



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQUIM**

**CAYO JORGE AMARAL FARIAS**

**EFEITO DE ÍONS DE HOFMEISTER SOBRE A AUTO-ORGANIZAÇÃO  
MOLECULAR DE UM PEPTÍDEO NANOESTRUTURADO**

**ILHÉUS – BAHIA**

**2017**

**CAYO JORGE AMARAL FARIAS**

**EFEITO DE ÍONS DE HOFMEISTER SOBRE A AUTO-ORGANIZAÇÃO  
MOLECULAR DE UM PEPTÍDEO NANOESTRUTURADO**

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Santa Cruz para obtenção do título  
de Mestre em Química.

Linha de Pesquisa: Físico-Química Teórica e  
Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Salay

**ILHÉUS – BAHIA**

**2017**

F224 Farias, Cayo Jorge Amaral.  
Efeito de íons de Hofmeister sobre a auto-organização molecular de um peptídeo nanoestruturado / Cayo Jorge Amaral Farias.  
– Ilhéus : UESC, 2017.  
66f. : il.  
Orientador : Luiz Carlos Salav.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.  
Inclui referências.  
  
1. Efeito íons. 2. Biomateriais. 3. Nanoestruturas. 4. Indústria farmacêutica. I. Salav, Luiz Carlos. II. Título.  
CDD – 541.3728

CAYO JORGE AMARAL FARIAS

**Efeito de Íons de Hofmeister sobre a Auto-Organização Molecular  
de um Peptídeo Nanoestruturado**

Ilhéus-BA, Ilhéus, 24 de julho de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof(a). Dr. Luiz Carlos Salay  
Doutor em Físico-Química University of Leeds - Inglaterra  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC  
Orientador(a)



Prof(a). Dr. Fernando Cesário Rangel (UESC)  
Doutor em Química - UNB  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof(a). Dra. Alexilda Oliveira de Souza (UESB)  
Doutora em Química - UNICAMP  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Dedico esse trabalho a meu avô Antônio (*in memoriam*), minha avó Alaide, a meu pai Jorge, minha mãe Deniciara, minha esposa Adriana, meus sogros André e Dora, pelo amor, carinho e paciência ao longo de toda minha caminhada, e em especial ao meu filho Jorge Lucca que está chegando ao mundo.

## AGRADECIMENTOS

Enfim, depois de tantas dificuldades e pedras no caminho, consegui e esse é o momento de agradecer. Antes de tudo, agradeço primeiramente a Deus, que no dia-dia sempre está presente em cada ato, reavivando minhas forças para prosseguir a fim de completar o meu objetivo.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Salay por acreditar em mim, pelo convívio, amizade construída, compreensão e conhecimentos compartilhados, além de ser um grande exemplo de humildade.

À minha família, em especial meu Avô (Antônio), minha Avó (Alaide), meu Pai (Jorge) e minha Mãe (Deniciara) por apoiarem os meus objetivos. Aos meus sogros (Dora e André) pela forma carinhosa que me acolheram. Ao meu filho (Lucca), que ainda não chegou ao mundo, mas é a pessoa que mais me faz feliz até hoje. E também minha esposa (Adriana), por sempre estar ao meu lado nas batalhas diárias, e todos os dias me mostrar o seu sorriso lindo. Agradeço também a Stan e Wendy, meus gatinhos que sempre estão alegrando a casa.

Agradeço também ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por disponibilizar o peptídeo. À Nélide Marín, pelo conhecimento compartilhado e dedicação para servir ao próximo.

Agradeço aos professores do mestrado, que de alguma forma contribuíram para minha formação, em especial, ao Prof. Dr. Fernando Rangel pelo amplo conhecimento compartilhado, pelos conselhos dados, pela amizade e exemplo de humildade. À Prof. Dr<sup>a</sup> Rosenira Serpa por ser sempre solícita e disposta a ajudar. Ao Prof. Dr. Raildo Mota, pela amizade, pelo trabalho como coordenador do colegiado.

Muito obrigado à banca de avaliadores, pela disponibilidade em fazer parte de um momento tão importante em minha vida.

À UESC por oferecer a estrutura necessária para realização dos experimentos e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

# EFEITO DE ÍONS DE HOFMEISTER SOBRE A AUTO-ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DE UM PEPTÍDEO NANOESTRUTURADO

## RESUMO

Na busca de novos biomateriais, as estruturas de peptídeos auto-organizáveis são promissoras para aplicações em áreas como biossensoiramento, eletrônica molecular, diagnóstico, desenvolvimento de fármacos e reparo de tecidos. Esses “blocos de construção” são capazes de se auto-organizar em nanoestruturas em 1, 2 ou 3 dimensões de uma maneira muito simples sem o uso de máquinas especializadas ou condições extremas de temperatura ou pressão. Há uma série de peptídeos capazes de se auto-organizar em nanoestruturas. Estes podem ser encontrados na natureza ou sintetizados no laboratório. No presente trabalho foi utilizado um peptídeo sintético P<sub>11</sub>-2, para observar como alguns íons da série de Hofmeister (cloreto e sulfato) alteram sua conformação, utilizando técnicas espectroscópicas de UV-vis, fluorescência e dicroísmo circular. O P<sub>11</sub>-2 foi desenvolvido por Neville Boden e colaboradores na Universidade de Leeds-Inglaterra, é um peptídeo que possui propriedades físico-químicas amplamente conhecidas e que tem a propriedade de se auto-organizar com a concentração de maneira totalmente controlada e de forma hierárquica partindo da forma molecular e com o aumento da concentração formando estruturas supramoleculares complexas formando fitas, fibras e géis. Com as análises foi possível observar que o peptídeo na conformação random coil pode mudar para a conformação folha  $\beta$  apenas adicionando íons cosmotrópicos como o sulfato, que altera a estrutura da água fazendo com que o peptídeo precipite (salting-out). Outra observação foi que o cloreto apesar de ser considerado um ponto divisor entre íons caotrópicos e cosmotrópicos, possui uma leve tendência caotrópica, porém, interage diretamente com a camada hidrofóbica do peptídeo favorecendo em parte o colapso hidrofóbico. Diversos trabalhos mostram uma série de debates sobre o mecanismo do efeito Hofmeister, e ainda não existe um consenso sobre tal. E devido a importância desse efeito sob a biologia e a tecnologia, são necessários estudos mais aprofundados de simulações moleculares, juntamente com experimentos espectroscópicos, termodinâmicos e de microscopia eletrônica de transmissão para uma maior compreensão desse importante fenômeno.

Palavras-chave: Efeito Hofmeister, P<sub>11</sub>-2, Auto-organização molecular

# HOFMEISTER EFFECT ON THE MOLECULAR SELF-ASSEMBLY OF A NANOSTRUTURED PEPTIDE

## ABSTRACT

In the search for new biomaterials, self-organizing peptide structures are promising for applications in areas such as biosensing, molecular electronics, diagnostics, drug development and tissue repair. These "building blocks" are able to self-organize into nanostructures in 1, 2 or 3 dimensions in a very simple way without the use of specialized machines or extreme conditions of temperature or pressure. There are a number of peptides capable of self-organizing in nanostructures. These can be found in nature or synthesized in the laboratory. In the present work a synthetic peptide P<sub>11-2</sub> was used to observe how some ions of the Hofmeister series (chloride and sulfate) alter their conformation, using spectroscopic techniques of UV-vis, fluorescence and circular dichroism. P<sub>11-2</sub> was developed by Neville Boden and colleagues at the University of Leeds-England. It is a peptide with physicochemical properties widely known and has the property of self-organizing with concentration in a totally controlled and hierarchical way starting from the molecular form and with increasing concentration forming complex supramolecular structures forming ribbons, fibers and gels. With the analyzes, it was possible to observe that the peptide in the coil random formation can change to the  $\beta$ -sheet conformation only by adding kosmotropic ions such as sulfate, which changes the water structure causing the peptide to precipitate (salting-out). Another observation was that the chloride, although considered a dividing point between chaotropic and kosmotropic ions, has a slight chaotropic tendency, however, it interacts directly with the hydrophilic layer of the peptide, favoring in part the hydrophobic collapse. Several papers show a series of debates on the mechanism of the Hofmeister effect, and there is as yet no consensus on this issue. And due to the importance of this effect under biological and technological standpoint, further studies of molecular simulations are required, along with spectroscopic, thermodynamic experiments and transmission electron microscopy for a better understanding of this important phenomenon.

Key-words: Hofmeister Ions, P<sub>11-2</sub>, Molecular self-organization



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Escala nanométrica .....	19
Figura 2	– Representação esquemática do nanorods de silício e nanotubo de carbono .....	20
Figura 3	– Os 20 aminoácidos comuns de proteínas. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização que predomina em pH 7,0. As porções não sombreadas são aquelas comuns a todos os aminoácidos; aquelas sombreadas são os grupos R. Embora o grupo R da histidina seja mostrado sem carga, seu pKa é tal que uma pequena mas significativa fração desses grupos seja positivamente carregada em pH 7,0 .....	22
Figura 4	– Formação de uma ligação peptídica por condensação. O grupo amino de um aminoácido (com grupo R2) atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxila de outro aminoácido (com grupo R1), formando uma ligação peptídica (sombreada) .....	23
Figura 5	– Estrutura da enzima quimotripsina, uma proteína globular. A molécula de glicina (em cinza) é representada para comparação de tamanho .....	24
Figura 6	– Cada ligação peptídica tem algum caráter de ligação dupla devido à ressonância, e não pode girar. Embora o átomo de N em uma ligação peptídica seja sempre representado com uma carga positiva parcial, considerações cuidadosas dos orbitais de ligação e dos mecanismos quânticos indicam que o N tem uma carga líquida neutra ou levemente negativa .....	26
Figura 7	– Três ligações separam os carbonos alfa consecutivos em uma cadeia polipeptídica. As ligações N-C $\alpha$ e C $\alpha$ -C podem girar, sendo descritas pelos ângulos diedros designados $\phi$ e $\psi$ , respectivamente. A ligação peptídica C-N não está livre para rotação. Outras ligações simples do esqueleto também podem estar rotacionalmente obstruídas, dependendo do tamanho e da carga dos grupos R .....	27

