se desejam avaliar, a complexidade do sistema que se pretende estudar, a precisão desejada e a capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos⁸². Nos parágrafos seguintes será feita uma breve apresentação de cada um destes métodos.

O método de mecânica molecular define os átomos como partículas, sendo que a cada um lhes é atribuído uma série de parâmetros (parâmetros de van der Waals obtidos do ajuste de dados experimentais referentes aos estados líquidos e sólidos; parâmetros para a distensão, dobragem, torção e parte eletrostática, obtidos através de cálculos de estrutura eletrônica, entre outros) e outros termos constantes importantes na aquisição de um campo de forças realista. Este pode então ser considerado uma função de energia que pode ser utilizada para calcular a energia potencial de um sistema de átomos. Os campos de forças MM3⁸³, OPLS⁸⁴, AMBER⁸⁵ e CHARMM⁸⁶ são exemplos de campos utilizados no estudo de sistemas biológicos.

O método de dinâmica molecular, ao contrário do anterior, possui a vantagem de analisar o movimento físico de átomos e moléculas. Portanto, átomos e moléculas podem interagir entre si durante um determinado período de tempo. Numa grande parte dos casos, a trajetória realizada por estes átomos e moléculas é determinada através da resolução numérica das equações de movimento de Newton⁸². Ao conhecer esta trajetória, torna-se possível estudar propriedades que dependam do tempo, tais como difusão, distribuição de moléculas de solvente ao redor de um soluto e processos de *folding* de cadeias moleculares. Contudo, o tempo da trajetória avaliada é em geral curto, uma vez que esta simulação é bastante exigente do ponto de vista computacional. Quando se estudam sistemas menores, esta trajetória pode em alguns casos alcançar a gama dos nanossegundos.

De uma forma muito simplificada, os métodos *ab initio* tentam resolver a equação eletrônica de Schrödinger, dadas as posições dos núcleos e o número de elétrons, com o propósito de conseguirem produzir informações úteis, tal como a

energia do sistema e a sua densidade eletrônica. Devido à elevada complexidade desta equação e aos custos computacionais que lhes estão associados, têm vindo a ser realizadas várias aproximações, como é o caso da aproximação de Born-Oppenheimer⁸⁷.

Por último, métodos semi-empíricos para além de também se basearem nas equações da mecânica quântica e realizarem bastantes aproximações, obtêm alguns parâmetros através de dados experimentais. Isto permite-lhes assim estudar sistemas moleculares mais complexos, quando comparado com os métodos *ab initio*. O método de Hückel⁸⁸, AM1⁸⁹ e PM6⁹⁰ são exemplos de métodos semi-empíricos.

Capítulo 2: **Materiais e Métodos**

1. DICROÍSMO CIRCULAR

O composto modelo N-acetil-L-tirosina (Ac-Tyr-NH₂) foi fornecido pela Bachem (Bubendorf, Suíça), o peptídeo *chignolin* pela Genscript (Nova Jérquia, EUA) e o orto-nitrobenzaldeído (o-NBA) e opúrpura de bromocresol (BP) pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Todas as experiências de dicróismo circular (CD) foram realizadas num espetropolarímetro DSM 20 da Olis Inc. A aquisição dos espectros de CD dos diversos ensaios foi realizada com o *software* Olis Spectral Works versão 4.3 e os resultados experimentais de CD no UV longínquo e próximo foram analisados com o programa Origin2016 (OriginLab Corporation).

O peptídeo *chignolin* foi dissolvido numa solução aquosa com 100 mM de NaCl, com o objetivo de fornecer uma força iónica indispensável ao *folding* proteico e o pH foi ajustado utilizando HCl ou NaOH e medido com um microelétrodo de vidro. A sua concentração final era de aproximadamente 1 mg/mL tanto para as experiências no UV-longínquo como para o UV-próximo. Os espectros de CD na zona do UV-longínquo foram recolhidos entre os 190 e 260 nm e foi utilizado um percurso ótico de 0,2 mm. Por sua vez, os espectros de CD na zona do UV-próximo foram recolhidos entre os 260 e 320 nm e foi utilizado um percurso ótico de 5 mm. Em ambos os casos, foram sempre recolhidos 2 scans à temperatura de 3°C, com uma resolução de 1 nm e um tempo de integração de 5 s. Os espectros foram corrigidos pela subtração do sinal do tampão. Os resultados são expressos pela elipticidade do resíduo médio, $[\theta]_{ERM}$ (equação 16). A redução do ruído foi alcançada usando o programa Origin2016, anteriormente mencionado.

O derivado do resíduo de tirosina (Ac-Tyr-NH₂) foi também estudado por UV-próximo nas mesmas condições que o peptídeo *chignolin*.

O servidor online *BestSel* (Beta Structure Selection, <http://bestsel.elte.hu/index.php>) foi utilizado para estimar a percentagem de estrutura em folha- β formada nas diferentes condições de pH.

2. CALORIMETRIA FOTOACÚSTICA

2.1. Preparação das amostras

As soluções a serem estudadas por calorimetria fotoacústica foram preparadas dissolvendo o peptídeo *chignolin* e o derivado da tirosina numa solução aquosa com 100 mM de NaCl. Foi adicionado *o*-NBA até se conseguir obter uma absorção ótica final de 0,6 numa célula com um percurso ótico de 1,0 cm a 355 nm. A concentração do peptídeo e do derivado da tirosina variou entre os 250 μ M e 2,0 mM. O BP foi utilizado como referência fotoacústica. Foi dissolvido em solução aquosa com 100 mM de NaCl e a sua absorção ótica também foi ajustada a 0,6 numa célula com um percurso ótico de 1,0 cm a 355 nm. Os pH's das amostras foram ajustados através da adição de HCl ou NaOH e foram medidos com um eléctrodo de vidro. O pH do *chignolin* e da tirosina foi ajustado a 11,0 enquanto que o pH do BP foi ajustado a 9,0 com o objetivo de evitar instabilidade na absorção ótica no comprimento de onda de excitação⁷³. Todas as experiências foram repetidas no mínimo 2 vezes.

2.2. Montagem experimental de PAC

Para ser possível realizar estas experiências, foi necessário proceder à montagem da célula de PAC, bem como do restante equipamento. A imagem abaixo apresentada pretende representar todos os componentes do equipamento.

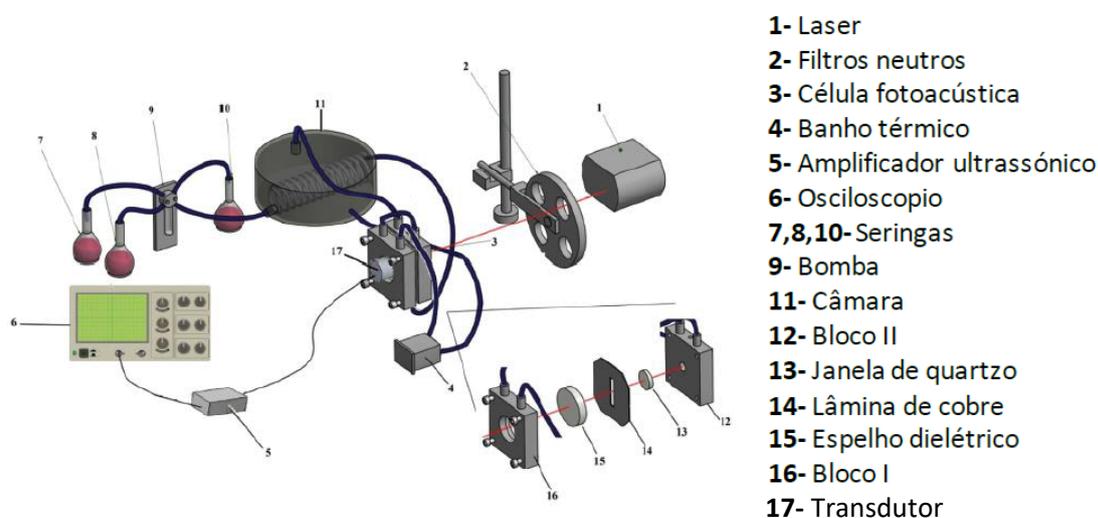


Figura 13: Esquema do equipamento de calorimetria fotoacústica disponível no nosso laboratório. Adaptado de ⁶¹.

O número 3 representa uma célula de fluxo, desenvolvida no nosso laboratório, que segue o design de irradiação de face frontal descrito por Arnaut et al.⁷⁵ É constituída por um bloco I (16), que contém um espelho dielétrico (15) com 10 mm de espessura e 50 mm de diâmetro, e um bloco II (12), que contém um espelho de quartzo (13) com 6 mm de espessura e 25 mm de diâmetro. Ambos os blocos são constituídos por aço inoxidável. Acoplado ao bloco I encontra-se um transdutor piezoelétrico (17) de 2,25 ou de 1 MHz. Enquanto que o primeiro transdutor (2,25 MHz) é mais ajustado para processos mais rápidos (até algumas centenas de nanossegundos), sendo incapaz de detetar processos com tempos característicos na ordem dos microssegundos, o segundo transdutor (1MHz) é indicado para estes últimos tempos, sendo por sua vez mais difícil detetar processos rápidos com este transdutor. Uma lâmina de cobre (14) com 0,127 mm de espessura encontra-se entre os dois blocos e é responsável por determinar o percurso ótico. Esta célula permite que a solução flua de baixo para cima. As amostras fluem através do auxílio de uma bomba injetora (Kloehn syringe pump) (9), constituída por seringas (7, 8, 10) e controlada por um software. Estas seringas são responsáveis por conduzir as diferentes soluções (solvente, amostra e referência) a uma câmara (11), que se encontra ligada a um banho de etanol termorregulado (4), responsável por controlar a temperatura das soluções e posteriormente conduzi-las à célula fotoacústica. Um laser (1) antes de chegar à célula, incide num conjunto de filtros (2) com quatro intensidades diferentes, correspondentes a 25, 50, 75 e 100% da intensidade total do laser, através da utilização de filtros de densidade. Após a onda PA passar pelo transdutor, o sinal é amplificado por um amplificador ultrassónico (modelo 5676) (5) e os dados são recolhidos por um osciloscópio digital (Tektronix DPO7254) (6)⁹¹. As imagens de todo o equipamento utilizado encontram-se apresentadas no material suplementar.

A fonte de luz operada a 355 nm foi o terceiro harmónico de um laser de nanossegundos Q-switched Nd:YAG (Ekspla NL301G). A largura do pulso laser foi de aproximadamente 6 ns, a taxa de repetição de 10 Hz e a energia máxima foi ajustada para cerca de 1,30 mJ/pulso. Os sinais de PAC foram medidos entre 1,8°C e 30°C, sendo que a variação de temperatura durante as experiências foi sempre inferior a 0,5°C.

Os dados da amostra foram analisados por comparação com os do composto de referência fotoacústica, que liberta toda a energia absorvida na fotoexcitação como calor com uma eficiência quântica de 1,0.

O processo de desconvulsão de ondas fotoacústicas encontra-se descrito na secção 3 do Capítulo 1.

3. CÁLCULOS DE MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA ESTRUTURAL EM pH 4,5 E pH 11

A estrutura cristalográfica do peptídeo *chignolin* na forma não mutante foi obtida no banco de dados de proteínas, do inglês *Protein Data Bank* (PDB), com código de acesso PDB 1UAO⁵¹. Recorreu-se ao servidor APBS-PDB2PQR para adicionar átomos de hidrogénio à estrutura do peptídeo conforme os estados de tautomerismo e de ionização em pH 4,5 e pH 11⁹². Os cálculos de minimização de energia estrutural para o peptídeo nestes dois pH's foram realizados pelo programa *Spartan'18*⁹³. A minimização de energia inicial foi obtida pelo método da mecânica molecular MMFF e o resultado no menor estado de energia foi submetido a uma nova minimização de energia pelo método semi-empírico PM6 com valor de contante dielétrica 78,5 ua. O resultado final de minimização de energia foi avaliado tanto em termos de forças intramoleculares de estabilização, quanto pela quantificação do valor da raiz do quadrado médio do desvio, do inglês *Root Mean Square Deviation* (RMSD), pelo programa *PyMOL Delano Scientific LLC*⁹⁴.

Capítulo 3:
Análise e Discussão
de Resultados

1. DICROÍSMO CIRCULAR

Com o objetivo de estudar as alterações na estrutura secundária do peptídeo *chignolin* em função do pH do meio, foi realizada uma titulação deste peptídeo. Na Figura 14 (A) encontra-se representado o espectro de CD no UV-longínquo (190 – 260 nm) correspondente a esta titulação, sendo que os espectros foram recolhidos entre os pH's 1,58 e 11,01 a uma temperatura constante de 3°C.

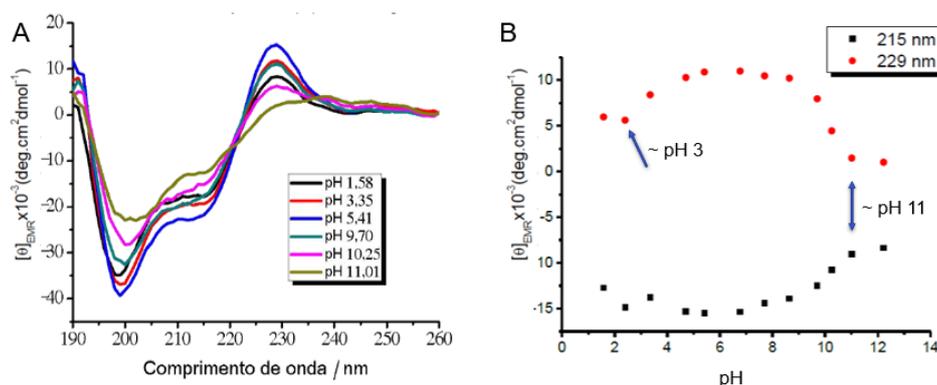


Figura 14: (A) Espectros de CD do peptídeo *chignolin* na zona do UV-longínquo em solução aquosa com 100 mM de NaCl, a diferentes pH's e a 3°C. Os espectros foram recolhidos entre os 190 e os 260 nm. (B) Análise das alterações conformacionais do peptídeo em função do pH ao comprimento de onda de 215 e 229 nm.

Através de uma análise qualitativa da Figura 14 (A), é possível observar que a conformação em gancho- β que o peptídeo tende a adquirir em solução é bastante dependente do pH. Além disso, a pH 5,4, parece haver em solução uma mistura de duas conformações diferentes, nomeadamente estrutura em folha- β e *random coil*, devido à existência de um ombro a aproximadamente 215 nm e de um mínimo próximo dos 200 nm, respetivamente. Esta mistura de conformações também foi anteriormente estudada por Honda et al., quando foram feitos estudos de RMN e de CD a várias temperaturas¹⁰. A existência deste equilíbrio faz com que o *chignolin* seja uma molécula com uma estrutura bastante dinâmica adotando diversas conformações.

O espectro de CD no UV-longínquo do *chignolin* possui ainda uma terceira banda positiva a 229 nm bastante característica de proteínas globulares que possuem resíduos de triptofano na sua sequência proteica⁹⁵. Assim, a presença desta banda positiva pode ser indicativa da existência de uma estrutura ordenada do peptídeo *chignolin*. No caso do *chignolin*, o pico é originado devido à interação *edge-to-face* que

os dois aminoácidos aromáticos, Tyr2 e Trp9, estabelecem entre si e que para muitos investigadores é uma interação fundamental para a estabilidade do peptídeo^{53,55}.

A Figura 14 (B) representa as alterações conformacionais do peptídeo em função do pH no comprimento de onda de 215 e 229 nm. Apesar de não ser muito notória, esta curva dependente do pH apresenta uma forma de “sino” com um máximo compreendido entre pH 5,50 e 6,70. Entre o pH 9,70 e 11,01 há uma diminuição significativa do declive da curva. Este acontecimento deve-se à desprotonação da cadeia lateral do resíduo de Tyr2 presente na sequência peptídica, uma vez que esta cadeia possui um pKa de aproximadamente 10,30. Por sua vez, abaixo do pH 5,50 também há uma diminuição do declive da curva, embora mais ligeira. Esta variação é uma consequência da protonação da cadeia lateral dos resíduos de Asp3 e Glu5, que possuem valores de pKa aparentes de 3,50 e 4,20, respetivamente. Embora as alterações conformacionais provocadas pelos dois ácidos não sejam tão significativas como as alterações provocadas pela desprotonação da Tyr2, estes aminoácidos demonstram ser importantes na aquisição da estrutura secundária do *chignolin*.

O servidor online *BestSel* foi utilizado para estimar a percentagem de estrutura em folha- β formada em diferentes condições de pH. De uma forma geral os dados da Tabela 3 são concordantes com a Figura 14B, pois segundo ambos o peptídeo possui uma maior percentagem de folha- β a pH's próximos de 5 e à medida que o pH se torna mais básico, esta estrutura vai-se perdendo (varia entre 56,7% em pH 4,45 e 35,1% em pH 12,23). Em contrapartida há um ganho de *random coil*, que, para a mesma gama de pH's varia entre os 38,1% e os 57,9%. No entanto, quando falamos do *turn*- β os resultados acabam por ser contraditórios, pois é difícil descortinar uma lógica aparente. Isto pode ser devido ao facto de a base de dados do *BestSel* não possui proteínas ou peptídeos com interações edge-to-face entre aminoácidos aromáticos, como é o caso da interação Tyr2-Trp9, o que pode causar uma certa incoerência na posterior análise de dados.