- Figura 8 – (Esquerda) Átomos e planos que definem  $\Psi$ . (Direita) Por convenção,  $\Phi$  e  $\Psi$  são iguais a  $180^\circ$  (ou  $-180^\circ$ ) quando o primeiro e o quarto átomos estão mais afastados e os peptídeos estão totalmente estendidos. Ao longo da ligação que sofre rotação (para qualquer um dos lados), os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  aumentam à medida que o quarto átomo gira no sentido horário em relação ao primeiro ..... 27
- Figura 9 – Modelos de hélice  $\alpha$ , mostrando os diferentes aspectos de sua estrutura. (a) Modelo de esfera e bastão mostrando as ligações de hidrogênio internas da cadeia. A unidade que se repete forma uma volta da hélice: 3,6 resíduos. (b) Hélice  $\alpha$  vista de uma de suas extremidades, ao longo do eixo central. As posições dos grupos R são representados pelas esferas roxas. Modelo de esfera e bastão, que ressalta o arranjo helicoidal, dá uma falsa impressão de que a hélice é oca, pois as esferas não mostram os raios de van der Waals de cada um dos átomos. (c) Como este modelo de volume atômico mostra, os átomos no centro da hélice a estão em contato estreito. (d) Projeção da rotação helicoidal de uma hélice  $\alpha$ . Esta representação é colorida para a identificação de superfícies com determinadas propriedades. Os resíduos em amarelo, por exemplo, podem ser hidrofóbicos e fazer parte de uma interface entre a hélice mostrada aqui e outra parte do mesmo ou de outro polipeptídeo. Os resíduos vermelhos (negativo) e azuis (positivo) ilustram o potencial de interação de cadeias laterais de cargas opostas, separadas por dois resíduos na hélice ..... 29
- Figura 10 – Níveis de estruturas nas proteínas ..... 31
- Figura 11 – A conformação  $\beta$  das cadeias polipeptídicas. Estas visões: (a) lateral e (b, c) superior mostram os grupos R saindo do plano da folha  $\beta$  e enfatizam a forma pregueada formada pelos planos das ligações peptídicas. As ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes também são mostradas. A orientação das cadeias adjacentes (setas), do aminoterminal para carboxiterminal, pode ser a mesma ou oposta, formando (b) folhas  $\beta$  antiparalelas ou (c) folhas  $\beta$  paralelas..... 32

- Figura 12 – Representação esquemática da auto-organização de moléculas peptídicas de modo a formar uma fita folha  $\beta$  antiparalela intermolecular crescente a partir de ligação de hidrogênio entre espinhas dorsais de peptídeos na conformação de fios  $\beta$  adjacentes .. 34
- Figura 13 – Modelo de auto-organização hierárquica dos peptídeos da família  $P_{11}$  na qual a organização das diversas estruturas é expressa em termos de parâmetros energéticos moleculares. As Figuras (a) e (b) são monômeros, (c) e (c') fitas, (d) e (d') faixas, (e) e (e') fibrilas, (f) e (f') fibras ..... 35
- Figura 14 – Estrutura de peptídeo folhas  $\beta$  mostrando detalhes da ligação de hidrogênio e os alinhamentos da cadeia lateral do peptídeo  $P_{11-2}$  ..... 38
- Figura 15 – Diagrama de Perrin-Jablonski e a ilustração da posição relativa dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência ..... 43
- Figura 16 – Representação esquemática da polarização circular da radiação eletromagnética. A seta em vermelho corresponde à componente elétrica, a seta em verde à componente magnética e a seta em azul corresponde à soma das componentes. As demais setas indicam como variam as componentes elétrica e magnética em função do tempo ..... 44
- Figura 17 – Espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Este espectro mostra a polilisina inteiramente como hélice  $\alpha$ , como conformação  $\beta$  ou desnaturada, espiral aleatória. A unidade do eixo y é uma simplificação das unidades comumente utilizadas nos experimentos de CD. Como as curvas são diferentes para as hélices  $\alpha$ , as conformações  $\beta$  e a desnaturada, o espectro de CD fornece a determinada proteína uma estimativa da fração da proteína, formada pelas duas estruturas secundárias mais comuns. O espectro de CD da proteína nativa pode servir como referência para o estado enovelado, e é útil no monitoramento da desnaturação, ou de mudanças conformacionais resultantes de alterações nas condições de solução..... 45

Figura 18 – Absorção da luz ultravioleta por aminoácidos aromáticos. Comparação dos espectros de absorção de luz dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina em pH 6,0. Os aminoácidos estão presentes em quantidades equimolares (10 <sup>-3</sup> M) sob condições idênticas. A absorbância medida do triptofano é mais do que quatro vezes aquela da tirosina em um comprimento de onda de 280 nm. Observe que a absorção luminosa máxima tanto para o triptofano quanto para a tirosina ocorre próxima de 280 nm. A absorção luminosa pela fenilalanina geralmente contribui pouco para as propriedades espectroscópicas das proteínas .....	46
Figura 19 – Espectros de fluorescência de P <sub>11-2</sub> (30 μM) em água na presença de NaCl λ <sub>exc</sub> = 280 nm, fenda: 3, Cella: 1 x 0,2 cm .....	49
Figura 20 – Espectros de absorbância UV-vis do P <sub>11-2</sub> na presença e ausência de NaCl em diferentes concentrações .....	50
Figura 21 – Espectro de CD do P <sub>11-2</sub> na ausência e presença de NaCl em diferentes concentrações .....	51
Figura 22 – Espectro de CD do P <sub>11-2</sub> na presença de NaCl em diferentes concentrações .....	52
Figura 23 – Espectros de fluorescência de P <sub>11-2</sub> (30 μM) em água na presença de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> λ <sub>exc</sub> = 280 nm, fenda: 3, Cella: 1 x 0,2 cm .....	53
Figura 24 – Espectros de absorbância UV-vis do P <sub>11-2</sub> na presença e ausência de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em diferentes concentrações .....	54
Figura 25 – Espectro de CD do P <sub>11-2</sub> na ausência e presença de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em diferentes concentrações .....	55
Figura 26 – Espectro de CD do P <sub>11-2</sub> na presença de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em diferentes concentrações .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ângulos $\Phi$ e $\Psi$ ideais para estruturas secundárias comuns .....	28
Tabela 2 – Tendência dos resíduos de aminoácidos em assumir a conformação de hélice $\alpha$ .....	30

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Å	Ångström
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
CD	Circular Dichroism
cm <sup>-1</sup>	Número de Onda
Cys	Cisteína
Ca	Carbono terminal
DLVO	Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey, e Overbeek
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F	Força
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
pKa	Constante de acidez
Pro	Prolina
RNA	Ácido Ribonucleico
Ser	Serina
T	Temperatura
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV-vis	Ultravioleta visível
Val	Valina
β	Beta

$\Delta G$	Energia livre de Gibbs
$\Delta H$	Entropia
$\Delta S$	Entalpia
$\lambda$	Comprimento de onda
$\phi$	Ângulo de torção (phi)
$\Psi$	Ângulo de torção (psi)
$\Omega$	Ângulo de torção (ômega)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	18
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
<b>3.1</b>	<b>Nanotecnologia</b>	19
<b>3.2</b>	<b>Peptídeos</b>	20
3.2.1	Peptídeos auto-organizáveis	33
3.2.2	Peptídeo P11-2	38
<b>3.3</b>	<b>Série de Hofmeister</b>	40
<b>3.4</b>	<b>Fundamentação teórica das técnicas</b>	42
3.4.1	Fluorescência	42
3.4.2	Dicroísmo Circular	43
3.4.3	Espectroscopia UV-vis	45
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	47
<b>4.1</b>	<b>Materiais e equipamentos utilizados</b>	47
4.1.1	Materiais	47
4.1.2	Equipamentos	47
<b>4.2</b>	<b>Metodologia utilizada</b>	47
4.2.1	Espectroscopia de Fluorescência	47
4.2.2	Espectroscopia Ultravioleta – Visível	47
4.2.3	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
<b>5.1</b>	<b>Peptídeo P<sub>11</sub>-2 na presença de NaCl</b>	49
<b>5.2</b>	<b>Peptídeo P<sub>11</sub>-2 na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	58
	<b>REFERÊNCIAS</b>	60



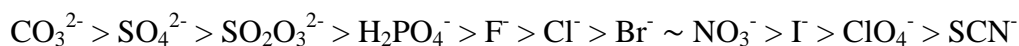
## 1 INTRODUÇÃO

A análise quantitativa das forças envolvidas no processo de origem da estrutura biológica é importante para o desenvolvimento de novos medicamentos na indústria farmacêutica, bem como para modelagem de processos biológicos, destacando-se a transdução de sinal via fluxos iônicos e dobramento de proteínas (AKRAM et al., 2016; COLLINS et al., 2007; LIU, ZHIJING et al., 2016; TIAN et al., 2015).

O efeito Hofmeister, também chamado de efeito de íon específico refere-se à capacidade de cátions ou ânions interferirem nas propriedades físicas de macromoléculas. Esse efeito foi notificado pela primeira vez em 1888 pelo pesquisador Franz Hofmeister, ao observar a capacidade de íons estabilizarem soluções de proteínas evitando a precipitação. Também foi observado que a agregação e a sedimentação das proteínas em solução de cátions e ânions pode variar notavelmente com espécies iônicas diferentes, mesmo que a valência e a natureza química desses íons sejam semelhantes (HOFMEISTER, 1888; KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004).

Nos últimos anos, uma ampla variedade de fenômenos biológicos, a partir da dobragem de proteína, atividade enzimática para montagem coloidal e cristalização de proteínas, tem mostrado seguirem a série Hofmeister, na qual classifica a influência relativa dos íons no comportamento físico dos processos aquosos. Esse comportamento é mais característico utilizando ânions ao invés de cátions (JANC et al., 2016; LIU et al., 2013; LO NOSTRO et al., 2006; NAMUR et al., 2009; NORONHA et al., 2015; PEGRAM et al., 2010; SALAY et al., 2009; TOLEDO GRIJALBA et al., 2006; YANG et al., 2006).

Uma ordem típica para a reatividade desses íons é:



O íon cloreto é considerado o ponto divisor entre esses dois comportamentos, pois o mesmo não apresenta interferência relevante (COLLINS; NEILSON; ENDERBY, 2007; LIGHT et al., 2016a; YEH et al., 2010; ZHANG; CREMER, 2010a). Íons a esquerda do cloreto são chamados cosmotrópicos, enquanto íons a direita do cloreto são denominados caotrópicos. Esses íons são conhecidos por afetarem a solubilidade de compostos relativamente apolares em água, bem como a sua

distribuição entre água e solventes orgânicos (COLLINS; NEILSON; ENDERBY, 2007). Os íons cosmotrópicos interagem mais fortemente com as moléculas de água e diminuem a solubilidade do soluto, enquanto os agentes caotrópicos provocam o oposto. Esses termos foram originalmente desenvolvidos referindo-se a habilidade que esses íons têm de alterarem as ligações de hidrogênio das moléculas de água que envolvem os solutos (COLLINS; NEILSON; ENDERBY, 2007; SCHREIER; MALHEIROS; DE PAULA, 2000).

Embora seja evidente que os efeitos de Hofmeister são associados com cargas de superfície, a compreensão do seu mecanismo ainda é tema de debates. Entretanto, alguns estudos recentes indicam que a ação central sobre a água pode não ser o principal fator que descreve as propriedades dos íons de Hofmeister, e alguns resultados mostram que esse efeito decorre da interação direta entre o íon e a macromolécula, bem como, a interação dos mesmos com a primeira camada de hidratação. Porém ainda não há um consenso a respeito desse importante fenômeno (SALAY et al., 2015; SALIS; NINHAM, 2014; TIAN et al., 2015; WILLIAMS; NINHAM; BOSTRO, 2003; ZHANG; CREMER, 2006, 2010; OKUR et al., 2017).

Nos últimos anos uma série de biomateriais nanoestruturados vem sendo desenvolvidos com um grau altíssimo de controle sobre sua composição, estrutura e propriedades. Um material nanoestruturado em particular chama a atenção, o peptídeo P<sub>11</sub>-2, desenvolvido por Neville Boden e colaboradores na Universidade de Leeds - Inglaterra, e que tem a propriedade de se auto-organizar com a concentração de maneira totalmente controlada e de forma hierárquica, partindo da forma molecular formando até estruturas supramoleculares complexas (fitas, fibras e géis) com o aumento da concentração. Nesse caso particular foi feito um estudo teórico e experimental muito elaborado que permitiu se obter um conhecimento físico-químico profundo e detalhado do peptídeo (DAVIES et al., 2009; FISHWICK et al., 2003; NYRKOVA et al., 2000).

Por outro lado, o efeito de íons da série de Hofmeister apesar de sua grande importância biológica como a homeostase e sinalização de cálcio, até papéis fundamentais de cátions específicos em metaloproteínas, ainda é matéria de debates e de muitas investigações acerca de seu mecanismo (OKUR et al., 2017). Assim, o peptídeo P<sub>11</sub>-2, constitui-se um modelo ideal para se investigar os íons da série de Hofmeister e contribuir para o entendimento físico-químico desse fenômeno de importância tão ampla em nanobiotecnologia. Então, propomos usá-lo como um sistema modelo para se compreender a ação de íons de Hofmeister, investigando como esses íons influenciam o

processo de auto-organização desse peptídeo. Com isso, esperamos adquirir uma melhor compreensão em nível molecular do efeito de íons de Hofmeister, contribuindo para a compreensão dos aspectos físico-químicos desse importante fenômeno.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever a ação dos íons Hofmeister e como esses íons influenciam o processo e auto-organização do peptídeo sintético P<sub>11-2</sub>, utilizando técnicas instrumentais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estudar o efeito dos íons Hofmeister sobre a auto-associação do peptídeo nanoestruturado P<sub>11-2</sub> utilizando as técnicas de espectroscopia de fluorescência e UV-vis.
- Estudar o efeito dos íons Hofmeister sobre a conformação do peptídeo nanoestruturado P<sub>11-2</sub> utilizando a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular.

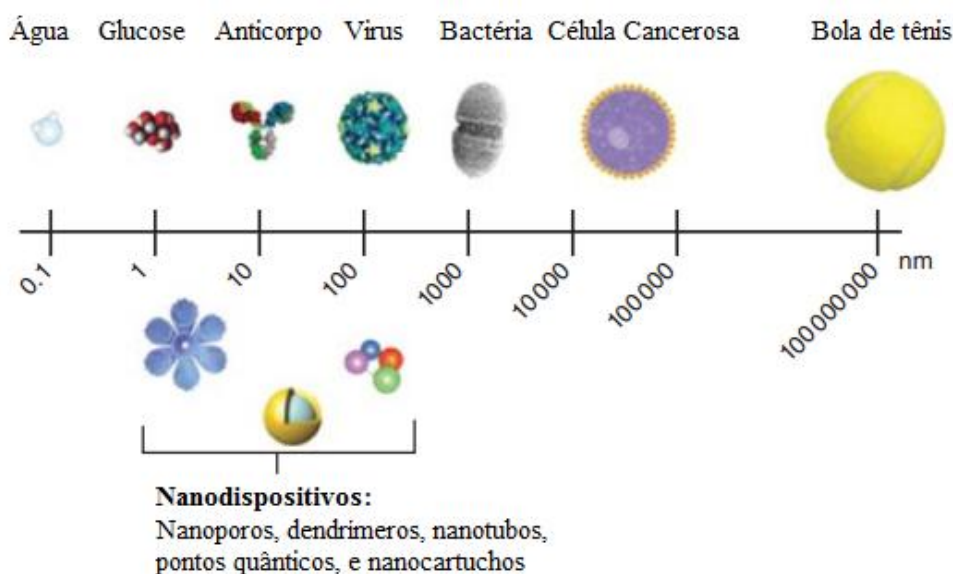
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Nanotecnologia

O século XIX foi considerado a era do ferro e do aço, devido ao fato de que os mesmos eram projetados de forma controlada e/ou adaptada e utilizados para diversos fins. O século XX trouxe ao mundo o desenvolvimento de novos tipos de materiais, especificamente polímeros. Na segunda metade deste século surge uma classe importante de material inorgânico, os semicondutores. Esses são a base para a segunda revolução industrial e o surgimento da tecnologia da informação. No entanto, parece justo dizer que muitas propriedades dos materiais duros são bem compreendidas, enquanto ainda existe muito a se aprender sobre a matéria mole. Somente no século XXI diversos pesquisadores criaram estruturas complexas, baseadas na natureza, formadas por biopolímeros, e exploraram a nanotecnologia para criar dispositivos baseados em auto-organização de polímeros (HAMLEY, 2007).

A nanotecnologia é a ciência que estuda as estruturas e fenômenos em nanoescala, mais precisamente na faixa de cerca de 1 a 100 nanômetros (Figura 1). Na área de química esse tamanho está relacionado, de modo geral, a colóides, micelas e polímeros (VISAKH, 2016).

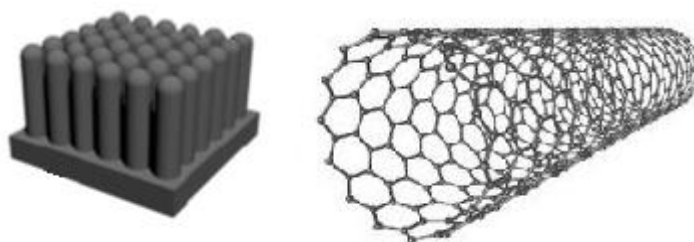
Figura 1 – Escala nanométrica.



Fonte: VISAKH, 2016 (tradução própria)

A nanociência e nanotecnologia têm como objetivo o estudo e aplicação de materiais extremamente pequenos que podem ser usados em todos os outros campos da ciência, como química, biologia, física, ciência de materiais e engenharia. Algumas estruturas como nanotubos de carbono e os nanorods de silício são exemplos interessantes de nanoestruturas, que podem ser aplicadas como semicondutores (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática do nanorods de silício e nanotubo de carbono.



Fonte: NIEMEYER, 2007.

A nanobiotecnologia é um campo de pesquisa recente e em rápida evolução, envolve princípio nos cruzamentos da biotecnologia e da nanociência, duas áreas interdisciplinares, cada uma das quais combina avanços em ciência e engenharia. Atualmente, a nanobiotecnologia é um campo que diz respeito à utilização de sistemas biológicos otimizados através da evolução, como células, componentes celulares, ácidos nucleicos, proteínas e peptídeos, para fabricar arquiteturas nanoestruturadas e mesoscópicas funcionais composta de materiais orgânicos e inorgânicos. A nanobiotecnologia também diz respeito ao refinamento e aplicação de instrumentos, originalmente concebidos para gerar e manipular materiais nanoestruturados, para estudos básicos e aplicados de processos biológicos fundamentais (NIEMEYER, 2007).

### 3.2 Peptídeos

Um dos primeiros artigos sobre proteínas foi publicado em 1745 pelo estudioso italiano Jacopo Bartolomeo Beccari, que isolou o glúten da farinha de trigo. Já entre 1808 e 1810, outro pesquisador, John Dalton, foi pioneiro na elucidação de estruturas proteicas. Em meados do século XIX, já existiam diversas demonstrações do efeito de enzimas em substâncias proteicas, nas quais se dissociavam em fragmentos chamados de peptonas. Ainda nesse século já eram conhecidos os aminoácidos. Então, a partir das