Tabela 3: Análise da estrutura secundária dos espectros de CD no UV-longínquo adquiridos ao peptídeo *chignolin* através do servidor online *BeStSel* (*Beta Structure Selection*, <http://bestsel.elte.hu/index.php>).

pH	Folha- β	Turn	Random coil
1,58	48,9	5,7	45,4
3,35	52,6	5,0	42,4
4,45	56,7	5,5	38,1
5,55	52,9	3,2	43,6
6,66	51,2	3,3	45,5
9,90	48,7	5	46,3
10,40	42,1	6,8	51,1
11,20	41,4	8,5	50,0
12,23	35,1	7,0	57,9

Os espectros de CD no UV-próximo (260 – 320 nm) foram adquiridos com o objetivo de tentar compreender a influência do pH na estrutura terciária do peptídeo à volta dos resíduos aromáticos, neste caso da tirosina e do triptofano. Na Figura 15 podemos encontrar os espectros de CD no UV-próximo do derivado da tirosina, Ac-Tyr-NH₂, e do peptídeo *chignolin*. Estes foram recolhidos entre os pH's 5,08 e 11,14 a uma temperatura constante de 3°C.

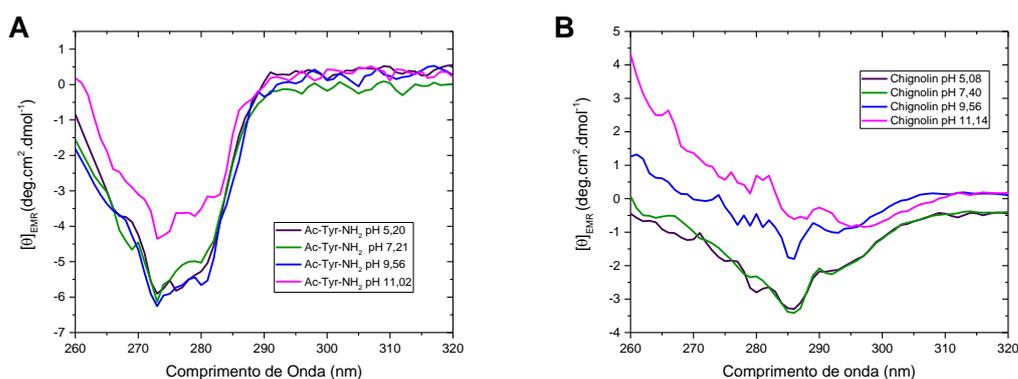


Figura 15: (A) Espectro de CD na zona do UV-próximo do derivado de tirosina, Ac-Tyr-NH₂, e (B) do peptídeo *chignolin* em solução aquosa com 100 mM de NaCl, a diferentes pH's e a 3°C. Os espectros foram recolhidos entre os 260 e os 320 nm.

Tal como mencionado na secção 4 do Capítulo 1, na Figura 15 (A) é possível observar uma banda entre os 272 e 282 nm típica do resíduo de tirosina, bem como uma diminuição da mesma a pH 11,14, devido à desprotonação do resíduo de tirosina.

A Figura 15 (B) representa o espectro de UV-próximo do peptídeo *chignolin*, com uma banda negativa entre os 280 e os 290 nm devido à contribuição dos dois aminoácidos aromáticos, tirosina e triptofano. Tal como esperado, a banda negativa é mais intensa a um pH de 5 e à medida que o pH aumenta, esta torna-se menos negativa, havendo uma perda da estrutura terciária, conseqüente da perda de estrutura secundária após desprotonação da Tyr2.

2. REFERÊNCIA FOTOACÚSTICA

Tal como foi mencionado na secção 3 do Capítulo 1, o parâmetro termoelástico da solução ($\beta/C_p\rho$), depende bastante da temperatura e, para a água pura, o sinal do composto de referência é nulo a aproximadamente 3,9°C ($T_{\beta=0}$). Uma vez que as amostras e a referência fotoacústica devem ser obtidas nas mesmas condições experimentais (força iónica, temperatura, solvente, comprimento de onda de excitação, geometria da célula), a solução da referência fotoacústica foi preparada em 100 mM de NaCl e como tal, o seu coeficiente de expansão térmica foi calculado experimentalmente. As ondas fotoacústicas deste composto encontram-se representadas na Figura 16. Foram obtidas a pH 9, com uma $A_{355} = 0,60$ para um percurso ótico de 1 cm, após irradiação a 355 nm e utilizando um transdutor de 2,25 MHz (Figura 16 (A)) e outro de 1 MHz (Figura 16 (B)).

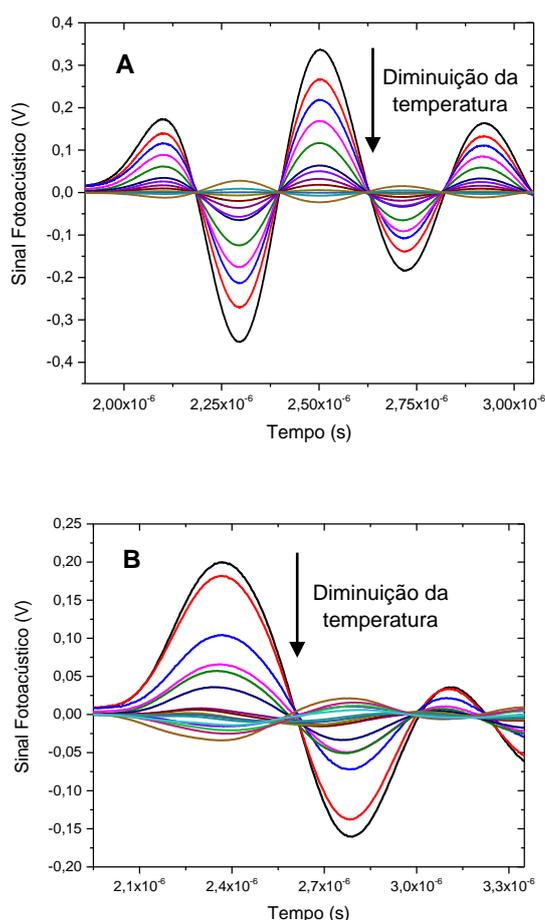


Figura 16: Dependência das ondas acústicas da púrpura de bromocresol (BP) da temperatura, após irradiação a 355 nm e utilizando um transdutor de (A) 2.25 MHz (A temperatura variou entre os 30°C e os 0°C) e (B) um transdutor de 1 MHz (A temperatura variou entre os 20°C e os 0°C).

Como é possível observar pela análise da Figura 16, a forma das ondas varia consoante o transdutor, no entanto, em ambos os casos, a amplitude das ondas diminui com a diminuição da temperatura, sendo nula a uma temperatura de aproximadamente 1,80°C ($T_{\beta=0}$). A temperaturas inferiores a 1,80°C, a onda fotoacústica inverte o seu sinal, tornando-se negativa. Além disso, a $T_{\beta=0}$ do BP em água pura também foi calculada ($T_{\beta=0} = 3,0^\circ\text{C}$) e a Figura 17 apresenta as ondas acústicas do BP na presença e na ausência de sal. Através de uma análise qualitativa, é possível notar que o sal aumenta a velocidade de propagação das ondas fotoacústicas, uma vez que a solução de BP com 100 mM de NaCl se encontra ligeiramente deslocada (para a esquerda) em relação à solução de BP em água pura. Além disso, quando em solução salina, as ondas possuem uma amplitude superior.

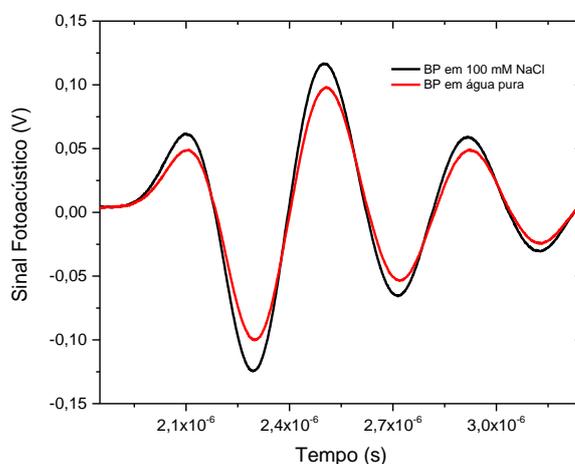


Figura 17: Ondas fotoacústicas do composto de referência em 100 mM de NaCl (onda a preto) e em água pura (onda a vermelho), a uma temperatura de 10°C e utilizando o transdutor de 2.25 MHz.

Os valores teóricos do parâmetro ($\beta/C_p\rho$) para a água pura foram sobrepostos com a intensidade relativa do sinal fotoacústico calculada experimentalmente obtida utilizando o transdutor de 2,25 MHz (Figura 18). Para este transdutor, à temperatura de 6°C, a amplitude do segundo pico positivo da onda do BP com 100 mM de NaCl é de 64 mV, enquanto que a amplitude da onda do BP sem sal é de 47 mV. Assim, existe um aumento na amplitude da onda de BP com 100 mM de NaCl, de aproximadamente 26,6%.

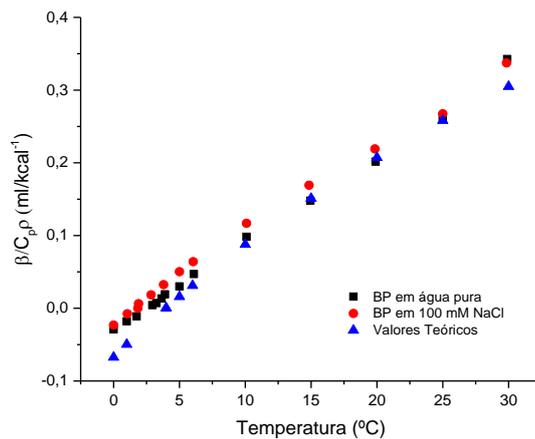


Figura 18: Comparação entre os valores teóricos do parâmetro (β/C_{pp}) para a água pura e a intensidade relativa do sinal fotoacústico calculada experimentalmente a diferentes temperaturas entre os 30°C e os 0°C.

3. SOLUÇÃO DE *o*-NBA:

3.1. Influência do pH

A fotoejeção do próton de *o*-NBA em solução salina (100 mM NaCl) com pH a variar entre 6,70 e 11,50 foi seguida pelo método de duas temperaturas. As ondas do fotoácido foram medidas a uma temperatura $T_{\beta=0} = 1,80^{\circ}\text{C}$, enquanto que as ondas da referência fotoacústica foram medidas a uma temperatura $T_{\beta\neq 0} = 6,0^{\circ}\text{C}$. A variação do sinal fotoacústico do *o*-NBA em função do pH da solução, está representada na Figura 19.

Numa primeira análise, é possível observar que a um pH de 6,70 a onda do *o*-NBA se encontra em oposição de fase em relação à referência fotoacústica (onda T). À medida que o pH aumenta, é notável que a onda do *o*-NBA varia, pois, a pH 11,50, esta já se encontra em fase e deslocada relativamente à onda T. Também se pode verificar um aumento da amplitude das ondas fotoacústicas em função do aumento do pH, uma vez que existe uma maior quantidade de espécies OH^- para reagir com prótons H^+ .

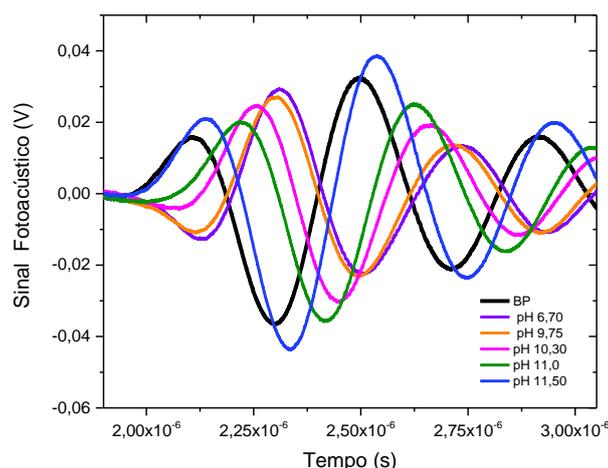


Figura 19: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de *o*-NBA em 100 mM de NaCl a diferentes pH's iniciais obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de *o*-NBA foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta = 0} = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ e foi utilizado um transdutor de 2,25 MHz.

Os resultados da desconvolução das ondas experimentais presentes na Figura 19 foram obtidos através da utilização do software CPAC, desenvolvido no nosso laboratório⁷⁴ e disponível *online* (<http://cpac.qui.uc.pt/>). Estes dados (rendimento quântico e tempo de vida da reação), bem como as variações de volume calculadas a partir da equação (11), encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de *o*-NBA em 100 mM de NaCl, utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

pH	[OH ⁻] (mol L ⁻¹)	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
6,70	$5,0 \times 10^{-8}$	$-0,75 \pm 0,05$	----	$20,60 \pm 3,39$	----	$-6,67 \pm 0,50$	----
9,75	$5,6 \times 10^{-5}$	$-0,60 \pm 0,12$	----	$8,81 \pm 6,35$	----	$-5,38 \pm 1,05$	----
10,30	$2,0 \times 10^{-4}$	$-0,84 \pm 0,15$	$1,23 \pm 0,20$	<1	$142 \pm 39,00$	$-7,11 \pm 1,33$	$10,91 \pm 1,78$
11	$1,0 \times 10^{-3}$	$-0,65 \pm 0,17$	$1,91 \pm 0,31$	<1	$76,90 \pm 24$	$-5,78 \pm 1,50$	$17,00 \pm 2,80$
11,50	$3,16 \times 10^{-3}$	----	$1,50 \pm 0,12$	----	$38,0 \pm 2,24$	----	$13,35 \pm 1,04$

Abaixo do pH 9,75 é possível observar uma contração volumétrica. Esta contração ocorre devido à rápida solvatação, por parte da água, dos prótons H⁺ que são libertados após a fotólise do *o*-NBA:



A pH 9,75 o valor de φ_1 associado a esta fotólise é de aproximadamente -0,60, o que corresponde a um $\Delta V_1 = -2,13 \text{ ml mol}^{-1}$. Contudo, tendo em conta que o

rendimento quântico desta reação é de 0,4, a variação de volume estrutural associada à solvatação dos prótons libertados na solução é de $\Delta V_1 = -5,38 \pm 1,05 \text{ ml mol}^{-1}$, um valor concordante com o resultado calculado por Bonetti et al.⁹⁶ e Viappiani et al.⁹⁷ ($\Delta V = -5,2 \pm 0,4 \text{ ml mol}^{-1}$). Por sua vez, entre o pH 10,30 e 11,50 encontramos na presença de dois processos. O primeiro, já descrito anteriormente, e o segundo que corresponde à reação dos prótons H^+ com as espécies OH^- presentes na solução e consequente formação de moléculas de água:



Esta reação é caracterizada por estar associada a uma expansão do volume estrutural da solução. Segundo Bonetti et al.⁹⁶, acima de pH 10,25 estes dois processos deixam de ser distinguíveis e, portanto, não conseguem ser separados, sendo o ajuste feito apenas com uma exponencial. No entanto, isso não se verificou nesta experiência, sendo que foi possível separar estes dois processos entre o pH 10,30 e 11. Neste último valor de pH, de interesse para o estudo do peptídeo *chignolin*, a variação de volume provocada pela formação de água é $\Delta V_2 = 17,00 \pm 2,80 \text{ ml mol}^{-1}$ e o tempo desta reação encontra-se na ordem dos 77 ns. Só a pH 11,50 é que as reações (17) e (18) deixam de ser distinguíveis, sendo detetadas juntas, pois quando a espécie OH^- se encontra em elevadas concentrações, ambos os processos são bastante rápidos.

A Figura 20 apresenta um exemplo de uma simulação de uma onda de *o*-NBA a pH 11 (a rosa) obtida a partir dos resultados da desconvolução. Esta desconvolução foi conseguida recorrendo a uma função caracterizada por possuir dois decaimentos exponenciais sequenciais. Cada decaimento é definido por um tempo de vida τ_i e uma amplitude, caracterizada pelo o parâmetro ϕ_i . O somatório destes dois decaimentos origina a onda ajustada (a rosa). Também se encontram ambos representados na Figura 20, sendo que o primeiro decaimento corresponde à libertação de prótons provenientes do *o*-NBA (equação 17) (a verde) e o segundo corresponde à protonação de espécies OH^- (equação 18) (a azul escuro). Como é possível observar, o primeiro componente (correspondente à fotólise do *o*-NBA) possui uma amplitude negativa, característica de uma contração de volume provocada pela solvatação, por parte das moléculas de água, de prótons H^+ e do anião formado. Em contrapartida, a onda correspondente à protonação de grupos hidroxilo possui uma amplitude positiva e encontra-se deslocada para a direita, quando comparada com a onda fotoacústica (a preto). Assim, este processo pode ser caracterizado por uma expansão de volume, tal como se encontra representado na Tabela 4.