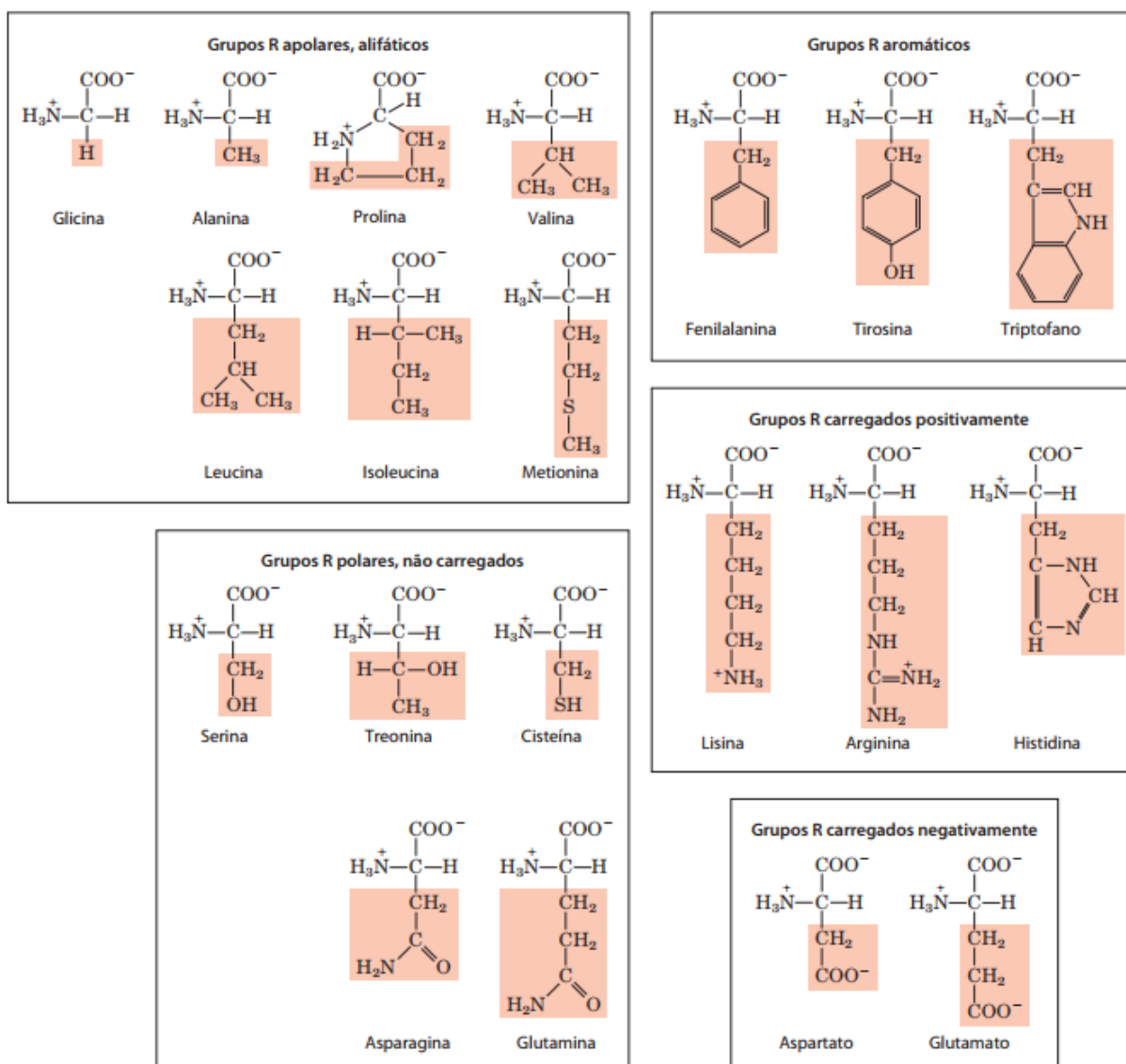
informações disponíveis, Emil Fischer afirmou que provavelmente as proteínas eram construídas de um conjunto de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A partir daí Emil Fischer seguiu no campo da química de proteínas, onde para muitos pesquisadores ainda era um tabu. Juntamente com E. Fourneau prepararam o primeiro dipeptídeo livre, a glicilglicina, por hidrólise parcial do diketopiperazina e em 1902, eles apresentaram o nome de “peptídeos” (BARRETT; ELMORE, 2004; JULIANO, 1990).

Proteínas são polímeros de aminoácidos, com cada resíduo de aminoácido unido ao seu vizinho por um tipo específico de ligação covalente (o termo “resíduo” reflete a perda de moléculas de água quando um aminoácido é unido a outro). As proteínas podem ser degradadas (hidrolisadas) em seus aminoácidos constituintes por vários métodos, e os elementares envolvendo proteínas se concentraram naturalmente nesses aminoácidos livres delas derivados. Vinte aminoácidos (Figura 3) diferentes são comumente encontrados em proteínas. O primeiro descoberto foi a asparagina em 1806 e o último dos 20 a ser descoberto (treonina) não havia sido identificado até 1938. Todos os aminoácidos têm nomes comuns ou triviais, em alguns casos derivados da fonte da qual foram primeiramente isolados. A asparagina foi descoberta primeiramente no aspargo e o glutamato no glúten do trigo; a tirosina foi isolada a primeira vez a partir do queijo (seu nome é derivado do grego tyros, “queijo”); e a glicina (do grego glykos, “doce”) foi assim denominada devido ao seu sabor adocicado (JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014; SEWALD; JAKUBKE, 2009).

A importância e o amplo papel funcional dos peptídeos nos processos vitais tornaram-se evidentes apenas nos anos 50 e no início dos anos 60, quando o desenvolvimento contínuo de métodos e técnicas analíticas, cada vez mais sensíveis para isolamento e purificação, sinalizou o início de uma nova era neste campo de pesquisa. Vários hormônios peptídicos importantes, por exemplo, insulina e glucagon do pâncreas, corticotropina da adenohipófise, oxitocina e vasopressina da neurohipófise, e a angiotensina do plasma sanguíneo foram isolados durante a década de 1950 (BARRETT; ELMORE, 2004; DAVIES, 1998; SEWALD; JAKUBKE, 2009).

Os peptídeos são, formalmente, oligômeros ou polímeros de aminoácidos, ligados por ligações amidas (ligações peptídicas) entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amino do seguinte aminoácido. Os peptídeos naturais e as proteínas codificadas por DNA geralmente contêm até 22 diferentes aminoácidos. As diferentes cadeias laterais R dos aminoácidos contribuem fundamentalmente para o seu modo de ação bioquímica (SEWALD; JAKUBKE, 2009).

Figura 3 – Os 20 aminoácidos comuns de proteínas. As fórmulas estruturais mostram o estado de ionização que predomina em pH 7,0. As porções não sombreadas são aquelas comuns a todos os aminoácidos; aquelas sombreadas são os grupos R. Embora o grupo R da histidina seja mostrado sem carga, seu pKa é tal que uma pequena mas significativa fração desses grupos seja positivamente carregada em pH 7,0.



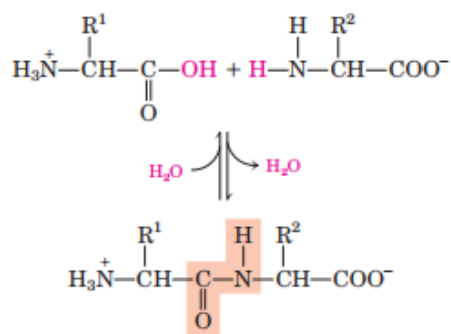
Fonte: NELSON; COX, 2014

Duas moléculas de aminoácidos podem ser ligadas de modo covalente por meio de uma ligação amida substituída, denominada ligação peptídica, a fim de produzir um dipeptídeo. Tal ligação é formada pela remoção de moléculas de água (desidratação) do grupo  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e do grupo  $\alpha$ -amino do outro (Figura 4). A



formação da ligação peptídica é um exemplo de uma reação de condensação, uma classe comum de reações nas células vivas. Em condições bioquímicas padrão, o equilíbrio para a reação mostrada na Figura 4 favorece os aminoácidos em relação ao dipeptídeo. Para tornar a reação mais favorável termodinamicamente, o grupo carboxila deve ser modificado ou ativado quimicamente, de modo que o grupo hidroxila possa ser mais rapidamente eliminado (DAVIES, 1998; LANGEL, 2011; NELSON; COX, 2014).

Figura 4 – Formação de uma ligação peptídica por condensação. O grupo α-amino de um aminoácido (com grupo R2) atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxila de outro aminoácido (com grupo R1), formando uma ligação peptídica (sombreada).



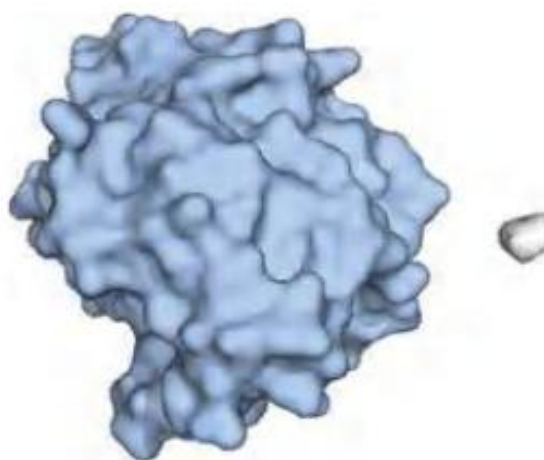
Fonte: NELSON; COX, 2014

Os aminoácidos podem ser unidos de modo covalente por meio de ligações peptídicas para formar peptídeos e proteínas. As células geralmente contêm milhares de proteínas diferentes, cada uma com uma atividade biológica diferente. As proteínas podem ter cadeias peptídicas muito longas de 100 a muitos milhares de resíduos de aminoácidos. Entretanto, alguns peptídeos que ocorrem naturalmente possuem apenas alguns poucos resíduos de aminoácidos. Algumas proteínas são compostas por várias cadeias polipeptídicas associadas de modo não covalente, chamadas de subunidades. Proteínas simples produzem, por hidrólise, apenas aminoácidos, já proteínas conjugadas contêm além deles, alguns outros componentes, tais como um metal ou um grupo prostético (lipídeos, carboidratos, fosfatos, porfirina férrica) (JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

As proteínas possuem um esqueleto covalente formado por centenas de ligações simples, sendo possível a “livre” rotação entre essas ligações, conseguindo então

assumir um grande número de conformações. Porém, cada proteína possui função química e biológica específica, sugerindo então uma estrutura tridimensional única para cada (Figura 5). Geralmente, o arranjo ordenado das moléculas em um cristal só pode ocorrer se as unidades moleculares forem idênticas, a descoberta de que diversas proteínas poderiam ser cristalizadas foi uma evidência de que até as proteínas muito grandes são “entidades” químicas separadas com estruturas únicas. Essa conclusão revolucionou o pensamento sobre as proteínas e suas funções, mas esse conhecimento foi incompleto, pois a estrutura proteica é sempre maleável, algumas vezes de forma surpreendente. Mudanças na estrutura podem ser tão importantes para a função da proteína quanto a estrutura por si só. Todas as proteínas passam por mudanças na conformação variando desde sutis até bastante significativas (FANUN, 2010; GSPONER; VENDRUSCOLO, 2006; NELSON; COX, 2014).

Figura 5 – Estrutura da enzima quimotripsina, uma proteína globular. A molécula de glicina (em cinza) é representada para comparação de tamanho



Fonte: NELSON; COX, 2014.

No contexto da estrutura de proteínas, o termo estabilidade pode ser definido como a tendência em manter a conformação nativa. Proteínas nativas são apenas marginalmente estáveis: o  $\Delta G$  que separa os estados dobrados e não dobrados em proteínas comuns, sob condições fisiológicas, está na faixa de apenas 20 a 65 kJ/mol. Uma dada cadeia polipeptídica pode, teoricamente, assumir inúmeras conformações e, como resultado, o estado não dobrado de uma proteína é caracterizado por um alto grau de entropia conformacional. Essa entropia, junto com as interações de ligações de

hidrogênio dos diversos grupos da cadeia polipeptídica com o solvente (água), tende a manter o estado não dobrado. As interações químicas que contrabalançam esses efeitos e estabilizam a conformação nativa incluem ligações dissulfeto (covalentes) e interações fracas (não covalentes); ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e iônicas (DEMING; AGGELI, 2012; NELSON; COX, 2014).

Para todas as proteínas de todos os organismos, as interações fracas são especialmente importantes para o enovelamento das cadeias polipeptídicas em suas estruturas secundárias e terciárias. A associação de múltiplos polipeptídeos para formar estruturas quaternárias também tem como base estas interações fracas. Aproximadamente 200 a 460 kJ/mol são necessários para quebrar uma ligação covalente simples, enquanto interações fracas podem ser rompidas com apenas 0,4 a 30 kJ/mol. Individualmente, uma ligação covalente, como as ligações dissulfeto conectando regiões distintas de uma única cadeia polipeptídica, é claramente muito mais forte que uma interação fraca. Entretanto, por serem muito numerosas, são as interações fracas que predominam como forças estabilizadoras da estrutura proteica (BARRETT; ELMORE, 2004; SEWALD; JAKUBKE, 2009).

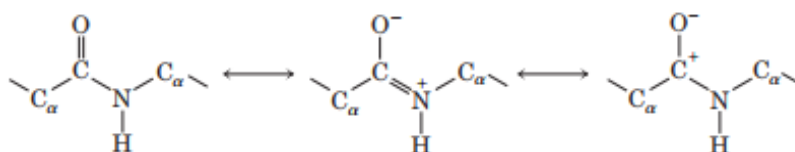
Em geral, a conformação proteica de energia livre mais baixa é aquela com o número máximo de interações fracas. A estabilidade de uma proteína não é simplesmente o somatório das energias livres de formação das diversas interações fracas internas. Para cada ligação de hidrogênio formada em uma proteína durante seu enovelamento, uma ligação de hidrogênio (de força equivalente) entre o mesmo grupo e a água é quebrada. A estabilidade resultante da contribuição de uma dada ligação de hidrogênio, ou a diferença de energia livre entre os estados dobrado e não dobrado, deve ser próxima de zero. Interações iônicas podem ser tanto estabilizadoras, quanto desestabilizadoras (BARRETT; ELMORE, 2004; NELSON; COX, 2014).

As ligações covalentes também impõem importantes restrições na conformação de um polipeptídeo. No final de 1930, Linus Pauling e Robert Corey iniciaram uma série de estudos que lançaram os fundamentos do entendimento atual sobre estrutura de proteínas. Eles começaram com uma cuidadosa análise da ligação peptídica (JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

Os carbonos  $\alpha$  de resíduos adjacentes de aminoácidos são separados por três ligações covalentes, arranjados na forma  $C\alpha-C-N-C\alpha$ . Estudos de difração de raios X de cristais de aminoácidos e de dipeptídeos e tripeptídeos simples mostraram que a ligação peptídica C-N é de alguma forma mais curta que a ligação C-N de uma amina simples, e

que os átomos associados à ligação peptídica são planares. Isso indicava a ressonância ou o compartilhamento parcial de dois pares de elétrons entre o oxigênio carbonílico e o nitrogênio da amida (Figura 6). O oxigênio tem uma carga parcial negativa e o hidrogênio ligado ao nitrogênio tem uma carga líquida parcial positiva, formando um pequeno dipolo elétrico. Os seis átomos do grupo peptídico estão em um único plano, com o átomo de oxigênio do grupo carbonílico *trans* ao átomo de hidrogênio do nitrogênio da amida. A partir destas observações, Pauling e Corey concluíram que as ligações peptídicas C-N não podem girar livremente, devido ao seu caráter parcial de ligação dupla. A rotação é permitida ao redor das ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C (JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

Figura 6 – Cada ligação peptídica tem algum caráter de ligação dupla devido à ressonância, e não pode girar. Embora o átomo de N em uma ligação peptídica seja sempre representado com uma carga parcial positiva, considerações cuidadosas dos orbitais de ligação e dos mecanismos quânticos indicam que o N tem uma carga líquida neutra ou levemente negativa.



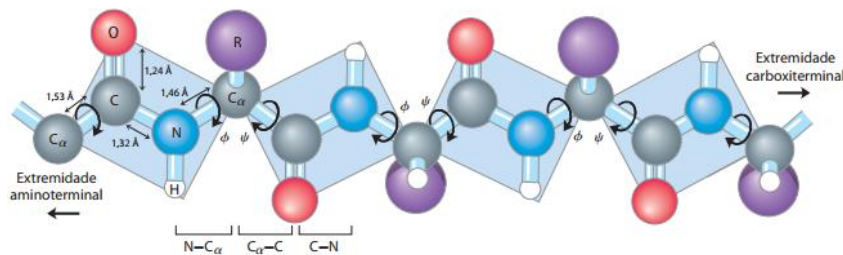
Fonte: NELSON; COX, 2014.

O esqueleto de uma cadeia polipeptídica pode, então, ser descrito como uma série de planos rígidos, com planos consecutivos compartilhando um ponto comum de rotação no C $\alpha$  (Figura 7). As ligações peptídicas rígidas limitam a variação de conformações possíveis para uma cadeia polipeptídica. A conformação da ligação peptídica é definida por três ângulos diedros (ângulos de torção), chamados de  $\Phi$  (phi),  $\Psi$  (psi) e  $\Omega$  (ômega), que refletem a rotação sobre cada uma das três ligações que se repetem no esqueleto do peptídeo (NELSON; COX, 2014).

Então, uma proteína típica geralmente tem uma ou mais estruturas tridimensionais, ou conformações que refletem sua função. Algumas proteínas têm segmentos intrinsecamente desordenados. A estrutura da proteína é estabilizada em grande parte por múltiplas interações fracas. As interações hidrofóbicas, derivadas do aumento da entropia da água circundante quando moléculas ou grupos apolares estão

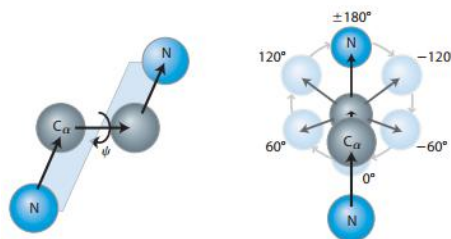
agrupados, são os principais fatores que contribuem para a estabilização da forma globular da maioria das proteínas solúveis. As interações de van der Waals também contribuem. As ligações de hidrogênio e interações iônicas são otimizadas nas estruturas termodinamicamente mais estáveis. Ligações covalentes não peptídicas, particularmente ligações dissulfeto, são importantes na estabilização da estrutura de algumas proteínas. A natureza das ligações covalentes no esqueleto polipeptídico estabelece restrições à estrutura. A ligação peptídica tem um caráter parcial de ligação dupla, que mantém todo o grupo peptídico de seis átomos em uma configuração planar rígida. As ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C podem girar para definir os ângulos diedros  $\Phi$  e  $\psi$ , respectivamente (DEMING; AGGELI, 2012; NELSON; COX, 2014).

Figura 7 – Três ligações separam os carbonos a consecutivos em uma cadeia polipeptídica. As ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C podem girar, sendo descritas pelos ângulos diedros designados  $\phi$  e  $\psi$ , respectivamente. A ligação peptídica C-N não está livre para rotação. Outras ligações simples do esqueleto também podem estar rotacionalmente obstruídas, dependendo do tamanho e da carga dos grupos R.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Figura 8 – (Esquerda) Átomos e planos que definem  $\Psi$ . (Direita) Por convenção,  $\Phi$  e  $\Psi$  são iguais a  $180^\circ$  (ou  $-180^\circ$ ) quando o primeiro e o quarto átomos estão mais afastados e os peptídeos estão totalmente estendidos. Ao longo da ligação que sofre rotação (para qualquer um dos lados), os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  aumentam à medida que o quarto átomo gira no sentido horário em relação ao primeiro.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

O termo estrutura secundária se refere a qualquer segmento de uma cadeia polipeptídica e descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal, sem considerar a posição de suas cadeias laterais ou sua relação com outros segmentos. Uma estrutura secundária comum ocorre quando cada ângulo diedro,  $\Phi$  e  $\psi$ , permanece igual, ou quase igual, ao longo do segmento. Existem alguns tipos de estruturas secundárias que são particularmente estáveis e ocorrem extensamente em proteínas. As mais conhecidas são as hélices e as conformações  $\beta$ ; outro tipo comum é a volta  $\beta$ . Quando um padrão regular não é observado, a estrutura secundária algumas vezes é chamada de indefinida ou espiral aleatória. Esta última, entretanto, não descreve adequadamente a estrutura desses segmentos. O curso da maioria dos esqueletos polipeptídicos em uma proteína típica não é aleatório pois é altamente específico e inalterado na estrutura e na função de uma proteína em particular (NELSON; COX, 2014).

Em 1948, Pauling na Universidade de Oxford desenvolveu um modelo de estrutura estável plausível que poderia ser adotada por uma cadeia polipeptídica, confirmado mais tarde no trabalho com Corey e o colaborador Herman Branson. Esse modelo foi o arranjo mais simples que a cadeia polipeptídica pode assumir e maximizar o uso de ligações de hidrogênio internas. É uma estrutura helicoidal que Pauling e Corey chamaram de hélice  $\alpha$  (Figura 9) (NELSON; COX, 2014).