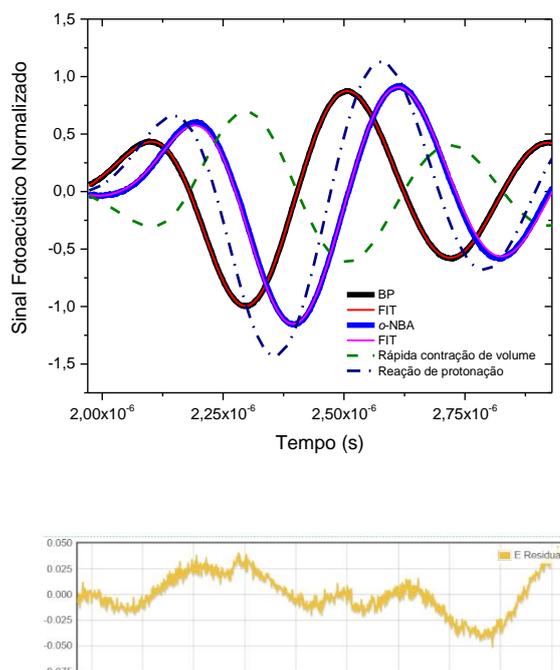


Figura 20: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de aproximadamente 1,3 mJ para a molécula de o-NBA a pH 11 e utilizando um transdutor de 2,25 MHz. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do fotoácido e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻, representada a tracejado azul escuro.

3.2. Salto de pH induzido por laser

Para determinar a magnitude do salto de pH, é fundamental conhecer o número de fótons e o volume irradiado de moléculas de fotoácido nas condições experimentais utilizadas. Os cálculos necessários no estudo da magnitude deste salto de pH encontram-se expostos na Tabela 5. Todas as experiências fotoacústicas foram realizadas utilizando quatro intensidades de laser distintas, que variam entre os 300 μJ e os 1,3 mJ, com o objetivo de ter em consideração a possibilidade de existirem processos de absorção não linear sob intensa fluência de laser⁷⁵. Sendo a energia de um fóton a 355 nm de $5,59 \times 10^{-19} \text{ J}$ ($E = h\nu$), o número de moles de fótons produzidos por pulso de laser são $8,81 \times 10^{-10}$ a 300 μJ e $3,86 \times 10^{-9}$ a 1,3 mJ.

A fração de moléculas do fotoácido que absorvem fótons pode ser calculada, considerando a geometria da célula, com um espelho que permite a dupla irradiação da amostra, o comprimento do percurso de irradiação muito fino (espessura celular de 0,127 mm), e a absorvância do o-NBA a 355 nm ($\sim 0,6$). Posto isto, é possível calcular o número absoluto de moléculas fotoácidas que absorvem os fótons e, conhecendo o

rendimento quântico da fotodissociação desta molécula ($\Phi_{\text{O-NBA}} = 0,4$)⁶⁸, podemos calcular o número de prótons injetados no volume absorvente. Uma vez que foram sempre utilizadas concentrações de amostras superiores a 200 μM , a quantidade de moléculas na área sob irradiação (um valor mínimo de $1,22 \times 10^{-10}$) foi sempre superior ao número de prótons formados (um máximo de $5,3 \times 10^{-11}$ mol). Sabendo que o volume da amostra irradiada é de aproximadamente $1,22 \times 10^{-6} \text{ dm}^3$ (diâmetro de pulso laser de 3,5 mm), se o pH inicial (pH pré-pulso) for de 11, o pH de pós pulso obtido é de 4,4.

Tabela 5: Determinação da magnitude do salto de pH.

Energia do pulso de laser (mJ)	Número de fótons (mol)	Fração das moléculas de <i>o</i> -NBA que absorvem	Número de moléculas de <i>o</i> -NBA que absorvem (mol)	Número de prótons libertados (mol)	Concentração adicional de prótons (ΔH^+) ⁵ (M)	pH _{inicial}	pH _{final}
1,3	$3,86 \times 10^{-9}$	0,0345	$1,33 \times 10^{-10}$	$5,32 \times 10^{-11}$	$4,36 \times 10^{-5}$	11	4,36
0,30	$8,91 \times 10^{-10}$	0,0345	$3,07 \times 10^{-11}$	$1,23 \times 10^{-11}$	$1,01 \times 10^{-5}$	11	4,99

Número de fótons = $E_{\text{laser}}/E_{\text{fotão}}/N_A$, onde $E_{\text{fotão}} = hc/\lambda$. $h = 6,626010 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$; $c = 3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$; $\lambda = 355 \text{ nm}$; $N_A = 6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Fração das moléculas de *o*-NBA que absorvem = $(1-10^{-\text{Abs}})$. Abs = percurso ótico da célula fotoacústica X absorção (1cm). percurso ótico da célula fotoacústica = 0,254 mm.

Número de moléculas de *o*-NBA que absorvem = Número de fótons x Fração das moléculas de *o*-NBA que absorvem.

Número de prótons libertados = Número de moléculas de *o*-NBA que absorvem x rendimento quântico de fotodissociação (Φ). $\Phi_{\text{o-NBA}} = 0,4$.

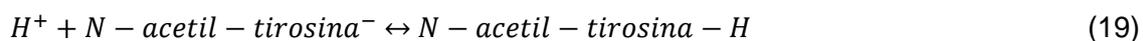
Concentração adicional de prótons ΔH^+ = Número de prótons libertados / $V_{\text{irradiado}}$. $V_{\text{irradiado}} = \pi \times r_{\text{pulso de laser}} \times \text{espessura da célula}$. $r_{\text{pulso de laser}} = 0,175 \text{ cm}$; espessura da célula = 0,127 mm.

$\text{pH}_{\text{final}} = -\log (10^{-\text{pH}_{\text{inicial}}} + \Delta H^+)$.

4. SOLUÇÃO DE o-NBA E Ac-Tyr-NH₂

Com os estudos de CD para o peptídeo *chignolin* (secção 1 do Capítulo 3), pudemos concluir que à medida que se aumenta o pH da solução, há uma perda da interação hidrofóbica Tyr2-Trp9, há também uma perda da percentagem de estrutura em folha- β e um conseqüente aumento da percentagem de *random coil*. Esta perda de estrutura- β é mais evidente a partir do pH 10,5, pois como foi mencionado nessa secção, julga-se que a desprotonação da cadeia lateral do resíduo Tyr2, cujo pKa é de aproximadamente 10,3, possa ser a causa desta perda de estrutura secundária. Assim, com o propósito de tentar compreender a importância que este aminoácido tem na estabilidade e na conformação do *chignolin*, foram realizados estudos de calorimetria fotoacústica com o modelo de aminoácido Ac-Tyr-NH₂ e posteriormente com o peptídeo, partindo do pH 11, onde a cadeia lateral da Tyr se encontra maioritariamente desprotonada, e alcançando um pH final a variar entre 4,4 e 5, pH's ao qual a cadeia lateral da Tyr se encontra protonada e a estrutura do peptídeo é maioritariamente constituída por folha- β .

Com o objetivo de determinar a constante de velocidade correspondente à protonação da tirosina (equação 19), bem como as alterações de volume estrutural associadas a esta reação, estas experiências de calorimetria fotoacústica foram realizadas recorrendo ao método de duas temperaturas, usando diferentes concentrações do aminoácido, compreendidas entre os 0 e os 2 mM. As ondas de o-NBA e de Ac-Tyr-NH₂ foram recolhidas à temperatura $T_{\beta=0} = 1,80^{\circ}\text{C}$, enquanto que as ondas do BP foram recolhidas a uma temperatura ligeiramente superior ($T_{\beta\neq 0} = 6^{\circ}\text{C}$).



A Figura 21 é representativa das ondas fotoacústicas obtidas com diferentes concentrações de Ac-Tyr-NH₂ a um pH de 11. Nesta figura também se encontram representadas as ondas da referência fotoacústica, recolhidas a um pH de 9. Estas experiências foram realizadas com dois transdutores, um de 2,25 MHz (Figura 21 (A)) e outro de 1 MHz (Figura 21 (B)), sendo este último mais sensível a reações com tempos de vida mais longos.

Numa breve análise qualitativa pode-se observar que estas ondas possuem um comportamento bastante distinto quando comparadas com as ondas que apenas possuem o fotoácido em solução, variando em amplitude e fase. Esta diferença pode ser justificada pela existência de um terceiro processo, anteriormente descrito na

equação 19. Estamos, portanto, a falar da protonação da cadeia lateral do modelo de aminoácido Ac-Tyr-NH₂, que a pH 11 se encontra maioritariamente na sua forma desprotonada. Além disso, também é possível afirmar que esta reação de protonação é dependente da concentração de grupos aceitadores de prótons, pois, à medida que a concentração destes grupos aumenta, as ondas fotoacústicas tendem a deslocar-se progressivamente em fase e a amplitude destas ondas tende a diminuir.

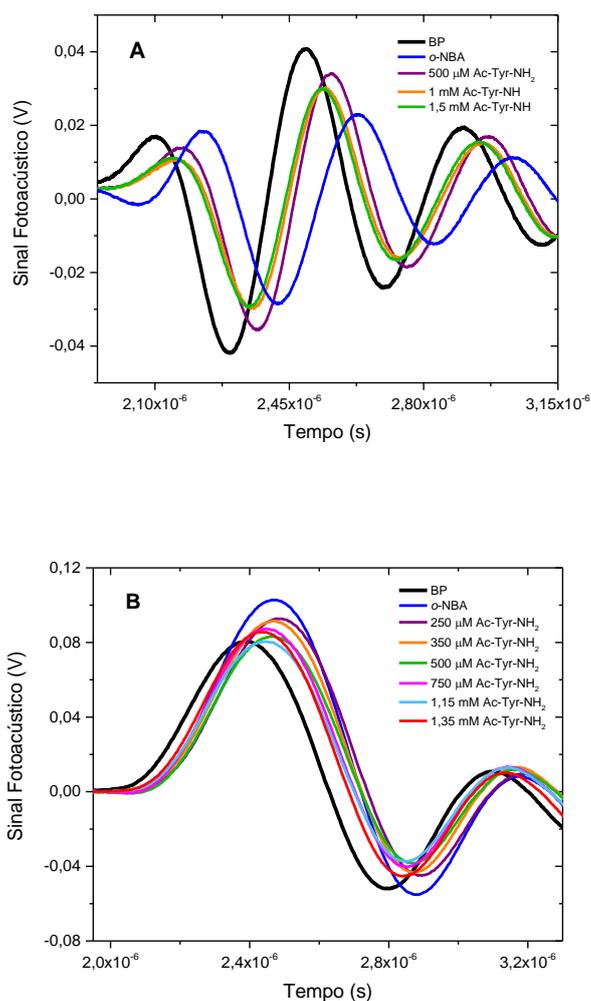


Figura 21: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e Ac-Tyr-NH₂ em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas, utilizando um transdutor de (A) 2,25 MHz e outro de (B) 1MHz. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^{\circ}\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e Ac-Tyr-NH₂ foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta = 0} = 1,80^{\circ}\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ.

4.1. Estudos com um transdutor de 2,25 MHz:

Para as ondas fotoacústicas do modelo de aminoácido Ac-Tyr-NH₂ obtidas com o auxílio do transdutor de 2,25 MHz, o seu ajuste foi obtido recorrendo a uma função envolvendo dois decaimentos exponenciais sequenciais, sendo que o primeiro corresponde à fotólise do o-NBA e o segundo corresponde à protonação das espécies OH⁻ e da cadeia lateral da tirosina, que a pH 11 contem um grupo hidroxilo carregado negativamente. Este ajuste encontra-se ilustrado na Figura 22. Tal como foi observado na Figura 20, o primeiro decaimento possui uma amplitude negativa, característica de uma contração de volume. Por sua vez, o segundo decaimento possui uma amplitude positiva e a sua onda encontra-se deslocada para a direita, quando comparada com a onda fotoacústica. Isto permite concluir que, em conjunto, a protonação de espécies OH⁻ e a protonação da cadeia lateral da tirosina estão associados a uma expansão volumétrica. Também é possível observar que a cinética destes dois processos juntos é mais rápida que a cinética da protonação de espécies OH⁻.

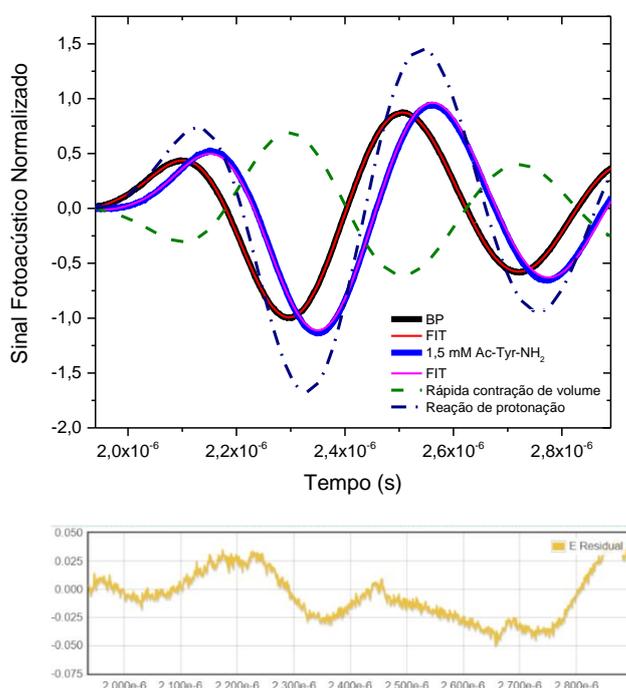


Figura 22: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,5 mM de Ac-Tyr-NH₂ a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas da Ac-Tyr-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, representada a tracejado azul escuro.

A Tabela 6 apresenta os resultados da desconvolução das ondas experimentais de Ac-Tyr-NH₂ a várias concentrações, bem como as respetivas variações de volume, calculadas a partir da equação (11). Ao observar esta tabela, é possível concluir que, de uma forma geral, com o aumento da concentração do modelo de aminoácido Ac-Tyr-NH₂, o tempo (τ_2) correspondente às duas reações de protonação (equação 18 e 19) diminui, bem como a expansão de volume associada a estes processos (ΔV_2). Esta diminuição do ΔV_2 pode ser devida ao facto de haver uma competição entre a protonação das espécies OH⁻ e a protonação dos grupos aceitador de prótons que se encontram na cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, estando este último processo associada a expansões volumétricas inferiores, quando comparadas com a expansão volumétrica provocada pela formação de água.

Tabela 6: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tyr-NH₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

[Ac-Tyr-NH ₂] (M)	ϕ_1	ϕ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
0	-0,65±0,17	1,91±0,31	<1	76,90±24	-5,78±1,50	17,00±2,80
2,5x10 ⁻⁴	-0,57±0,02	1,78±0,17	<1	35,10±2,4	-5,07±0,19	15,82±1,53
3,5x10 ⁻⁴	-0,58±0,07	1,99±0,48	<1	41,35±11	-5,15±0,65	17,67±4,29
5x10 ⁻⁴	-0,55±0,18	1,64±0,18	<1	39,40±6,0	-4,86±1,65	14,62±1,60
1x10 ⁻³	-0,58±0,12	1,48±0,14	<1	35,10±4,5	-5,60±1,10	13,70±1,38
1,5x10 ⁻³	-0,64±0,09	1,36±0,18	<1	27,30±6,3	-6,07±0,84	13,09±1,58
2x10 ⁻³	-0,45±0,02	1,46±0,18	<1	21,20±3,9	-5,43±0,15	13,86±1,53

Com os valores apresentados nestas tabelas foi possível traçar os gráficos correspondentes à variação da constante de velocidade total ($k_T = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de prótons de Ac-Tyr-NH₂ (Figura 23(A)) e à variação do volume de expansão também em função da concentração de grupos aceitadores de prótons de Ac-Tyr-NH₂ (Figura 23(B)). Após a obtenção destes dados, o objetivo seguinte baseou-se no cálculo da constante de velocidade da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ (k_{TYR}) e no cálculo do volume correspondente a este processo, uma vez que os tempos e os volumes obtidos na desconvolução dos sinais fotoacústicos, que se encontram representados acima (Tabela 6), correspondem à soma do volume da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ e das espécies OH⁻.

Considerando que a concentração das espécies H⁺ é constante e se encontra em concentrações bastante inferiores à concentração de OH⁻ e Ac-TyrNH₂, a cinética deste sistema pode ser definida por reações paralelas de primeira ordem. As

equações cinéticas correspondentes a estas reações, anteriormente descritas em (18) e (19), podem ser descritas por:

$$\frac{d[H^+]}{dt} = -k_{H_2O}[H^+] - k_{Tyr}[H^+] = k_T[H^+] \quad (20)$$

$$\frac{d[OH^-]}{dt} = k_{H_2O}[H^+] \quad (21)$$

$$\frac{d[Tyr^-]}{dt} = k_{Tyr}[H^+] \quad (22)$$

$$k_T = k_{Tyr}[Tyr^-] + k_{H_2O}[OH^-] \quad (\text{do tipo: } y = mx + b) \quad (23)$$

Considerando a equação (23), é possível calcular a cinética de protonação da cadeia lateral da Ac-Tyr-NH₂, uma vez que esta é dada pelo declive da regressão linear apresentada na Figura 23 (A). Assim sendo, obteve-se $k_{Tyr} = 8,5 \times 10^9 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por sua vez, a constante cinética correspondente à protonação dos grupos hidroxilo é dada pela interceção de reta do ajuste com o eixo dos y's, $k_{H_2O} = 2,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, um valor ligeiramente inferior ao valor representado na literatura ($k_{H_2O} = 4,9 \times 10^{10} \pm 0,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁹⁶). Esta pequena diferença pode ser justificada pelo ambiente químico em que estas moléculas se encontram, uma vez que o solvente utilizado durante estas experiências possui uma elevada concentração de sais (100 mM de NaCl), que podem originar uma diminuição da constante cinética.