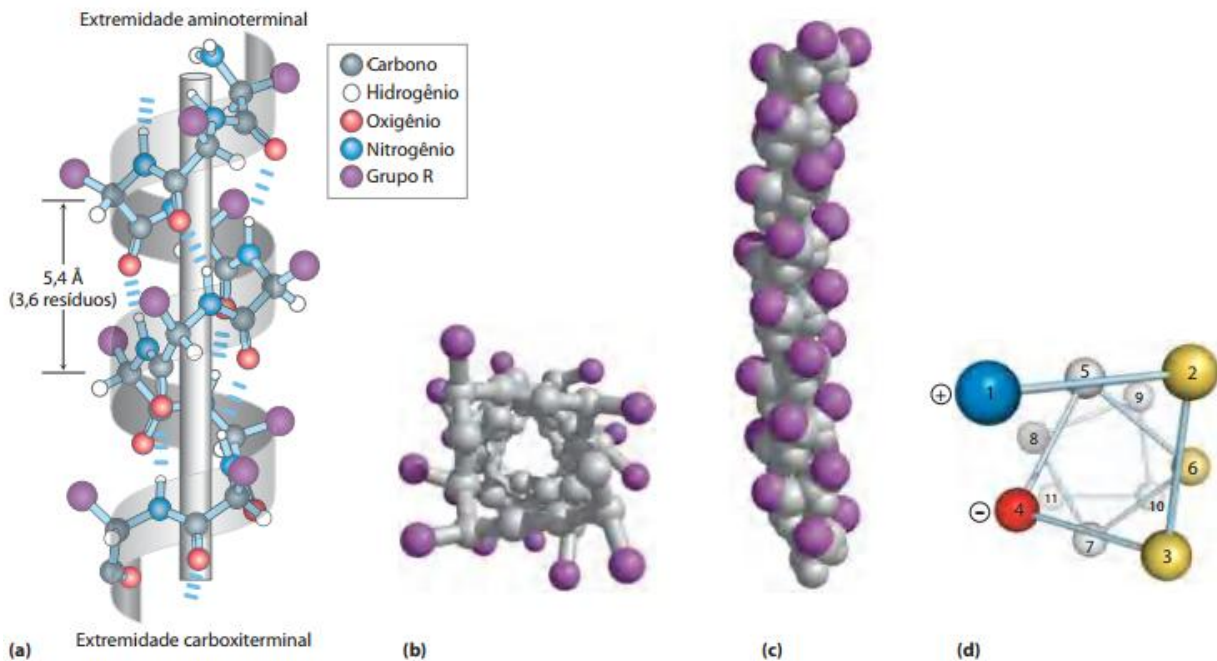
Nessa estrutura, o esqueleto polipeptídico é firmemente enrolado em torno de um eixo imaginário desenhado longitudinalmente no centro da hélice, e os grupos R dos resíduos de aminoácidos se projetam para fora do esqueleto helicoidal. A unidade que se repete forma uma volta de hélice, que se estende por cerca de 5,4 Å ao longo do eixo. Os átomos do esqueleto dos resíduos de aminoácidos em uma hélice  $\alpha$  típica têm um grupo característico de ângulos diedros que definem a conformação da hélice  $\alpha$  (Tabela 1), e cada volta de hélice é formada por 3,6 resíduos de aminoácidos (JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

Tabela 1 – Ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  ideais para estruturas secundárias comuns.

Estrutura	$\Phi$	$\psi$
Hélice $\alpha$	$-57^\circ$	$-47^\circ$
Conformação $\beta$		
Antiparalela	$-139^\circ$	$+135^\circ$
Paralela	$-119^\circ$	$+113^\circ$

Fonte: NELSON; COX, 2014 com modificações.

Figura 9 – Modelos de hélice  $\alpha$ , mostrando os diferentes aspectos de sua estrutura. (a) Modelo de esfera e bastão mostrando as ligações de hidrogênio internas da cadeia. A unidade que se repete forma uma volta da hélice: 3,6 resíduos. (b) Hélice  $\alpha$  vista de uma de suas extremidades, ao longo do eixo central. As posições dos grupos R são representados pelas esferas roxas. Modelo de esfera e bastão, que ressalta o arranjo helicoidal, dá uma falsa impressão de que a hélice é oca, pois as esferas não mostram os raios de van der Waals de cada um dos átomos. (c) Como este modelo de volume atômico mostra, os átomos no centro da hélice a estão em contato estreito. (d) Projeção da rotação helicoidal de uma hélice  $\alpha$ . Esta representação é colorida para a identificação de superfícies com determinadas propriedades. Os resíduos em amarelo, por exemplo, podem ser hidrofóbicos e fazer parte de uma interface entre a hélice mostrada aqui e outra parte do mesmo ou de outro polipeptídeo. Os resíduos vermelhos (negativo) e azuis (positivo) ilustram o potencial de interação de cadeias laterais de cargas opostas, separadas por dois resíduos na hélice.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Os segmentos de hélice  $\alpha$  em proteínas, normalmente se desviam um pouco desses ângulos diedros, podendo até variar dentro de um mesmo segmento, gerando curvaturas ou torções do eixo da hélice. Pauling e Corey consideraram as variantes da hélice  $\alpha$  voltadas tanto para direita quanto para esquerda. A elucidação da estrutura tridimensional subsequente da hélice  $\alpha$  da mioglobina e de outras proteínas mostrou que a hélice  $\alpha$  voltada para direita é a forma comum. As hélices  $\alpha$  estendidas voltadas para esquerda são teoricamente menos estáveis e não foram observadas em proteínas. De forma geral, cerca de um quarto de todos os resíduos de aminoácidos das proteínas é

encontrado em hélices  $\alpha$  (DEMING; AGGELI, 2012; JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

Nem todos os polipeptídeos podem formar uma hélice  $\alpha$  estável. Cada resíduo de aminoácido em um polipeptídeo tem uma propensão intrínseca de formar uma hélice  $\alpha$  (Tabela 2), consequência das propriedades de seu grupo R e como elas interferem na capacidade de seus átomos de conexão da cadeia principal em aceitar os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  característicos. A alanina apresenta a melhor tendência a formar hélices  $\alpha$  na maioria dos sistemas-modelo experimentais. A posição de um resíduo de aminoácido em relação a seus vizinhos também é importante. Interações entre cadeias laterais dos aminoácidos podem estabilizar ou desestabilizar a estrutura  $\alpha$ -helicoidal. Por exemplo, se uma cadeia polipeptídica possui uma longa sequência de resíduos Glu, esse segmento da cadeia não irá formar uma hélice  $\alpha$  em pH 7,0. Os grupos carboxílicos, carregados negativamente, dos resíduos Glu adjacentes repelem-se mutuamente de forma tão forte que impedem a formação da hélice  $\alpha$ . Pela mesma razão, se existem muitos resíduos Lys e/ou Arg, com grupos R carregados positivamente em pH 7,0, eles também se repelem, impedindo a formação da hélice  $\alpha$ . O volume e a forma dos resíduos Asn, Ser, Thr e Cys também podem desestabilizar uma hélice  $\alpha$  se estiverem muito próximos na cadeia (DEMING; AGGELI, 2012; NELSON; COX, 2014).

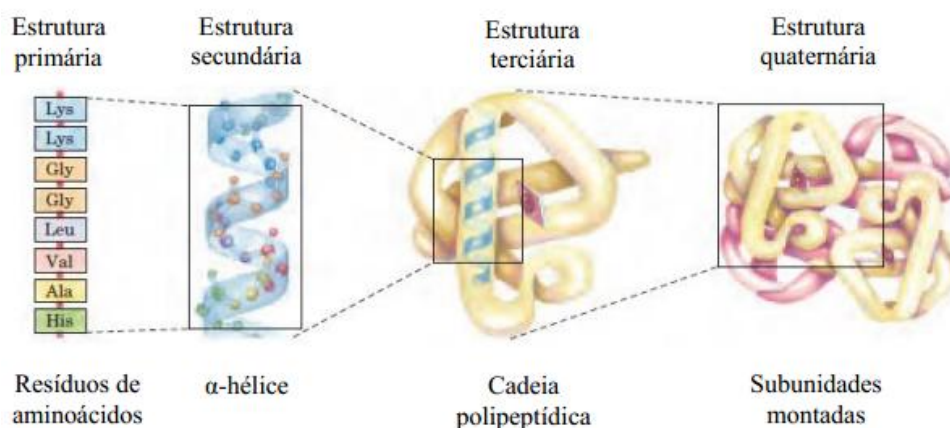
Tabela 2 – Tendência dos resíduos de aminoácidos em assumir a conformação de hélice  $\alpha$ .

Aminoácido	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	Aminoácido	$\Delta\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2
Cys	3	Pro	>4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	4,6	Tyr	2
His	2,6	Trp	2
Ile	1,4	Val	2,1

Fonte: NELSON; COX, 2014 com modificações.



Figura 10 – Níveis de estruturas nas proteínas.