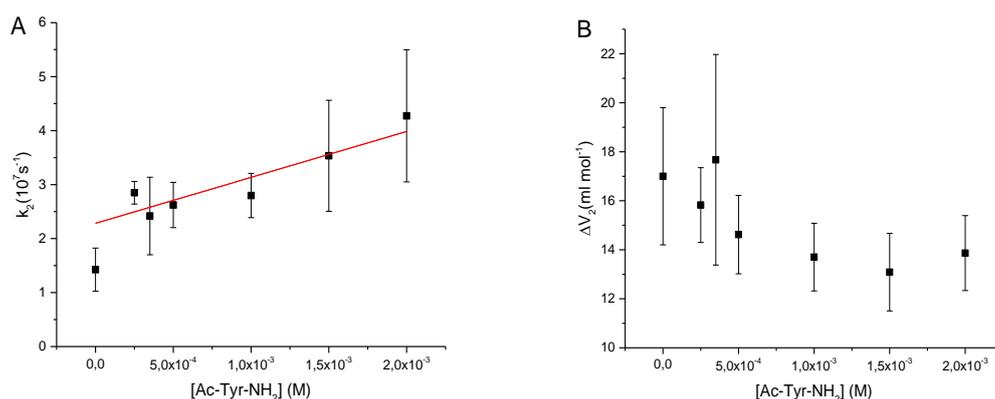


Figura 23: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de prótons do modelo Ac-Tyr-NH₂, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) das constantes de velocidade totais em função da concentração de aceitadores de prótons. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH⁻ e pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, em função da concentração de grupos aceitadores de prótons da Ac-Tyr-NH₂.

Para calcular a alteração de volume correspondente à protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi necessário calcular a concentração formada para cada produto da reação (Tirosina protonada e H₂O). Para tal, empregaram-se as seguintes equações, que foram deduzidas a partir das equações (20) a (23):

$$[\text{Tyr}] = \frac{k_{\text{Tyr}}[\text{Tyr}^-][\text{H}^+]}{k_{\text{T}}} (1 - e^{-k_{\text{T}}t}) \quad (24)$$

$$[\text{H}_2\text{O}] = \frac{k_{\text{H}_2\text{O}}[\text{OH}^-][\text{H}^+]}{k_{\text{T}}} (1 - e^{-k_{\text{T}}t}) \quad (25)$$

A Figura 24 ilustra os gráficos obtidos a partir destas equações (equação (24) e (25)), sendo que o gráfico da Figura 24 (A) corresponde à concentração de Tyr⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr⁻, em função do tempo de reação. Por sua vez, a Figura 24 (B) corresponde à formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr⁻ que se encontra em solução, pois a concentração das espécies OH⁻ mantem-se sempre constante. A partir de um certo tempo podemos assumir que o equilíbrio (*plateau*) que foi atingido deriva do consumo, por parte das espécies Tyr⁻ e OH⁻, de todos os prótons H⁺ que foram libertados em consequência da fotólise do o-NBA. Sendo assim, é possível calcular a concentração total formada de cada um dos produtos de reação.

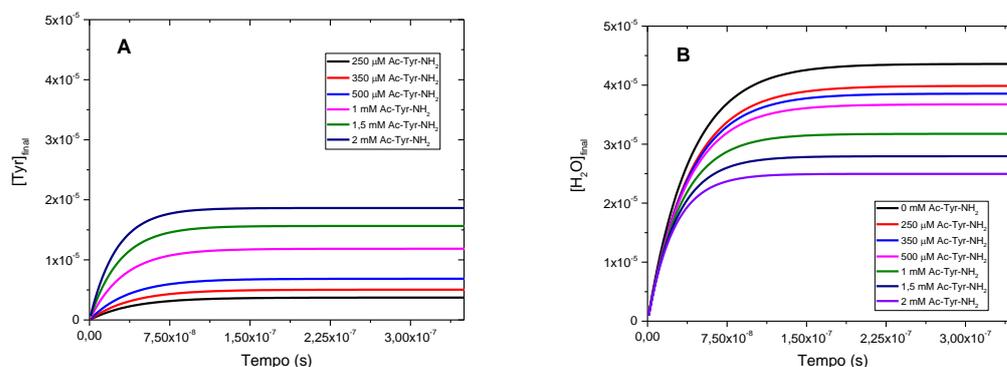


Figura 24: (A) Concentração de Tyr⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr⁻, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr⁻ que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

Posteriormente, traçou-se um gráfico relativo à variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada (dado obtido a partir dos gráficos da Figura 24) e realizou-se no final uma extrapolação para zero, permitindo assim calcular a variação de volume derivada da

protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ (Figura 25). Assim, tem-se $\Delta V_{\text{Tyr}} = 7,56 \pm 0,88 \text{ ml mol}^{-1}$. Esta expansão de volume acontece porque quando as espécies Ac-Tyr-NH₂ se encontram no seu estado desprotonado, há uma solvatação destes resíduos por parte das moléculas de água e, portanto, após o processo de protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, deixa de existir esta solvatação, havendo assim uma maior desorganização das moléculas de água e conseqüentemente uma expansão volumétrica.

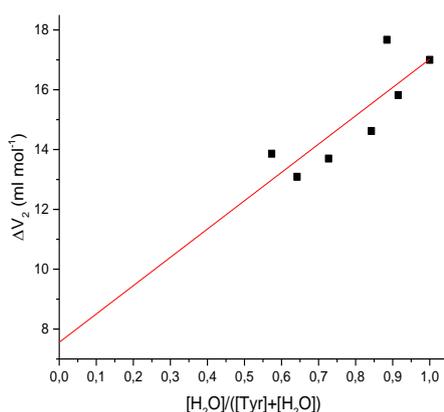


Figura 25: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H₂O formada.

4.2. Estudos com um transdutor de 1 MHz:

A desconvolução das ondas de Ac-Tyr-NH₂ obtidas com o transdutor de 1 MHz (Figura 21 (B)) foi feita de duas formas: recorrendo a um decaimento exponencial (Figura 26 (A)) e a dois decaimentos (Figura 26 (B)). Os gráficos correspondentes a estas desconvoluções encontram-se apresentados abaixo. Ao contrário das análises anteriores, para se obter um ajuste ótimo com este transdutor teve de se selecionar apenas a primeira parte da onda fotoacústica, correspondente a meio comprimento de onda. Casos em que a onda era selecionada na sua totalidade, comprometiam o bom funcionamento do programa C-PAC. Através da comparação do gráfico B da Figura 26 com o gráfico da Figura 22 é possível realizar uma primeira observação. Com este último transdutor, a amplitude da componente da onda correspondente ao processo de fotólise do o-NBA é inferior à amplitude observada com o transdutor de 2,25 MHz, o que pode levar a que as variações de volume associadas a este processo sejam menores.

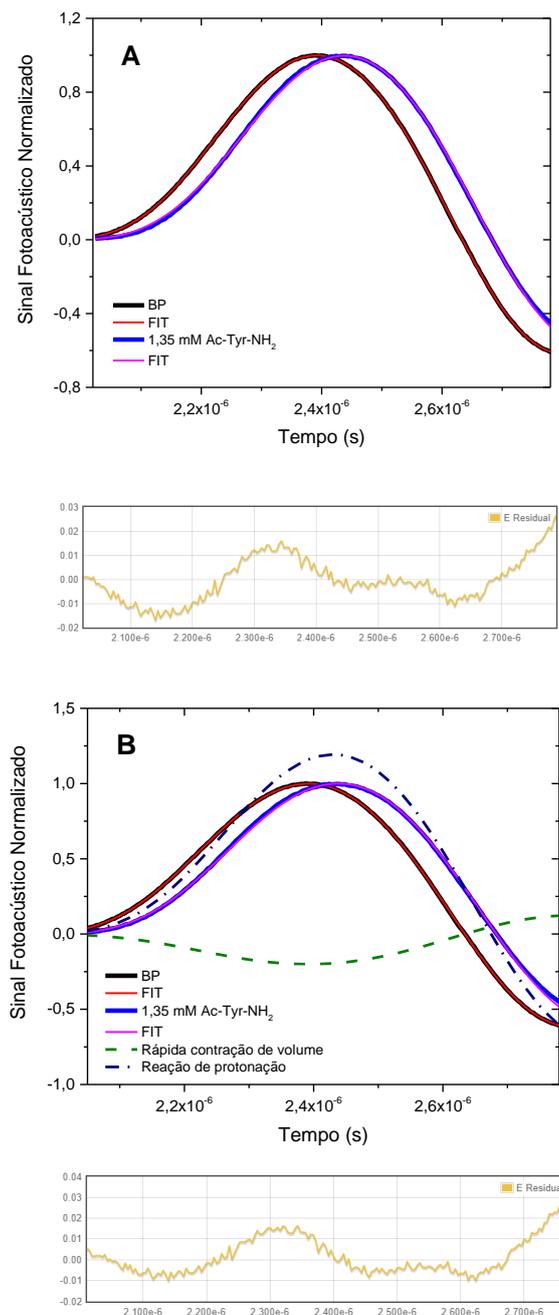


Figura 26: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,35 mM de Ac-Tyr-NH₂ a pH 11, (A) utilizando um decaimento exponencial e (B) utilizando dois decaimentos. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas da Ac-Tyr-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. No caso do gráfico (B), esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração de volume provocada pela fotólise do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, representada a tracejado azul escuro.

Na análise recorrendo a apenas um decaimento exponencial (Tabela 7), tanto a variação de volume observada, bem como o respetivo tempo de vida, correspondem aos três processos já anteriormente mencionados. Tendo isto em conta, é normal que os valores da expansão volumétrica sejam inferiores, pois a contração de volume provocada pela reação de fotólise do o-NBA também se encontra representadas nestes valores.

Tabela 7: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Tyr-NH₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz. Estes resultados foram obtidos recorrendo a apenas um decaimento exponencial.

[Ac-Tyr-NH ₂] (M)	ϕ	τ (ns)	ΔV (ml mol ⁻¹)
0	1,34±0,09	111,53±14	11,98±0,81
2,5x10 ⁻⁴	1,29±0,05	129±9,2	11,44±0,50
3,5x10 ⁻⁴	1,18±0,08	104,33±7,5	10,33±0,73
5x10 ⁻⁴	1,16±0,04	98,7±7,8	10,30±0,37
7,5x10 ⁻³	1,11±0,06	74,6±9,8	9,93±0,54
1,15x10 ⁻³	1,02±0,04	69±3,5	9,11±0,35
1,35x10 ⁻³	1,01±0,08	59,7±5,0	9,0±0,76

A Tabela 8 apresenta os resultados da desconvolução das ondas experimentais de Ac-Tyr-NH₂ a várias concentrações, bem como as respetivas variações de volume, quando, obtidos com a utilização de dois decaimentos exponenciais. Numa primeira análise, pode-se observar que os valores obtidos no parâmetro ΔV_1 (~ -1,37 ml mol⁻¹) são muito baixos, quando comparado com o valor obtido com o transdutor de 2,25 MHz ($\Delta V_1 = -5,78$ ml mol⁻¹), volume concordante com os valores descritos na literatura ($\Delta V = -5,2$ ml mol⁻¹)^{96,97}. Como tal, tentou-se fixar os valores dos parâmetros ϕ_1 e τ_1 para a média do valor obtido utilizando o transdutor de 2,25 MHz ($\phi_1 = -0,65$; $\tau_1 < 1$). No entanto, houve uma grande dificuldade em obter um bom ajuste e os valores obtidos para a constante de velocidade da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, bem como a respetiva variação de volume, não possuíam qualquer significado científico. Portanto, o facto de se observarem valores mais baixos para o parâmetro ϕ_1 e conseqüentemente para a variação volumétrica observada com este transdutor, pode ser justificada pela baixa sensibilidade que este aparelho apresenta quando é exposto a determinados processos que ocorrem numa escala temporal mais rápida (na ordem das dezenas de nanossegundos).

Tabela 8: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de *o*-NBA e Ac-Tyr-NH₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz. Estes resultados foram obtidos recorrendo a dois decaimentos exponenciais, onde nenhuma componente foi fixada.

[Ac-Tyr-NH ₂] (M)	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
0	-0,22±0,09	1,63±0,12	<1	108,01±11,77	-1,95±0,81	14,52±1,04
2,5x10 ⁻⁴	-0,17±0,05	1,40±0,08	<1	106,0±2,86	-1,52±0,50	12,46±0,75
3,5x10 ⁻⁴	-0,19±0,08	1,30±0,10	<1	85,77±9,24	-1,69±0,73	11,58±0,59
5x10 ⁻⁴	-0,11±0,04	1,23±0,04	<1	87,20±2,53	-0,98±0,37	10,98±0,34
7,5x10 ⁻³	-0,20±0,06	1,28±0,07	<1	66,07±6,24	-1,03±0,54	11,33±0,44
1,15x10 ⁻³	-0,14±0,04	1,40±0,03	<1	57,80±1,21	-1,23±0,35	10,15±0,28
1,35x10 ⁻³	-0,18±0,08	1,17±0,04	<1	51,13±5,75	-1,19±0,76	10,54±0,38

Tal como foi feito no subcapítulo anterior, com os valores apresentados nestas tabelas (Tabela 7 e 8), foi possível traçar os gráficos correspondentes à variação constante cinética total ($k_T = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de prótons da Ac-Tyr-NH₂ (Figura 27 (A)) e à variação do volume de expansão também em função da concentração de grupos aceitadores de prótons da Ac-Tyr-NH₂ (Figura 27 (B)). Após a obtenção destes dados, procedeu-se ao cálculo da constante de velocidade da protonação da cadeia lateral da Ac-Tyr-NH₂ (k_{Tyr}) e ao cálculo do volume correspondente a este processo. Para o cálculo da constante de velocidade da protonação da cadeia lateral da Ac-Tyr-NH₂, recorreu-se novamente ao uso da equação (23), tendo-se obtido $k_{Tyr} = 7,2 \times 10^9 \pm 0,07 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para um decaimento exponencial e $k_{Tyr} = 8 \times 10^9 \pm 0,60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para dois decaimentos exponenciais. Valores concordantes com o valor obtido com o transdutor de 2,25 MHz ($8,5 \times 10^9 \pm 0,50 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Em contrapartida, obtiveram-se valores mais baixos para as constantes cinéticas referentes à protonação dos grupos OH⁻: $k_{H_2O} = 6,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para um decaimento exponencial e $k_{H_2O} = 8,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para dois decaimentos exponenciais.

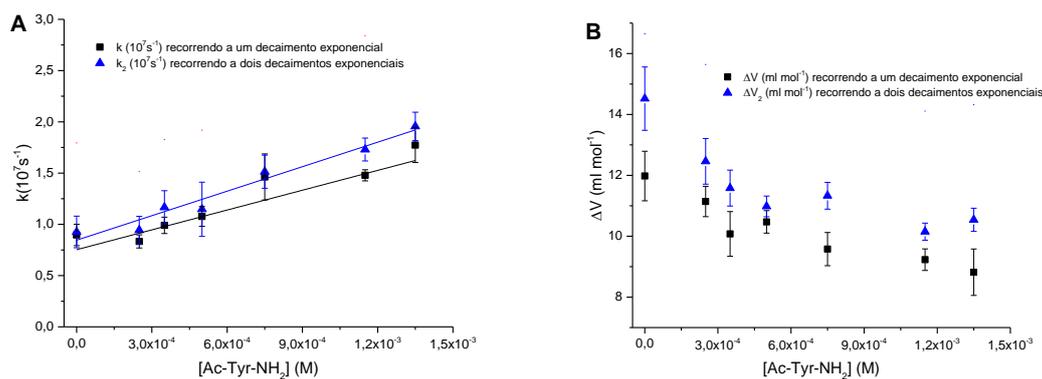


Figura 27: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de prótons do modelo Ac-Tyr-NH₂, utilizando um transdutor de 1 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha preta correspondente aos valores obtidos com um decaimento exponencial e linha azul correspondente aos valores obtidos com dois decaimentos exponenciais) das constantes de velocidade totais em função da concentração de aceitadores de prótons. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH⁻ e pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, em função da concentração de grupos aceitadores de prótons da Ac-Tyr-NH₂. Os quadrados pretos são representativos dos valores obtidos com um decaimento exponencial, enquanto que os triângulos azuis representam os valores obtidos com dois decaimentos exponenciais.

Para calcular a variação de volume correspondente à protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂, focámo-nos na análise das ondas fotoacústicas que foram feitas recorrendo a dois decaimentos exponenciais. Este cálculo foi realizado através do mesmo procedimento apresentado na secção 4.1 deste capítulo, sendo que os gráficos abaixo apresentados (Figura 28) foram obtidos através das equações (24) e (25). Assim, enquanto que o gráfico da Figura 28 (A) corresponde à concentração de Tyr⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr⁻, em função do tempo de reação, a Figura 28 (B) corresponde à formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr⁻ que se encontra em solução, pois a concentração das espécies OH⁻ mantem-se sempre constante. Tal como foi referido na secção 4.1 deste capítulo, a partir de um certo tempo podemos assumir que o equilíbrio (*plateau*) que foi atingido deriva do consumo, por parte das espécies Tyr⁻ e OH⁻, de todos os prótons H⁺ que foram libertados em consequência da fotólise do o-NBA, sendo, portanto, possível calcular a concentração total formada de cada um dos produtos de reação.

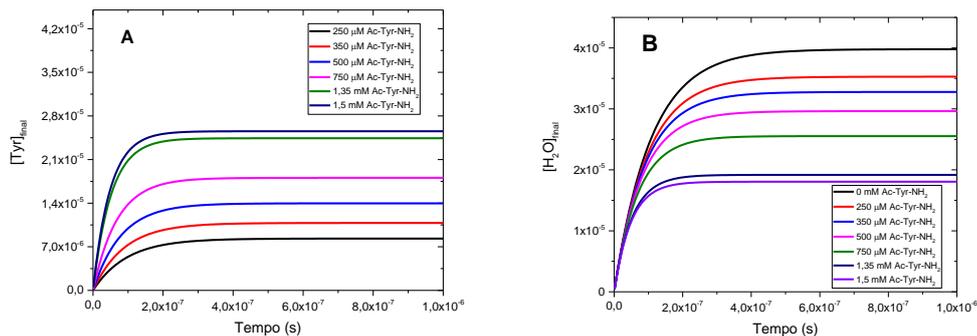


Figura 28: (A) Concentração de Tyr que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de Tyr, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de Tyr que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 1 MHz.

Após a obtenção do gráfico da Figura 28, foi possível traçar o gráfico da Figura 29. Como tal, os dados obtidos com dois decaimentos exponenciais indicam-nos que a variação volume correspondente ao processo de protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ é de $7,25 \pm 0,44 \text{ ml mol}^{-1}$, um resultado semelhante ao resultado adquirido anteriormente com o transdutor de 2,25 MHz ($7,56 \pm 0,88 \text{ ml mol}^{-1}$).

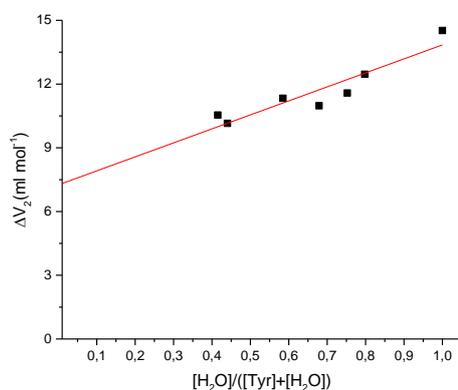


Figura 29: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H₂O formada.

5. SOLUÇÃO DE *o*-NBA E CHIGNOLIN: Protonação da cadeia lateral da Tyr2

Após o estudo da reação de protonação da cadeia lateral de Ac-Tyr-NH₂ procedeu-se ao estudo da mesma reação, mas com o peptídeo *chignolin*, que possui um resíduo de tirosina (Tyr2) na sua cadeia decapeptídica. O objetivo deste estudo foi comparar a variação de volume estrutural e a constante cinética desta reação de protonação quando o resíduo de tirosina se encontra em diferentes ambientes químicos. Para tal, utilizou-se um transdutor de 2,25 MHz. Na Figura 30 encontram-se ilustrados exemplos de ondas fotoacústicas obtidas com diferentes concentrações do peptídeo *chignolin* a um pH de 11. Pela análise destas ondas, é possível verificar um comportamento semelhante às ondas de Ac-Tyr-NH₂ previamente apresentadas na Figura 21 (A), ou seja, é evidente que a protonação do grupo hidroxilo da cadeia lateral da Tyr2 depende bastante da concentração de grupos aceitadores de prótons presentes em solução, pois, mais uma vez é possível observar uma deslocação progressiva em fase, bem como uma diminuição da amplitude das ondas.

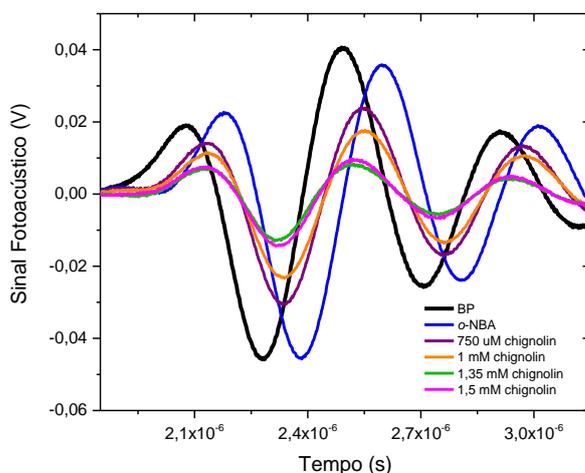


Figura 30: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de *o*-NBA e do peptídeo *chignolin* em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura $T_{\beta \neq 0} = 6,0^{\circ}\text{C}$, enquanto que as ondas de *o*-NBA e de *chignolin* foram obtidas a uma temperatura $T_{\beta = 0} = 1,80^{\circ}\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ.

O ajuste destas ondas (a rosa na Figura 31) também foi obtido recorrendo ao uso de dois decaimentos exponenciais sequenciais, sendo o primeiro decaimento correspondente à fotólise do *o*-NBA (a tracejado verde) e o segundo à protonação dos grupos OH⁻ e RO⁻ (a tracejado azul). O primeiro decaimento possui uma amplitude negativa, distintiva de uma contração de volume enquanto que, tal como esperado, o segundo decaimento possui uma amplitude positiva e encontra-se deslocada para a

direita, quando comparada com a onda fotoacústica, sendo assim caracterizado por levar a que ocorra expansão volumétrica.

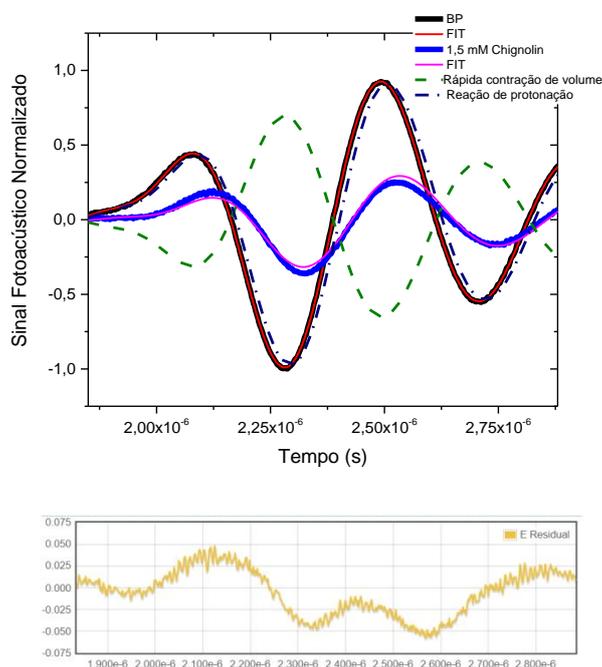


Figura 31: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,5 mM de chignolin a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do peptídeo e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻ e da cadeia lateral do resíduo Tyr2 presente no peptídeo, representadas a tracejado azul escuro.

A Tabela 9 apresenta os resultados da desconvolução das ondas experimentais do peptídeo *chignolin* a várias concentrações, bem como as respetivas variações de volume. Estes dados foram obtidos, recorrendo em alguns casos à fixação do parâmetro τ_1 .

Tabela 9: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de *o*-NBA e Chignolin em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

[Chignolin] (M)	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
0	-0,65±0,17	1,91±0,31	<1	76,90±24	-5,78±1,50	17,00±2,80
2,5x10 ⁻⁴	-0,61±0,08	1,29±0,19	<1	43,95±3,9	-5,47±0,69	11,49±1,67
3,5x10 ⁻⁴	-0,56±0,06	1,05±0,10	<1	44,10±5,4	-5,02±0,55	9,39±0,90
5x10 ⁻⁴	-0,56±0,08	1,08±0,12	<1	33,00±4,9	-5,00±0,70	9,61±1,09
6,25x10 ⁻⁴	-0,43±0,05	1,08±0,06	<1	34,80±2,90	-3,82±0,43	9,61±0,50
7,5x10 ⁻⁴	-0,46±0,21	1,11±0,23	<1	33,40±6,3	-4,14±1,88	9,91±2,02
1x10 ⁻³	-0,51±0,10	0,87±0,16	<1	24,73±5,3	-4,56±0,89	7,78±1,39
1,35x10 ⁻³	-0,45±0,03	0,75±0,14	<1	13,65±1,80	-3,99±0,29	6,72±1,19
1,5x10 ⁻³	-0,52±0,02	0,86±0,20	<1	14,75±2,37	-4,61±0,22	7,63±1,12

Com base nesta tabela, foram traçados os gráficos presentes na Figura 32 e recorrendo à equação (23) foi calculado o valor da constante de velocidade referente à protonação da cadeia lateral da Tyr2: $k_{\text{Tyr}} = 2,8 \times 10^{10} \pm 0,33 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor é cerca de três vezes superior aos valores anteriormente obtidos com o modelo de aminoácido Ac-Tyr-NH₂. Existem duas hipóteses que podem justificar esta grande diferença. A primeira hipótese baseia-se no facto de o resíduo de tirosina, ao contrário do que acontece no modelo Ac-Tyr-NH₂, se encontrar inserido numa cadeia peptídica constituída por 10 aminoácidos. Assim sendo, o ambiente químico onde esta molécula se encontra inserida é substancialmente diferente (campo elétrico diferente, que possui um papel importante na regulação da energia de ativação de uma reação; presença de diferentes forças electroestáticas; diferente alinhamento e diferentes distâncias entre as moléculas envolvidas na reação de protonação), o que pode originar uma grande variação na constante de velocidade da protonação da sua cadeia lateral. A segunda hipótese, igualmente possível, é que a cadeia lateral do resíduo de ácido glutâmico (Glu5) também esteja a ser protonada, pois o valor do seu pKa é de aproximadamente 4,3 e o salto de pH provocado pelo laser de nanossegundos atinge pH's próximos deste valor. Além disso, a constante de velocidade correspondente à protonação de um grupo carboxílico é sensivelmente $2,4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ⁴⁰, um valor bastante próximo ao obtido nesta experiência. Por último, também é importante referir que o valor obtido para $k_{\text{H}_2\text{O}}$ foi de $1,4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

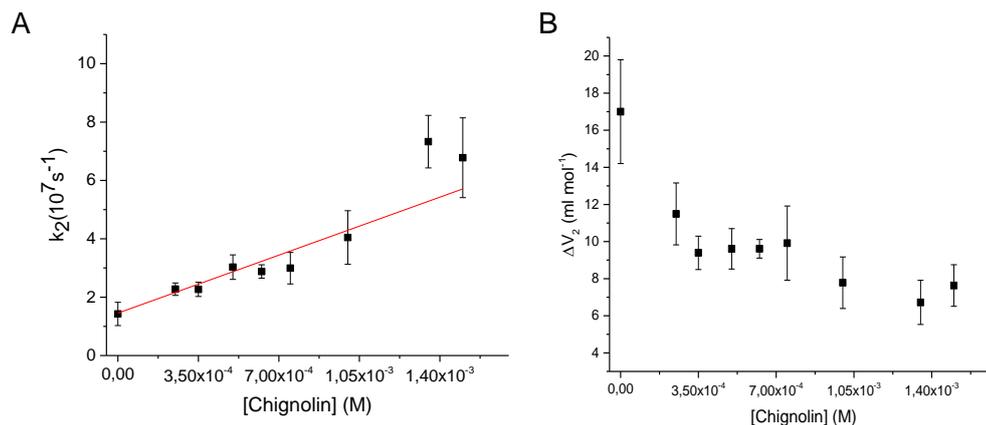


Figura 32: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração de grupos aceitadores de prótons do peptídeo chignolin, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A constante cinética da protonação da cadeia lateral destes grupos aceitadores de prótons foi calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) das constantes de velocidade totais em função da concentração de aceitadores de prótons. (B) Variação do volume da solução provocada pela protonação de espécies OH^- e pela protonação da cadeia lateral de Tyr2, em função da concentração de grupos aceitadores de prótons.

Por último, para calcular a variação de volume correspondente à protonação da cadeia lateral da Tyr2, recorreremos novamente às equações (24) e (25) para traçar os gráficos abaixo apresentados (Figura 33). Portanto, enquanto que o gráfico da Figura 33 (A) corresponde à concentração de Tyr2⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de *chignolin*, em função do tempo de reação, a Figura 33 (B) corresponde à formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de *chignolin* que se encontra em solução, pois a concentração das espécies OH^- mantem-se sempre constante. Tal como foi referido na secção 4.1 deste capítulo, a partir de um certo tempo podemos assumir que o equilíbrio (*plateau*) que foi atingido deriva do consumo, por parte das espécies Tyr2⁻ e OH^- , de todos os prótons H^+ que foram libertados em consequência da fotólise do *o*-NBA, sendo, portanto, possível calcular a concentração total formada de cada um dos produtos de reação.

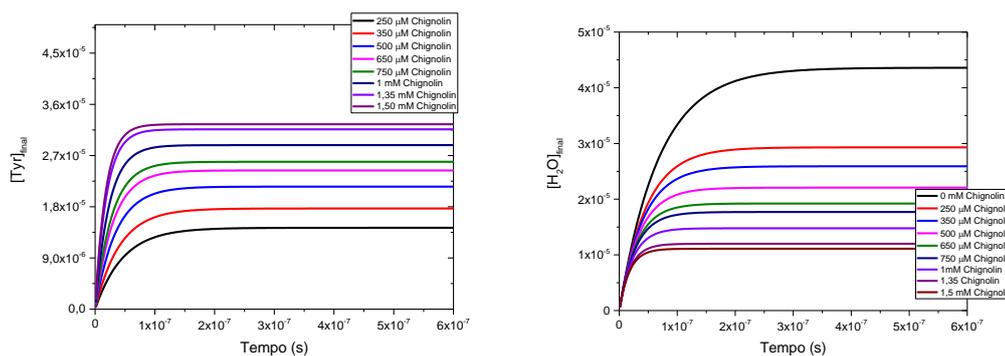


Figura 33: (A) Concentração de Tyr²⁻ que é protonada, a partir de uma dada concentração inicial de chignolin, em função do tempo de reação. (B) Formação de água em função do tempo de reação, tendo em conta a concentração inicial de chignolin que se encontra em solução, utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

A Figura 34 apresenta o gráfico relativo à variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada, bem como a extrapolação realizada (linha vermelha) para se conseguir obter esta variação de volume. Assim, é possível concluir que $\Delta V_2(\text{HChignolin}) = 3,75 \pm 0,57 \text{ ml mol}^{-1}$. Tal como aconteceu com a constante de velocidade, esta variação de volume é diferente do valor obtido com o modelo Ac-Tyr-NH₂ ($\Delta V_2 \sim 7,40 \text{ ml mol}^{-1}$). Além das duas hipóteses apresentadas anteriormente (diferente ambiente químico e protonação da cadeia lateral do resíduo Glu5), surge ainda uma terceira hipótese, pois, uma vez que estamos na presença de um peptídeo bastante dinâmico, também é possível que este transdutor esteja a detetar um quarto processo na ordem das poucas dezenas de nanossegundos, relativo já a movimento conformacional do *chignolin*. Este processo estaria assim associado a uma contração volumétrica, algo que justificaria esta diminuição do volume associado à protonação do resíduo Tyr².

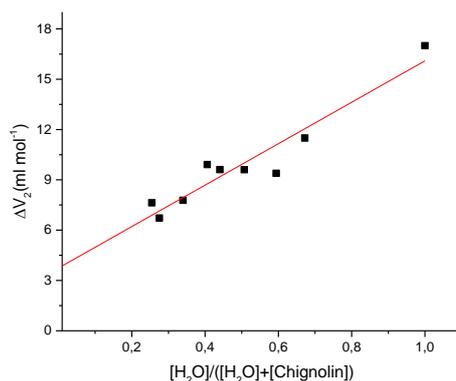


Figura 34: Variação de volume total obtido pela desconvolução das ondas fotoacústicas em função da percentagem de H₂O formada. A variação de volume provocada pela protonação da cadeia lateral da Tyr2 calculada a partir do declive da relação linear (linha vermelha) da variação de volume total em função da percentagem de H₂O formada.

6. Solução de o-NBA e Ac-Trp-NH₂

Tal como foi discutido na secção 2 do Capítulo 1, o resíduo Trp9 estabelece ligações hidrofóbicas importantes à estabilidade do peptídeo *chignolin*, com o resíduo Tyr2. Assim sendo, também foram realizados estudos de calorimetria fotoacústica com o modelo Ac-Trp-NH₂ com o transdutor de 2,25 MHz. Uma vez que este aminoácido não possui uma cadeia lateral que possa sofrer ionização e posterior protonação derivada da fotólise do fotoácido o-NBA, o esperado seria que com a variação da concentração deste modelo, os resultados obtidos fossem sempre semelhantes aos resultados adquiridos quando apenas existia o-NBA em solução, pretendendo assim comprovar a veracidade desta técnica. De facto, quando observamos as ondas fotoacústicas representadas na Figura 35, não existe nenhum padrão que possa ser seguido. Ao contrário das ondas apresentadas na Figura 21 (A) para o modelo Ac-Tyr-NH₂, estas ondas não se deslocam progressivamente em fase à medida que a concentração do modelo Ac-Trp-NH₂ aumenta e a sua amplitude também não varia de forma linear.