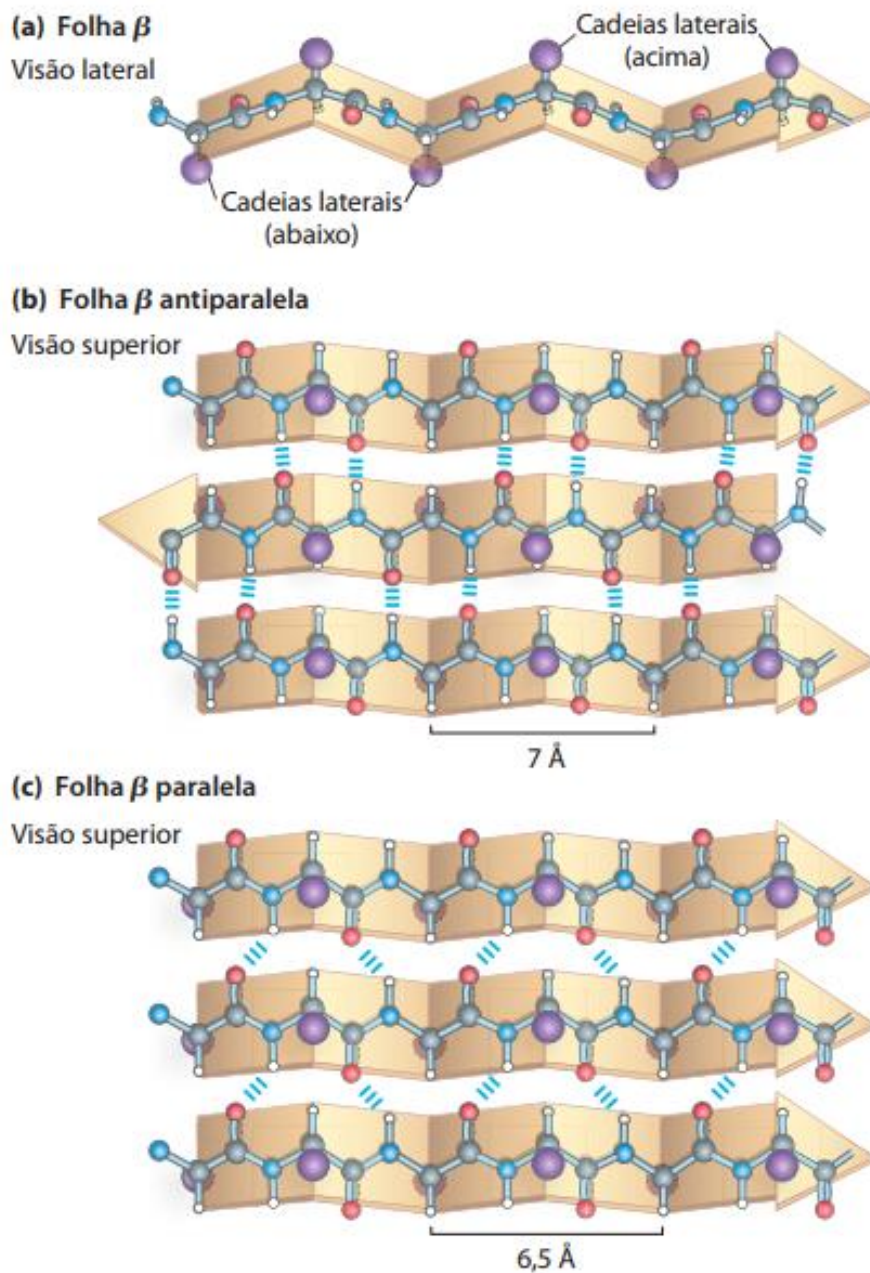


Fonte: NELSON; COX, 2014..

Em 1951, Pauling e Corey reconheceram um segundo tipo de estrutura recorrente, a conformação  $\beta$ . Essa é uma conformação mais estendida das cadeias polipeptídicas, e sua estrutura é de novo definida pelos esqueletos dos átomos arranjados de acordo com grupo característico de ângulos diedro (Tabela 1). Na conformação  $\beta$ , o esqueleto da cadeia polipeptídica está estendido em forma de “zigue-zague”, em vez de em estrutura helicoidal (Figura 11). O arranjo de vários segmentos lado a lado, os quais estão na conformação  $\beta$ , é chamado de folha  $\beta$ . A estrutura em “zigue-zague” dos segmentos polipeptídicos individuais dá origem a uma aparência pregueada da folha em geral. As ligações de hidrogênio são formadas entre segmentos adjacentes da cadeia polipeptídica, dentro da folha. Os segmentos que formam a folha  $\beta$  normalmente estão próximos na cadeia polipeptídica, mas também podem estar bem distantes uns dos outros na sequência linear do polipeptídeo; eles podem até estar em cadeias polipeptídicas diferentes. Os grupos R dos aminoácidos adjacentes se projetam da estrutura em “zigue-zague” em direções opostas, criando um padrão alternado que pode ser observado na visão lateral da Figura 11. As cadeias polipeptídicas adjacentes em uma folha  $\beta$  podem ser tanto paralelas quanto antiparalelas (apresentando uma orientação aminocarboxiterminal igual ou oposta, respectivamente). As estruturas são, de alguma forma, semelhantes, apesar de o período de repetição ser menor na conformação paralela (6,5 Å, versus 7 Å para a antiparalela) e o padrão das ligações de hidrogênio ser diferente. As ligações de hidrogênio intersegmentos são alinhadas na folha  $\beta$  antiparalela, enquanto elas são distorcidas ou não alinhadas na variante paralela. As estruturas ideais exibem os ângulos de ligação dados na Tabela 1; esses valores variam um pouco nas proteínas verdadeiras, resultando em uma variação estrutural,

conforme visto anteriormente para as hélices  $\alpha$  (DAVIES, 1998; JULIANO, 1990; NELSON; COX, 2014).

Figura 11 – A conformação  $\beta$  das cadeias polipeptídicas. Estas visões: (a) lateral e (b, c) superior mostram os grupos R saindo do plano da folha  $\beta$  e enfatizam a forma pregueada formada pelos planos das ligações peptídicas. As ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes também são mostradas. A orientação das cadeias adjacentes (setas), do aminoterminal para carboxiterminal, pode ser a mesma ou oposta, formando (b) folhas  $\beta$  antiparalelas ou (c) folhas  $\beta$  paralelas.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Outro tipo de estrutura de proteínas é a estrutura terciária que descreve todos os aspectos do enovelamento tridimensional de um polipeptídeo. A hélice é uma parte da estrutura terciária do polipeptídeo enovelado, em que ele próprio consiste em uma subunidade da estrutura quaternária da proteína. Desse modo, uma proteína ao possuir duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo espacial é referente a estrutura quaternária (Figura 10) (FANUN, 2010; LANGEL, 2011; NELSON; COX, 2014).

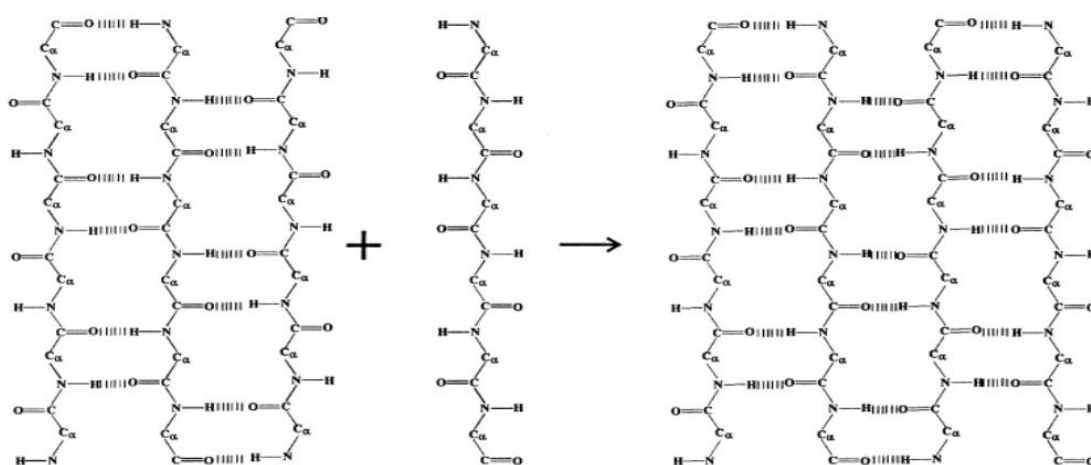
### **3.2.1 Peptídeos auto-organizáveis**

A auto-organização molecular, com o passar do anos, vem atraindo crescentes esforços e interesses internacionais de pesquisa devido à sua importância central na biologia e seu papel na compreensão da origem molecular de uma ampla gama de patologias, bem como o desenvolvimento industrial. Com o início de atividades mundiais em nanotecnologia, a auto-organização molecular também forneceu inspiração para a inovação e o desenvolvimento de novos produtos nos novos materiais nanoestruturados e biomiméticos, para administração de medicamentos, cicatrização de feridas e engenharia de tecidos e rotas de processamento inovadoras. A auto-organização molecular é uma rota atrativa para materiais nanoestruturados, que podem ter uma série de propriedades de desempenho chave, como a área de superfície maciça e, assim, propriedades funcionais maiores, como adsorção ou ligação. Os nanomateriais podem ser leves e, portanto, apropriados para a miniaturização, podem ser controlados, por meio de ativação/desativação externa e, portanto, são injetáveis. Além disso, a auto-organização molecular é um fenômeno espontâneo, isto é, termodinamicamente favorável. Eles fornecem ainda uma metodologia barata, fácil e potencialmente rápida para a produção em massa de estruturas funcionais complexas. Os processos simples envolvidos na produção de estruturas auto-organizadas usando técnicas convencionais sob condições suaves, sem a necessidade de instrumentos caros e sofisticados, ou configurações severas, são particularmente adequados para aplicações industriais em grande escala (CASTILLO-LEÓN, 2012; RAD-MALEKSHAHI et al., 2016).

Os peptídeos podem ser facilmente sintetizados em grande número de variações, diversificando a estrutura e a função, eles podem ser projetados para minimizar a complexidade química e conformacional das proteínas biológicas e podem evoluir para blocos de construção progressivamente mais complicados. Os peptídeos criados de forma racional que se auto-organizam em fitas longas de folha  $\beta$  oferecem um dos sistemas mais simples e melhor entendidos para estudar a auto-organização hierárquica

de proteínas. As fitas são estabilizadas por interações intermoleculares precisas, a estrutura agregada é bem estudada e inequivocamente estabelecida, e os blocos de construção de peptídeos oferecem versatilidade das propriedades químicas e estruturais. O objetivo da auto-organização consiste em conceber um peptídeo de complexidade mínima, que se auto-organize em fitas folhas  $\beta$  antiparalelas alongadas, em um determinado solvente. Isto exige uma grande variação de energia livre negativa para a transformação de um peptídeo monomérico helicoidal/aleatório na solução ao fim de uma fita em crescimento (Figura 12) (RAD-MALEKSHAHI et al., 2016; WHITESIDES; KRIEBEL; MAYERS, 2004).

Figura 12 – Representação esquemática da auto-organização de moléculas peptídicas de modo a formar uma fita folha  $\beta$  antiparalela intermolecular crescente a partir de ligação de hidrogênio entre espinhas dorsais de peptídeos na conformação de fios  $\beta$  adjacentes. As ligações de hidrogênio entre as cadeias adjacentes também são mostradas. A orientação das cadeias adjacentes (setas), do aminoterminal para carboxiterminal, pode ser a mesma ou oposta, formando (b) folhas  $\beta$  antiparalelas ou (c) folhas  $\beta$  paralelas.