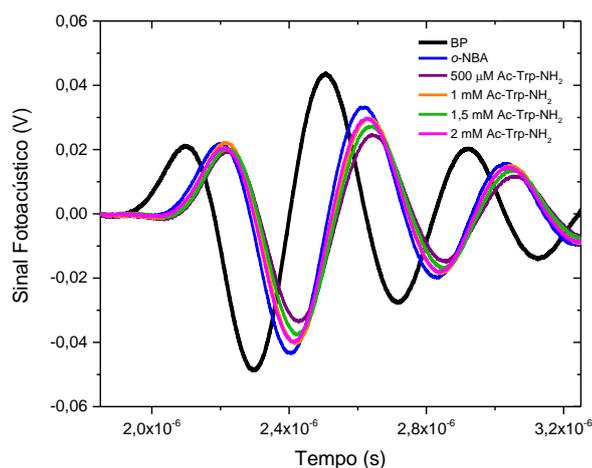


Figura 35: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e Ac-Trp-NH₂ em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas, utilizando um transdutor de 2,25 MHz. A onda T foi obtida a uma temperatura $T\beta \neq 0 = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e Ac-Trp-NH₂ foram obtidas a uma temperatura $T\beta = 0 = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ.

A Figura 36 apresenta um exemplo de uma simulação de uma onda de Ac-Trp-NH₂ em pH 11 (a rosa) obtida a partir dos resultados da desconvolução. Esta desconvolução foi conseguida recorrendo a uma função caracterizada por possuir dois decaimentos exponenciais sequenciais. Analisando este gráfico é possível observar que esta onda possui um comportamento bastante idêntico à onda fotoacústica do fotoácido anteriormente apresentada na Figura 20. Tal como acontece com esta onda, o primeiro decaimento corresponde à libertação de prótons provenientes do o-NBA (a tracejado verde) e o segundo corresponde à protonação de espécies OH⁻ (a tracejado azul escuro). Podemos então chegar à conclusão que a presença de moléculas de Ac-Trp-NH₂ em solução não tem qualquer tipo de influência no comportamento das ondas de o-NBA.

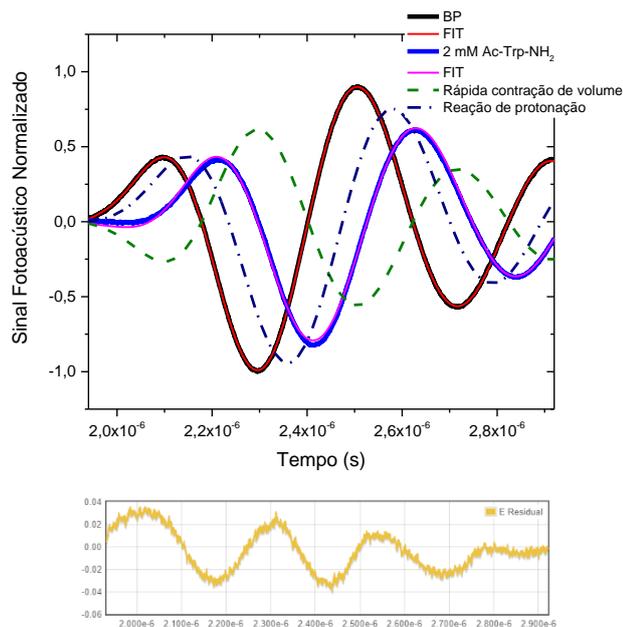


Figura 36: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 2 mM de Ac-Trp-NH₂ a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do Ac-Trp-NH₂ e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, associadas à rápida contração do o-NBA, representada a tracejado verde, e à reação de protonação de espécies OH⁻, representada a tracejado azul escuro.

A Tabela 10 apresenta os resultados da desconvolução das ondas experimentais do Ac-Trp-NH₂ a várias concentrações, bem como as respetivas variações de volume, calculadas a partir da equação (11) e tal como foi mencionado acima, não existe nenhum padrão lógico.

Tabela 10: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de o-NBA e Ac-Trp-NH₂ em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 2,25 MHz.

[Ac-Trp-NH ₂] (M)	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
0	-0,79±0,07	1,76±0,11	<1	88,30±0,07	-6,99±0,763	15,70±1,00
5x10 ⁻⁴	-0,76±0,08	1,52±0,14	<1	94,70±0,05	-6,78±0,62	13,49±1,25
1x10 ⁻³	-0,83±0,09	1,75±0,12	<1	98,00±0,09	-7,36±0,88	15,58±1,10
1,5x10 ⁻³	-0,81±0,05	1,49±0,14	<1	102,99±0,08	-7,23±0,45	13,30±1,27
2x10 ⁻³	-0,84±0,14	1,58±0,08	<1	83,00±0,19	-7,49±1,24	14,08±0,71

Após a obtenção dos dados acima apresentados (Tabela 10), procedeu-se ao cálculo da constante de velocidade da reação, que neste caso corresponde exclusivamente à reação de prótons H^+ com espécies OH^- e consequente formação de água. Como tal, tem-se $k_{H_2O} = 1,1 \times 10^{10} \pm 0,13 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\Delta V_2 = 14,43 \text{ ml mol}^{-1}$.

7. *Folding* do *Chignolin*

Após a extensa caracterização dos processos cinéticos de protonação da cadeia lateral do resíduo de tirosina, tanto isolado (modelo Ac-Tyr-NH₂), como incorporado no peptídeo, procedeu-se ao estudo cinético do rearranjo conformacional do *chignolin*, após se ter provocado uma perturbação no sistema (desprotonação da cadeia lateral do resíduo Tyr2). Este estudo só se pôde realizar com o auxílio do transdutor de 1 MHz, pois todas as tentativas de análise efetuadas com o transdutor de 2,25 MHz só nos permitiram observar o fenómeno de protonação da cadeia lateral do aminoácido Tyr2, uma vez que este transdutor possui dificuldades em integrar e resolver sinais com um tempo de vida superior a 400 ns, tornando-o assim pouco sensível na deteção de possíveis rearranjos estruturais.

Desta forma, ao longo das experiências realizadas, a concentração do peptídeo variou entre os 250 μM e os 1,35 mM. A Figura 37 ilustra alguns exemplos das ondas fotoacústicas obtidas ao longo destas experiências. Através de uma breve análise qualitativa, é possível observar que, enquanto que apenas se vê uma ligeira diferença na deslocação das ondas (à medida que a concentração do peptídeo aumenta não se vê um deslocamento progressivo em fase, tal como se podia observar nas experiências anteriores), existe uma diminuição significativa da sua amplitude, mesmo a concentrações mais baixas.

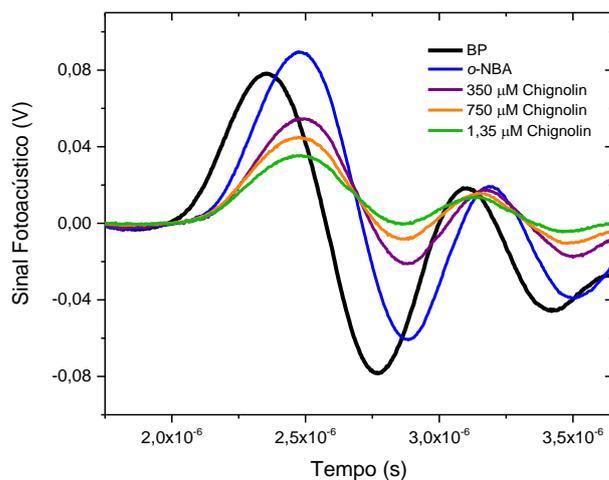


Figura 37: Ondas fotoacústicas da referência BP (Onda T) e das soluções de o-NBA e do peptídeo chignolin em 100 mM de NaCl, obtidas através do método de duas temperaturas. A onda T foi obtida a uma temperatura $T\beta \neq 0 = 6,0^\circ\text{C}$, enquanto que as ondas de o-NBA e de chignolin foram obtidas a uma temperatura $T\beta = 0 = 1,80^\circ\text{C}$. A energia do laser é de aproximadamente 1,3 mJ.

A Figura 38 apresenta um exemplo de uma simulação de uma onda de *chignolin* a pH 11 (a rosa) obtida a partir dos resultados da desconvolução. Esta desconvolução foi conseguida recorrendo a uma função caracterizada por possuir dois decaimentos exponenciais sequenciais. Estes decaimentos também se encontram representados na Figura 38. Como é possível observar, ao contrário de todos os resultados anteriormente apresentados, ambos os decaimentos possuem uma amplitude positiva, o que, como já foi mencionado, é consequência de uma expansão de volume. No entanto, o primeiro decaimento (linha tracejada verde) aparenta corresponder a uma reação bastante mais rápida, quando comparado com o segundo (linha tracejada e pontilhada azul). É de mencionar que, tal como aconteceu anteriormente com a análise das ondas fotoacústicas do modelo Ac-Tyr-NH₂ utilizando o transdutor de 1MHz, teve de se seleccionar apenas metade da onda fotoacústica para que fosse possível obter um bom ajuste.

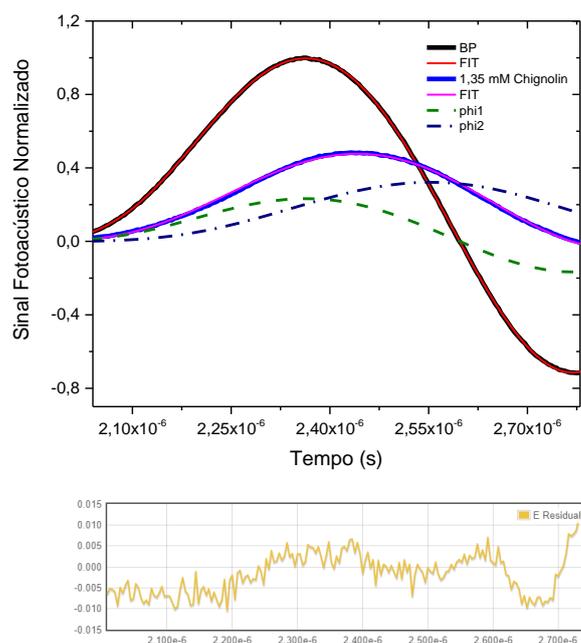


Figura 38: Ondas fotoacústicas obtidas após irradiação de um laser com uma energia de 1,3 mJ para 1,35 mM de chignolin a pH 11. O sinal da onda de referência BP, bem como o seu ajuste encontram-se representados a preto e vermelho, respetivamente. As ondas do peptídeo e o seu respetivo ajuste, derivado do resultado da desconvolução da onda, encontram-se representadas a azul e rosa, respetivamente. Esta linha rosa corresponde à soma de duas ondas componentes, a primeira associada ao processo de fotólise do o-NBA, à protonação de OH⁻ e da cadeia lateral da Tyr2 (tracejado verde) e a segunda associada a um rearranjo estrutural do peptídeo (tracejado azul escuro).

A Tabela 11 apresenta os resultados da desconvolução das ondas experimentais do peptídeo *chignolin* a várias concentrações, bem como as respetivas variações de volume, calculadas a partir da equação (11). Era de esperar que o primeiro decaimento exponencial englobasse os processos de fotólise do o-NBA, protonação das espécies OH⁻, protonação da cadeia lateral dos resíduos Tyr2 e eventualmente a protonação da cadeia lateral dos resíduos Glu5. O expectável seria que estes processos todos juntos originassem um ϕ_1 positivo e uma consequente expansão de volume. De facto, os valores apresentados na tabela são positivos. Contudo, tendo em conta os valores anteriormente obtidos com o transdutor de 2,25 MHz, era expectável que estes números fossem superiores. O facto de não o serem pode estar relacionado com a pouca sensibilidade que este transdutor tem para integrar e resolver sinais com um tempo de poucas dezenas de nanossegundos, uma questão que já foi levantada na análise das ondas fotoacústicas da Ac-Tyr-NH₂ também com este transdutor. Tudo isto faz com que os valores sejam obtidos por defeito.

Por sua vez, acredita-se que os valores de ϕ_2 e τ_2 estejam relacionados com alterações estruturais do peptídeo. Tal como foi referido na secção 1 do Capítulo 3,

através da análise dos dados de CD e em estudos realizados por Honda et al.⁵¹ este peptídeo encontra-se num equilíbrio entre a sua estrutura nativa e compacta e *random coil*. À medida que há um aumento do pH, este equilíbrio desloca-se no sentido da aquisição de *random coil* e quiçá da aquisição de conformações mais flexíveis, havendo assim uma perda progressiva da sua estrutura mais compacta e rígida. Portanto, após a protonação dos resíduos Tyr2, é esperado que o equilíbrio se desloque mais no sentido da estrutura nativa.

Tabela 11: Resultados da desconvolução dos sinais fotoacústicos puramente volumétricos de *o*-NBA e *chignolin* em 100 mM de NaCl e utilizando um transdutor de 1 MHz.

[<i>Chignolin</i>] (M)	φ_1	φ_2	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	ΔV_1 (ml mol ⁻¹)	ΔV_2 (ml mol ⁻¹)
0	-0,22±0,08	1,63±0,18	<1	108,10±0,11	-1,96±0,76	14,52±2,61
2,5x10 ⁻⁴	0,12±0,07	1,23±0,34	<1	187,50±21,64	1,08±0,62	10,98±3,00
3,5x10 ⁻⁴	0,18±0,08	1,20±0,16	<1	268,50±42,60	1,60±0,70	10,72±1,41
5x10 ⁻⁴	0,19±0,05	1,07±0,24	<1	260,50±34,63	1,71±0,43	9,49±2,13
7,5x10 ⁻⁴	0,24±0,06	1,22±0,25	<1	459,67±108,14	2,13±0,56	10,88±3,09
1,15 x10 ⁻³	0,21±0,03	0,90±0,21	<1	541,00±97,21	1,84±0,31	8,02±1,85
1,35 x10 ⁻³	0,23±0,08	1,36±0,19	<1	714,33±175,49	2,09±0,72	12,05±1,68

Recorrendo ainda à Tabela 11, podemos observar que à medida que a concentração do peptídeo aumente, há também um aumento do tempo deste processo, que julgamos que representa um rearranjo estrutural de uma parte considerável do peptídeo. A Figura 39 (A) corresponde à variação de $1/\tau_2$ em função da concentração de *chignolin*. Ao observar este gráfico verificamos que este possui a “forma” de um decaimento exponencial. Como tal, recorreu-se ao programa *OriginPro* para realizar um ajuste exponencial destes valores, sendo que aquele que apresentou melhores resultados tem como equação $y = A1\exp(-x/t1) + y0$. Após a obtenção desta equação realizou-se uma extrapolação para calcular o tempo que este processo demora (Figura 39 (B)), sendo que este tempo é conhecido quando os valores de $1/\tau_2$ atingem um *paleau*. Assim, tem-se $\tau = 1,15 \mu\text{s}$.

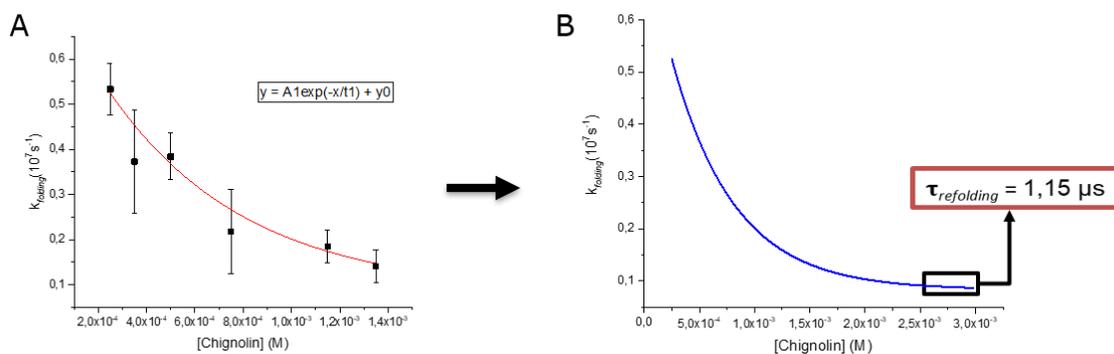


Figura 39: (A) Variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração do peptídeo chignolin, utilizando um transdutor de 1 MHz. A vermelho encontra-se o ajuste exponencial efetuado pelo programa OriginProLab. (B) Extrapolação da variação da constante cinética total ($k_2 = 1/\tau_2$) em função da concentração do peptídeo chignolin, utilizado a equação do ajuste obtida no gráfico anterior.

O gráfico apresentado na Figura 40 ilustra a variação do volume provocada pelo rearranjo conformacional do peptídeo *chignolin* em função da sua concentração. Colocando a hipótese de que após a protonação da Tyr2 uma parte do peptídeo adquira uma estrutura mais rígida e compacta (ver a secção seguinte), seria de esperar que este fenómeno fosse provocar uma contração do volume da solução. No entanto, isto não se verifica e como é possível observar através desta figura, esta variação de volume permanece constante à medida que a concentração do peptídeo aumenta. ($\Delta V_2 = 10,36 \text{ ml mol}^{-1}$).

Uma hipótese para este acontecimento é que esta perturbação no sistema causada pela desprotonação da Tyr2, possa levar a que o peptídeo estabeleça mais ligações de hidrogénio com moléculas de água do solvente, tal como Maruyama e Mitsutake⁵⁶ afirmam que acontece com o seu estado intermediário. Assim, ao voltar ao estado nativo essas interações podem ser quebradas e o peptídeo volta a realizar ligações de hidrogénio entre si, levando assim a que haja uma pequena expansão volumétrica.

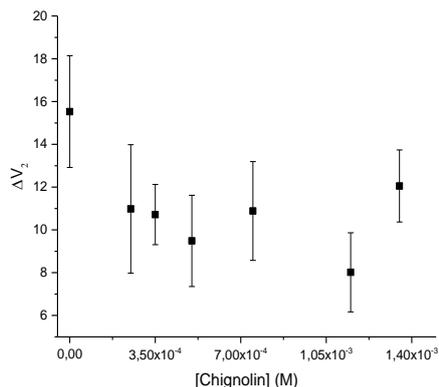


Figura 40: Variação do volume da solução provocada pelo rearranjo conformacional do peptídeo *chignolin* em função da sua concentração, utilizando um transdutor de 1 MHz.

8. Avaliação estrutural teórica

Com o intuito de avaliar a nível molecular o fenómeno de perturbação estrutural do peptídeo *chignolin* pela variação de pH, foram realizados estudos preliminares baseados em minimização estrutural de energia para os pH's 4,5 e 11. Como tal, recorreu-se ao programa Spartan'18, onde foi utilizado o método de mecânica molecular MMFF e posteriormente o método semi-empírico PM6 com uma constante dielétrica de 78,5 ua para mimetizar um ambiente aquoso. A Figura 41 (A) ilustra a sobreposição das duas estruturas do peptídeo com um valor de RMSD de 3,89. O facto de este valor ser superior a $1,2^{98}$ sugere que a mudança de pH de 11 para 4,5 perturba a conformação do peptídeo por meio de alterações nas interações intramoleculares que estabilizam a sua estrutura tridimensional. Além disso, o valor de energia estrutural para *chignolin* varia entre -3437 e -3693 kJ mol⁻¹ em pH 11 e 4,5, respetivamente. Este resultado corrobora os dados experimentais obtidos com as experiências de CD, onde o peptídeo possui uma conformação mais estável a pH's próximos de 5.

Os dados experimentais de CD tanto no UV-longínquo, como no UV-próximo, sugerem que a mudança de pH modifica a interação estabelecida entre os resíduos de aminoácidos Tyr2 e Trp9. O mesmo se verifica com os cálculos iniciais de minimização estrutural de energia, pois estes indicam-nos que a pH 4,5 o resíduo Tyr2 (no seu estado protonado) interage com o resíduo Trp9 via interação hidrofóbica a uma distância de 3,00 Å (Figura 41 (B)), compatível com dados de cristalografia de raio-X⁵¹, enquanto que a pH 11, esta interação é rompida e verifica-se que as extremidades do peptídeo se encontram mais afastadas uma da outra. Além disso, também há um

aumento da liberdade conformacional na zona do núcleo. Tudo isto ocorre devido à formação de uma nova interação entre a Tyr2 e o Trp9 via ligação de hidrogénio, a uma distância de 1,70 Å (Figura 41 (C)), à quebra da ligação de hidrogénio entre o grupo hidroxilo do resíduo Tyr2 e o grupo carboxilo da ligação peptídica do resíduo Gly7 e à ausência da interação hidrofóbica entre o resíduo Tyr2 e Pro4.

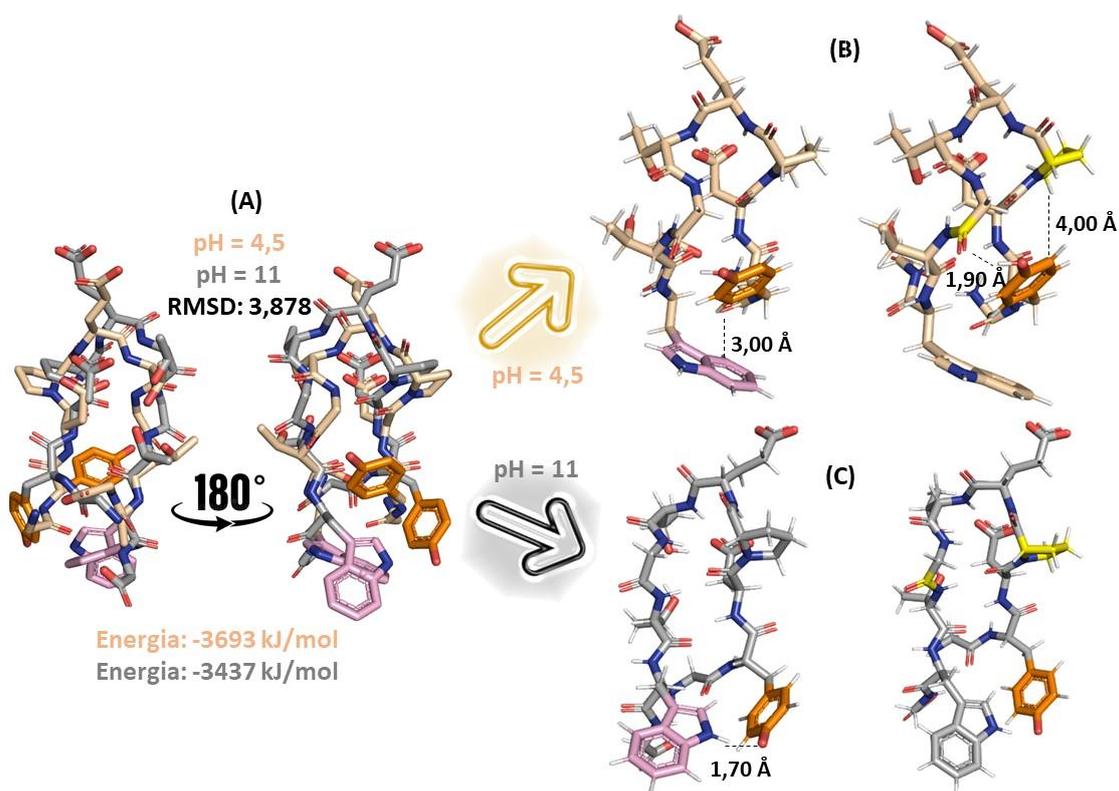


Figura 41: (A) Sobreposição da estrutura do peptídeo chignolin em pH 4,5 e 11 (laranja claro e cinza, respetivamente) após minimização de energia estrutural pelo programa Spartan'18. O valor de RMSD e os valores de energia são correspondentes a menor energia estrutural em cada pH. Para melhor visualização os hidrogénios foram omitidos. Análise estrutural do peptídeo chignolin em (B) pH 4,5 e (C) pH 11, destacando em laranja e cor-de-rosa os resíduos de tirosina e triptofano, respetivamente, enquanto o resíduo da prolina e a ligação C=O da cadeia principal da glicina estão representados a amarelo.

Capítulo 4:
Conclusões e
perspetivas futuras

O estudo detalhado de todos os mecanismos que se encontram na base do *fold*ing e do *un*fold*ing* molecular é essencial para uma melhor compreensão do funcionamento de proteínas e do desenvolvimento de doenças amilóides, como é o caso do parkinson e do alzheimer. Embora ainda estejamos longe de conseguir entender todos estes mecanismos, já é de conhecimento científico que fatores como pH, a temperatura, a concentração de sais e a sequência de aminoácidos, possuem uma grande influência no *fold*ing de proteínas. Como tal, o objetivo deste projeto teve como base o estudo do aminoácido ionizável tirosina e as alterações conformacionais que os diferentes estados de ionização deste resíduo podem provocar no peptídeo *chignolin*, um pequeno gancho- β constituído somente por 10 resíduos de aminoácidos.

Inicialmente, experiências de CD indicaram-nos que após protonação da cadeia lateral do resíduo Tyr2 houve uma perda significativa da estrutura em folha- β do peptídeo. Com esta informação, procedeu-se à realização de experiências TR-PAC onde se estudou o modelo Ac-Tyr-NH₂. Através da realização destas experiências foi possível calcular a constante de velocidade da protonação da cadeia lateral deste modelo ($k_{\text{Tyr}} = 8,5 \times 10^9 \pm 0,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ utilizando um transdutor de 2,25 MHz, $k_{\text{Tyr}} = 7,2 \times 10^9 \pm 0,07 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ utilizando um transdutor de 1 MHz e recorrendo a um decaimento exponencial e $k_{\text{Tyr}} = 8,0 \times 10^9 \pm 0,60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ utilizando um transdutor de 1 MHz e recorrendo a dois decaimentos exponenciais), bem como o volume associado a este processo ($\Delta V_{\text{Tyr}} = 7,6 \pm 0,88 \text{ ml mol}^{-1}$, utilizando um transdutor de 2,25 MHz e $\Delta V_{\text{Tyr}} = 7,2 \pm 0,44 \text{ ml mol}^{-1}$, utilizando um transdutor de 1 MHz e recorrendo a dois decaimentos exponenciais). Posteriormente realizaram-se estudos com o peptídeo *chignolin* onde se estudou a mesma reação (protonação da cadeia lateral do resíduo tirosina), sendo que se obteve um $k_{\text{Tyr}} = 2,8 \times 10^{10} \pm 0,33 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e um $\Delta V_{\text{Chignolin}} = 3,75 \pm 0,57 \text{ ml mol}^{-1}$. Estes valores diferentes podem estar associados ao facto de a experiência acontecer no ambiente químico diferente ou de também se estarem a protonar resíduos de Glu5. Para além do estudo deste processo, também se estudou o rearranjo conformacional do peptídeo após protonação da cadeia lateral da Tyr2. Estima-se que esta reação ocorra num período de tempo de 1,15 μs e que este processo esteja associado a uma expansão de volume na ordem dos 10,4 ml mol^{-1} . Este valor positivo para a variação de volume pode estar relacionada com o facto de o peptídeo, quando não se encontra maioritariamente no seu estado nativo, realizar ligações de hidrogénio com as moléculas de água do solvente e após a reação de protonação da Tyr2, quebrar essas ligações com a água e voltar a formar pontes de hidrogénio intramoleculares, levando a que haja uma pequena expansão volumétrica.

Por último, com o objetivo de tentar compreender melhor a influência deste aminoácido na estabilidade conformacional do peptídeo, realizaram-se cálculos de mecânica molecular. Com estes cálculos foi possível calcular o valor da energia estrutural do *chignolin* para pH 11 (-3437 kJ mol⁻¹) e pH 4,5 (-3693 kJ mol⁻¹). Estes estudos sugerem que o aumento do pH provoca uma diminuição da estabilidade do peptídeo, passando a adquirir uma estrutura menos compacta e com uma maior liberdade conformacional.

Para melhor compreender a influência que o pH tem na estrutura deste peptídeo, seria interessante realizar num futuro estudos computacionais baseados em cálculos de dinâmica molecular em estado de protonação constante ao longo da simulação, pois estes iriam fornecer dados mais robustos com perspectivas de trajetórias para melhor interpretação a nível atômico do fenómeno de mudanças conformacionais dependente de pH para o *chignolin*. Além disso, também seria interessante realizar estudos de PAC partindo de um pH inicial de 6 para estudar a influência que a protonação dos grupos carboxílicos dos aminoácidos Asp3 e Glu5 têm na estrutura do *chignolin*. Por último, seria igualmente importante efetuar substituições nos resíduos Tyr2 e posteriormente Trp4 (por exemplo com alaninas) e realizar estudos de CD e TR-PAC com estes mutantes, a fim de tentar compreender melhor a importância que estes dois aminoácidos aromáticos têm para a estabilidade do peptídeo.

Capítulo 5: **Referências Bibliográficas**

1. Dill KA, Ozkan SB, Weikl TR, Chodera JD, Voelz VA. The protein folding problem: when will it be solved? *Curr Opin Struct Biol.* 2007;17(3):342-346. doi:10.1016/j.sbi.2007.06.001
2. Dill KA, Ozkan SB, Shell MS, Weikl TR. The protein folding problem. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:289-316. doi:10.1146/annurev.biophys.37.092707.153558
3. Dill KA, Maccallum JL, Folding P. The Protein-Folding Problem , 50 Years On. 2012;(NOVEMBER):1042-1047.
4. Wolynes P, Onuchic P, Thirumalai D. Navigating the Folding Routes. *Science (80-).* 1995;267:1619-1620.
5. Dill K, Chan H. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol.* 1997;4(1):10-19.
6. Onuchic JN, Wolynes PG. Theory of protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14(1):70-75. doi:10.1016/j.sbi.2004.01.009
7. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003;426(December):1-4.
8. Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J Mol Biol.* 1997;268(1):209-225. doi:10.1006/jmbi.1997.0959
9. Kinch LN, Wrabl JO, Krishna SS, et al. CASP5 Assessment of Fold Recognition Target Predictions. *Proteins Struct Funct Genet.* 2003;53(SUPPL. 6):395-409. doi:10.1002/prot.10557
10. Honda S, Yamasaki K, Sawada Y, Morii H. 10 Residue folded peptide designed by segment statistics. *Structure.* 2004;12(8):1507-1518. doi:10.1016/j.str.2004.05.022
11. Leite F, Bueno C, Da Róz A, Ziemath E, Oliveira O. Theoretical Models for Surface Forces and Adhesion and Their Measurement Using Atomic Force Microscopy. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):12773-12856.
12. Linderström-Lang K. On the Ionisation of Proteins. *C R Trav Lab Carlsberg, Ser Chim.* 1924;15:1-29.
13. Tanford C. Protein denaturation: Part c. theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv Protein Chem.* 1970;24(C):1-95. doi:10.1016/S0065-3233(08)60241-7
14. Yang AS, Honig B. On the pH dependence of protein stability. *J Mol Biol.* 1993;231(2):459-474. doi:10.1006/jmbi.1993.1294
15. Murphy K. *Protein Structure, Stability and Folding.*
16. Hubbard R, Haider M. Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. *Encycl Life Sci.* Published online 2010.
17. Kauzmann W. SOME FACTORS IN THE INTERPRETATION OF PROTEIN DENATURATION. *Adv Protein Chem.* 1959;14:1-63.
18. Anfinsen C. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science (80-).* 1973;181(4096):223-230.
19. Tanford C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science (80-).* 1978;200(4345):1012-1018. doi:10.1126/science.653353
20. Ferguson N, Fersht AR. Early events in protein folding. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(1):75-81. doi:10.1016/S0959-440X(02)00009-X
21. Pauling L, Corey R, Branson H. The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *PNAS.* 1951;37(4):205-211.
22. Voet D. *Fundamentos de Bioquímica.*; 2014.
23. Bierzynski A, Kim PS, Baldwin RL. A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C-

- peptide of RNase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(8):2470-2474.
doi:10.1073/pnas.79.8.2470
24. Hol W, Halie L, Sander C. Dipoles of the α -helix and β -sheet: their role in protein folding. *Nature*. 1981;294:532-536.
 25. Williams S, Causgrove TP, Gilmanishin R, et al. Fast events in protein folding: Helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry*. 1996;35(3):691-697.
doi:10.1021/bi952217p
 26. Huang CY, Klemke JW, Getahun Z, DeGrado WF, Gai F. Temperature-dependent helix-coil transition of an alanine based peptide. *J Am Chem Soc*. 2001;123(38):9235-9238.
doi:10.1021/ja0158814
 27. Wang T, Zhu Y, Getahun Z, et al. Length dependent helix-coil transition kinetics of nine alanine-based peptides. *J Phys Chem B*. 2004;108(39):15301-15310.
doi:10.1021/jp037272j
 28. Eaton WA, Muñoz V, Thompson PA, Henry ER, Hofrichter J. Kinetics and Dynamics of Loops, α -Helices, β -Hairpins, and Fast-Folding Proteins. *Acc Chem Res*. 1998;31(11):745-753. doi:10.1021/ar9700825
 29. Pauling L, Corey R. The Pleated Sheet, A New Layer Configuration of Polypeptide Chains. *PNAS*. 1951;37(5):251-256.
 30. Thornton J, Sibanda B, Edwards M, Barlow D. Analysis, Design and Modification of Loop Regions in Proteins. *BioEssays*. 1988;8(2):63-69.
 31. Karplus M, Dinner AR LT. Understanding β -hairpin formation. 1999;96(August):9068-9073.
 32. Muñoz V, Thompson PA, Hofrichter J, Eaton WA. Folding dynamics and mechanism of β -hairpin formation. *Nature*. 1997;390(6656):196-199. doi:10.1038/36626
 33. Honda S, Kobayashi N, Munekata E. Thermodynamics of a β -hairpin structure: Evidence for cooperative formation of folding nucleus. *J Mol Biol*. 2000;295(2):269-278.
doi:10.1006/jmbi.1999.3346
 34. Kar K, Hoop CL, Drombosky KW, et al. B-Hairpin-Mediated Nucleation of Polyglutamine Amyloid Formation. *J Mol Biol*. 2013;425(7):1183-1197. doi:10.1016/j.jmb.2013.01.016
 35. Muñoz V, Henry ER, Hofrichter J, Eaton WA. A statistical mechanical model for β -hairpin kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):5872-5879.
doi:10.1073/pnas.95.11.5872
 36. Klimov DK, Thirumalai D. Mechanisms and kinetics of β -hairpin formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2544-2549. doi:10.1073/pnas.97.6.2544
 37. Xu Y, Oyola R, Gai F. Infrared Study of the Stability and Folding Kinetics of a 15-Residue β -Hairpin. *J Am Chem Soc*. 2003;125(50):15388-15394. doi:10.1021/ja037053b
 38. Sibanda B, Thornton J. β -Hairpin families in globular proteins. *Nature*. 1965;316:170-174.
 39. Du D, Tucker MJ, Gai F. Understanding the mechanism of β -hairpin folding via ϕ -value analysis. *Biochemistry*. 2006;45(8):2668-2678. doi:10.1021/bi052039s
 40. Mikšovská J, Larsen RW. Photothermal Studies of pH Induced Unfolding of Apomyoglobin. *Journal of Protein Chemistry*. 2003;22(4):387-394.
 41. Chen RPY, Huang JJT, Chen HL, et al. Measuring the refolding of β -sheets with different turn sequences on a nanosecond time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(19):7305-7310. doi:10.1073/pnas.0304922101
 42. Xu Y, Purkayastha P, Gai F. Nanosecond folding dynamics of a three-stranded β -sheet. *J Am Chem Soc*. 2006;128(49):15836-15842. doi:10.1021/ja064865+

43. Strasser BJ. "Sickle cell anemia, a molecular disease." *Science* (80-). 1999;286(5444):1488-1490. doi:10.1126/science.286.5444.1488
44. Ingmar V. A Specific Chemical Difference between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anaemia Haemoglobin. *Nature*. 1956;178:792-794.
45. Hunter T. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012;367(1602):2513-2516. doi:10.1098/rstb.2012.0013
46. Luscombe NM, Laskowski RA, Thornton JM. Amino acid – base interactions : a three-dimensional analysis of protein – DNA interactions at an atomic level. 2001;29(13):2860-2874.
47. Pace CN, Grimsley GR, Scholtz JM. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13285-13289. doi:10.1074/jbc.R800080200
48. Zhou HX, Pang X. Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chem Rev*. 2018;118(4):1691-1741. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00305
49. Anjana R, Kirti Vaishnavi M, Sherlin D, et al. Aromatic-aromatic interactions in structures of proteins and protein-DNA complexes: a study based on orientation and distance. *Bioinformatics*. 2012;8(24):1220. www.bioinformatics.net
50. Borsarelli CD, Braslavsky SE. Volume changes correlate with enthalpy changes during the photoinduced formation of the 3MLCT state of ruthenium(II) bipyridine cyano complexes in the presence of salts. A case of the entropy-enthalpy compensation effect. *J Phys Chem B*. 1998;102(32):6231-6238. doi:10.1021/jp981235o
51. Honda S, Yamasaki K, Sawada Y, Morii H. 10 Residue folded peptide designed by segment statistics. *Structure*. 2004;12(8):1507-1518. doi:10.1016/j.str.2004.05.022
52. Cochran AG, Starovasnik MA SN. Tryptophan zippers: Stable, monomeric beta-hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5578-558.
53. Suenaga A, Narumi T, Futatsugi N, et al. Folding dynamics of ID-residue β -hairpin peptide chignolin. *Chem - An Asian J*. 2007;2(5):591-598. doi:10.1002/asia.200600385
54. Enemark S, Rajagopalan R. Turn-directed folding dynamics of β -hairpin-forming de novo decapeptide Chignolin. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(36):12442-12450. doi:10.1039/c2cp40285h
55. Cruz P. 2009. Engenharia Estrutural de Peptídeos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
56. Maruyama Y, Mitsutake A. Analysis of Structural Stability of Chignolin. *J Phys Chem B*. 2018;122(14):3801-3814. doi:10.1021/acs.jpcc.8b00288
57. Terada T, Satoh D, Mikawa T, Ito Y, Shimizu K. Understanding the roles of amino acid residues in tertiary structure formation of chignolin by using molecular dynamics simulation. *Proteins Struct Funct Genet*. 2008;73(3):621-631. doi:10.1002/prot.22100
58. Harada R, Kitao A. Exploring the folding free energy landscape of a β -hairpin miniprotein, chignolin, using multiscale free energy landscape calculation method. *J Phys Chem B*. 2011;115(27):8806-8812. doi:10.1021/jp2008623
59. Monsellier E, Chiti F. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. *EMBO Rep*. 2007;8(8):737-742. doi:10.1038/sj.embor.7401034
60. Maaß A, Tekin ED, Schüller A, Palazoglu A, Reith D, Faller R. Folding and unfolding characteristics of short beta strand peptides under different environmental conditions and starting configurations. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2010;1804(10):2003-2015. doi:10.1016/j.bbapap.2010.06.019
61. Seibert MM, Patriksson A, Hess B, Van Der Spoel D. Reproducible polypeptide folding

- and structure prediction using molecular dynamics simulations. *J Mol Biol.* 2005;354(1):173-183. doi:10.1016/j.jmb.2005.09.030
62. Jiwan JH, Wegewijs B, Indelli MT, Scandola F, Braslavsky SE. Volume changes associated with intramolecular electron transfer during MLCT state formation. Time-resolved optoacoustic studies of ruthenium cyano complexes. *Recl des Trav Chim des Pays-Bas.* 1995;114(11-12):542-548. doi:10.1002/recl.19951141120
 63. Feitelson J, Mauzerall D. Photoacoustic evaluation of volume and entropy changes in energy and electron transfer. Triplet state porphyrin with oxygen and naphthoquinone-2-sulfonate. *J Phys Chem.* 1996;100(18):7698-7703. doi:10.1021/jp953322b
 64. Wegewijs B, Verhoeven JW, Braslavsky SE. Volume Changes Associated with Intramolecular Exciplex Formation in a Semiflexible Donor-Bridge-Acceptor Compound. *J Phys Chem.* 1996;100(21):8890-8894. doi:10.1021/jp953683r
 65. Small, JR KE. No Title. *Spectrosc 10.* Published online 1995:27-33.
 66. Politi MJ, Fendler JH. Laser pH-Jump Initiated Proton Transfer on Charged Micellar Surfaces. *J Am Chem Soc.* 1984;106(2):265-273. doi:10.1021/ja00314a001
 67. Schulenberg P, Braslavsky S. Time-resolved photothermal studies with biological supramolecular systems. In: *Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology.* Vol 3. ; 1996.
 68. George M, Scaiano J. Photochemistry of O-Nitrobenzaldehyde and Related Studies. *J Phys Chem.* 1980;84:492-495.
 69. Ciamician G, Silber P. Ber. Dtsch. Chem Ges. 1901;34:2040-2046.
 70. Bell A. The Production of Sound by Radiant Energy. *Science (80-).* 1881;2(49):242-253.
 71. Jesus SCH. 2013. Kinetics and Energetics of Fundamental Events in Peptide and Protein (Un)Folding. Tese de Doutorado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. <https://eg.uc.pt/handle/10316/24271>
 72. Weast R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. In: *CRC Press, Boca Raton.* ; 1971.
 73. Abbruzzetti S, Viappiani C, Murgida D, Erra-Balsells R, Bilmes G. Nontoxic, water-soluble photocalorimetric reference compounds for UV and visible excitation. *Chem Phys Lett.* 1999;304(3-4):167-172.
 74. Schaberle FA, Rego Filho FDAMG, Reis LA, Arnaut LG. Assessment of lifetime resolution limits in time-resolved photoacoustic calorimetry vs. transducer frequencies: Setting the stage for picosecond resolution. *Photochem Photobiol Sci.* 2016;15(2):204-210. doi:10.1039/c5pp00397k
 75. Arnaut LG, Caldwell R, Elbert J, Melton L. Recent advances in photoacoustic calorimetry – theoretical basis and improvements in experimental design. *Rev Sci Instrum.* 1992;63:5381-5389.
 76. Bulheller BM, Rodger A, Hirst JD. Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys.* 2007;9(17):2020-2035. doi:10.1039/b615870f
 77. Woody R. CIRCULAR DICHROISM. *METHODS Enzymol.* 1995;246:34-71.
 78. Nakanishi K, Berova N, Wood RW. *Circular Dichroism. Principles and Applications.* (York VN, ed.); 1994.
 79. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. 2005;1751:119-139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005
 80. Kelly S, Price N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;1(4):349-384. doi:10.2174/1389203003381315

81. Schmid F. *Optical Spectroscopy to Characterize Protein Conformation and Conformational Changes*. 2nd editio. (Press I, ed.); 1997.
82. Cramer C. *Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models*; 2004.
83. Lii J -H, Allinger NL. The MM3 force field for amides, polypeptides and proteins. *J Comput Chem*. 1990;12(2):186-199. doi:10.1002/jcc.540120208
84. Jorgensen W, Tirado-Rives J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc*. 1988;110(6):1657-1666.
85. D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, VWDC, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin JL, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev F, Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling NR, Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong YX, Kollman DMY and PA. AMBER. Published online 2020:University of California, San Francisco.
86. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem*. 1983;4(2):187-217. doi:10.1002/jcc.540040211
87. Born M, Oppenheimer J. Zur Quantentheorie der Molekeln" [On the Quantum Theory of Molecules]. *Ann Phys*. 1927;389(20):457-484.
88. Hückle E. No Title. *Zeitschrift für Phys*. 1931;70(204).
89. Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model1. *J Am Chem Soc*. 1985;107(13):3902-3909. doi:10.1021/ja00299a024
90. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model*. 2007;13(12):1173-1213. doi:10.1007/s00894-007-0233-4
91. SchaberleFA, Filho FAMGR, Reisa LA AL. Assessment of lifetime resolution limits in time-resolved photoacoustic calorimetry vs. transducer frequencies: setting the stage for picosecond resolution. *R Chem Soc*. 2016;15:204-210.
92. Jurrus E, Engel D, Star K, et al. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Sci*. 2018;27(1):112-128. doi:10.1002/pro.3280
93. <https://www.wavefun.com/>, acedido em Outubro de 2021.
94. <https://pymol.org/2/>, acedido em Outubro de 2021.
95. Grishina IB, Woody RW. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: Exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss*. 1994;99:245-262. doi:10.1039/FD9949900245
96. Bonetti G, Vecli A, Viappiani C. Reaction volume of water formation detected by time-resolved photoacoustics: Photoinduced proton transfer between o-nitrobenzaldehyde and hydroxyls in water. *Chem Phys Lett*. 1997;269(3-4):268-273. doi:10.1016/S0009-2614(97)00291-1
97. Viappiani C, Abbruzzetti S, Small JR, Libertini LJ, Small EW. An experimental methodology for measuring volume changes in proton transfer reactions in aqueous solutions. *Biophys Chem*. 1998;73(1-2):13-22. doi:10.1016/S0301-4622(98)00108-2
98. Kufareva L, Abagyan R. Methods of protein structure comparison. *Methods Mol Biol*. 2012;857:231-257.

Material Suplementar

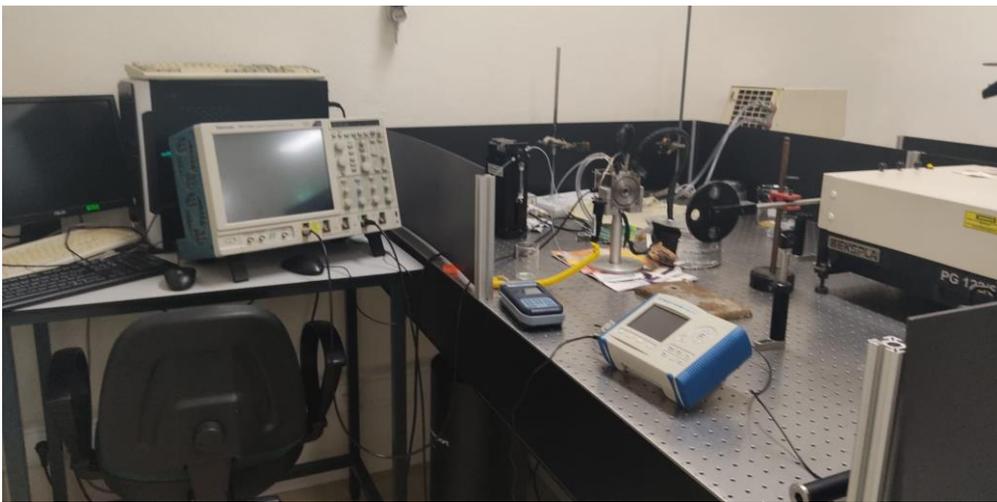
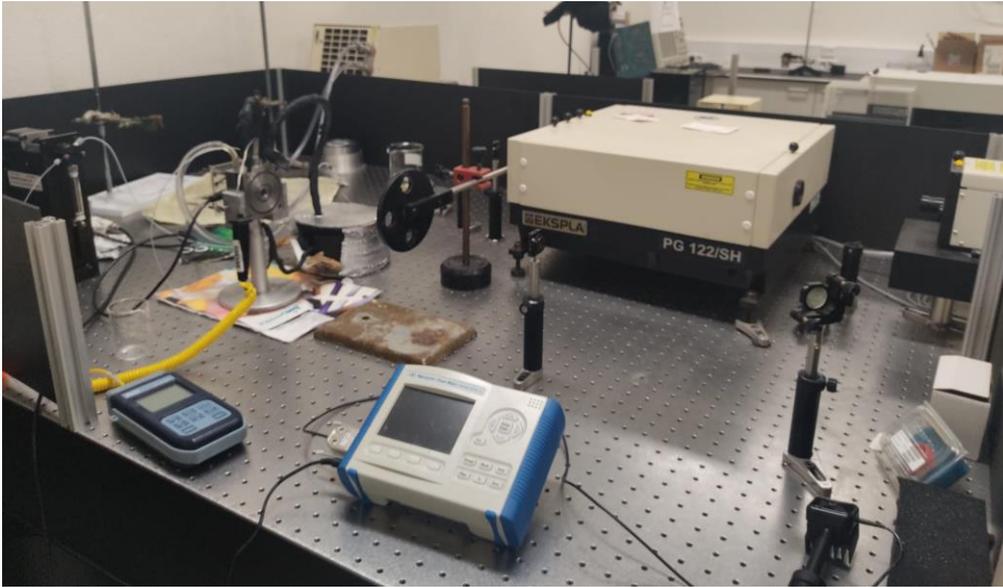
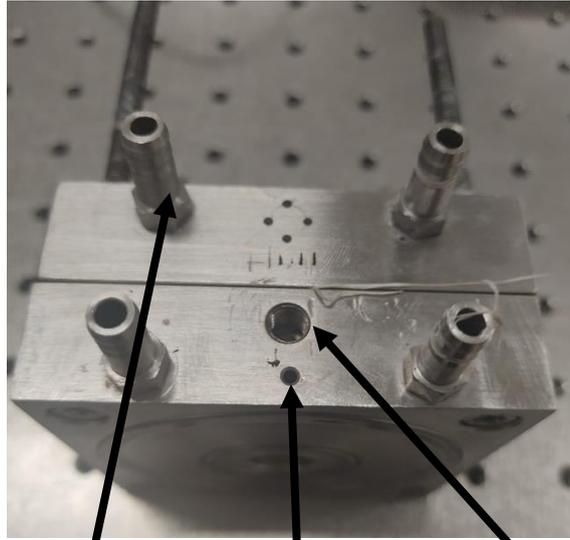
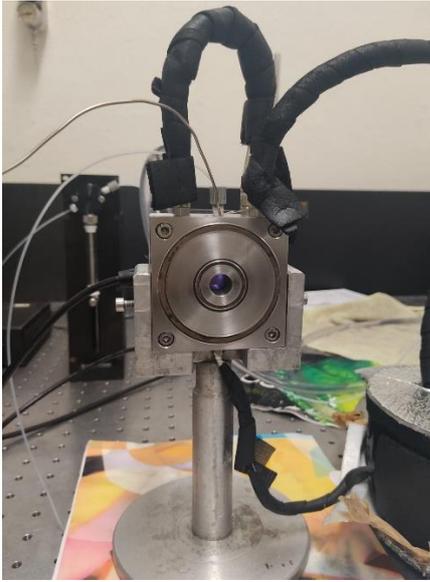


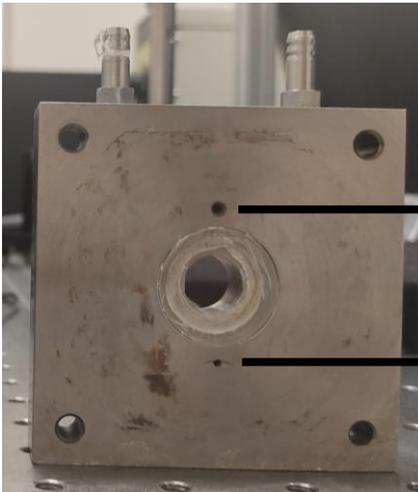
Figura 1. Equipamento de calorimetria fotoacústica disponível no nosso laboratório.



Conexão com o
banho externo

Entrada para
o termómetro

Saída de
resíduos



Saída da amostra

Entrada da amostra

Figura 2. Célula Fotoacústica utilizada nas experiências de PAC.