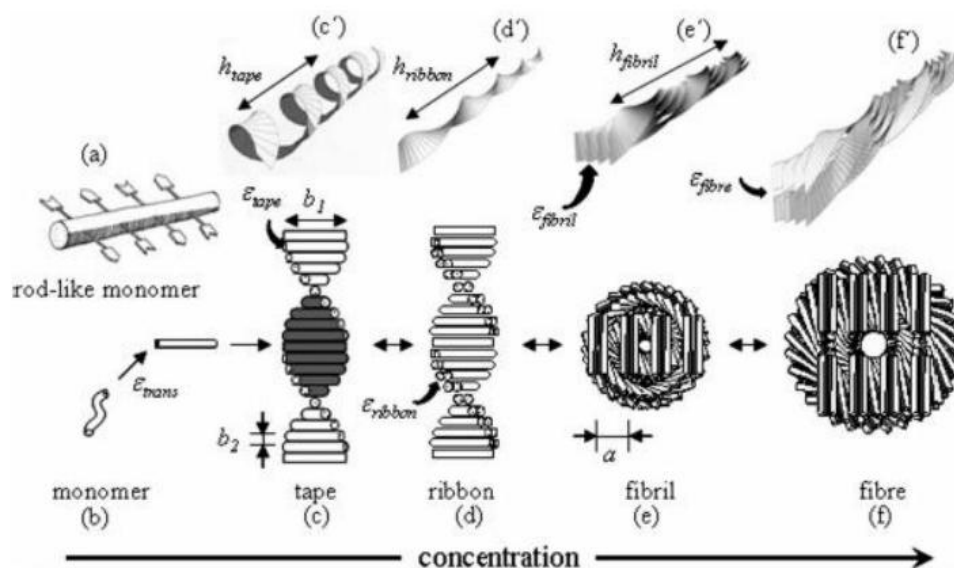


Fonte: RAD-MALEKSHAHI et al., 2016.

As nanoestruturas de peptídeos auto-organizáveis (Figura 13) podem imitar ou deslocar as diversas funções biológicas das proteínas naturais com propriedades enraizadas ou com funções de natureza sem precedentes. As nanoestruturas de peptídeos auto-organizáveis são construídas usando um processo de baixo para cima. Portanto, o conhecimento convencional de processos de auto-organização e técnicas de nanotecnologia pode ser aplicado ao desenvolver nanoestruturas de peptídeos auto-

organizáveis. Além disso, os princípios naturais relacionados à dobragem de proteínas e auto-organização podem fornecer inspiração valiosa para a construção de nanoestruturas de peptídeos auto-organizáveis artificiais. Nesse sentido, as nanoestruturas de peptídeos auto-organizáveis podem ser referidas como "nanoestruturas/nanomateriais de proteínas artificiais". A classificação das nanoestruturas de peptídeos auto-organizáveis é baseada em sua função, estrutura química, propriedades nanoestruturais e uso (BAEK et al., 2015; BOWERMAN e NILSSON, 2012; DAI e CHOI, 2013; MALEKSHAHI, 2015).

Figura 13 – Modelo de auto-organização hierárquica dos peptídeos da família P11 na qual a organização das diversas estruturas é expressa em termos de parâmetros energéticos moleculares. As Figuras (a) e (b) são monômeros, (c) e (c') fitas, (d) e (d') faixas, (e) e (e') fibrilas, (f) e (f') fibras.



Fonte: BAEK et al., 2015.

A auto-organização é a formação espontânea de estruturas ou padrões bem definidos a partir de blocos de construção sem intervenção humana. A auto-organização é um processo de equilíbrio de força que ocorre entre três forças principais: uma força motriz que reúne unidades de auto-organização, uma força oposta que se equilibra com a força motriz e uma força funcional que determina a direcionalidade e a funcionalidade dos objetos auto-montáveis. A força motriz básica subjacente ao processo de auto-organização consiste em interações não covalentes, como interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, força van der Waals, ligações de hidrogênio, interações de

empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e ligações de coordenação (BOWERMAN; NILSSON, 2012; WHITESIDES; KRIEBEL; MAYERS, 2004).

As interações hidrofóbicas são relativamente mais fortes do que outras forças intermoleculares fracas (por exemplo, interações de van der Waals). As interações hidrofóbicas são importantes na dobragem de proteína, que pode ser representada como colapso hidrofóbico. Além de proteínas, muitos outros anfifílicos biológicos e sintéticos empregam interações hidrofóbicas como determinantes principais para a associação (AGGELI et al., 2001; BOWERMAN; NILSSON, 2012).

A auto-organização de um composto anfifílico é dirigida pela separação de microfases de dois blocos diferentes. Quando o solvente seletivo (um bom solvente para uma região e um solvente pobre para a outra região) é a água, as regiões não-polares do agrupamento de substâncias anfifílicas juntas expõem a menor área hidrofóbica possível ao solvente aquoso, de modo que as regiões polares maximizam suas interações com o solvente. As interações hidrofóbicas não se devem a nenhuma atração intrínseca entre as regiões não-polares, mas são o resultado da tendência do sistema de alcançar a maior estabilidade termodinâmica. Quando um composto hidrofóbico é inserido na água, uma rede de moléculas de água ligadas ao hidrogênio é quebrada e as moléculas distorcidas da água produzem novas ligações de hidrogênio, formando uma concha altamente ordenada, chamada clatrato, em torno do agente hidrofóbico. Quando os compostos hidrofóbicos se juntam e interagem uns com os outros, a entalpia aumenta ( $\Delta H > 0$ ) porque algumas das ligações de hidrogênio que formam o clatrato serão quebradas. Ao mesmo tempo, separar uma porção da concha de clatrato faz com que a entropia aumente ( $\Delta S > 0$ ), uma vez que a formação de clatrato diminui a entropia. Uma vez que  $\Delta H$  tem um pequeno valor positivo e  $\Delta S$  tem um grande valor positivo neste processo, o resultado líquido é um negativo  $-\Delta G$  ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ), que explica a auto-organização espontânea de compostos anfifílicos em solução aquosa (BAEK et al., 2015; CASTILLO-LEÓN, 2012).

A interação eletrostática, que pode ser uma força atrativa ou uma força repulsiva, ocorre entre dois átomos carregados, íons ou moléculas que conduzem à interação de Coulomb. A interação de Coulomb é uma força forte (500-1000 kJ/mol) e de longo alcance (até  $\sim 50$  nm). A lei de Coulomb descreve a força ( $F$ ) da interação eletrostática entre cargas separadas. As interações eletrostáticas são muito mais fortes em um ambiente menos polar (BAEK et al., 2015; CASTILLO-LEÓN, 2012).

Nas proteínas e nos peptídeos, as interações eletrostáticas ocorrem entre as cadeias laterais de resíduos carregados de forma oposta, bem como entre os grupos carboxilato de terminal N-terminal e amônio do C-terminal. Devido ao seu estado carregado, os aminoácidos geralmente são encontrados na superfície da proteína, onde as interações com moléculas de água enfraquecem drasticamente essas forças. Como resultado, as interações eletrostáticas geralmente não contribuem significativamente para a estabilidade global das proteínas (CASTILLO-LEÓN, 2012).

As forças van der Waals são forças atrativas ou repulsivas entre moléculas que não sejam devido a ligações covalentes ou às interações eletrostáticas de íons. As forças van der Waals originam-se de interações dipolo ou dipolo-induzidas no nível atômico e molecular. Por outro lado, temos, os diferentes tipos de forças de van der Waals:

1. Interações Keesom: interações permanentes de dipolos permanentes;
2. Interações de Debye: interações de dipolo induzidas por dipolo permanente;
3. Forças de London (ou forças de dispersão): interações de dipolo induzidos.

As forças de van der Waals são muito importantes na dobragem de proteínas. Como os átomos estão constantemente oscilando, a indução de dipolos ocorre constantemente. Quando comparados com outras forças que influenciam a conformação proteica, as forças de van der Waals são extremamente fracas. No entanto, o grande número de forças de van der Waals em condições regulares organizadas em proteínas torna essas interações significativas para a manutenção da estrutura terciária (AGGELI et al., 2001; FENDLER, 1996).

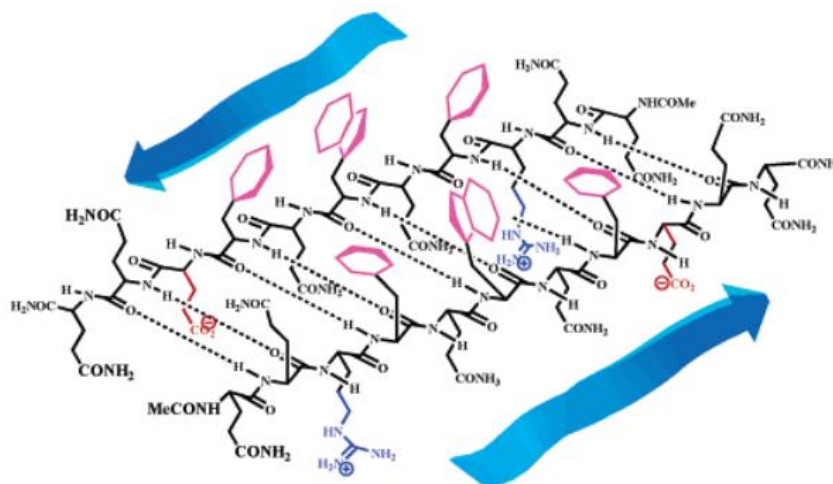
As ligações de hidrogênio são interações intermoleculares fortes e direcionais. A ordem geral de resistência da ligação é a seguinte: ligações covalentes (~ 500 kJ/mol) > ligações de hidrogênio (10-40 kJ/mol) > forças de van der Waals (~ 1 kJ/mol). As interações de hidrogênio são importantes para a compreensão da variedade de eventos que ocorrem em um sistema biológico. Eles se formam rapidamente entre um átomo eletronegativo e um átomo de hidrogênio covalentemente ligado a outro átomo eletronegativo (o doador de hidrogênio) na mesma ou em outra molécula. As ligações de hidrogênio são mais fortes quando as moléculas ligadas são orientadas para maximizar a interação eletrostática, que ocorre quando o átomo de hidrogênio e os dois átomos que a compartilham estão em linha reta - isto é, quando o átomo aceitador está alinhado com a ligação covalente entre o átomo doador e o hidrogênio. As ligações de hidrogênio contribuem significativamente para a estabilidade das hélices  $\alpha$ , para a

interação entre as folhas  $\beta$  e a interação das bases de DNA. Como resultado, as ligações de hidrogênio contribuem significativamente para a estabilidade geral das estruturas 3D precisas de proteínas e moléculas de ácido nucleico, que possuem muitas ligações de hidrogênio intramoleculares. Frequentemente, os átomos em cadeias laterais de aminoácidos formam ligações de hidrogênio com moléculas de água que estão presas dentro do interior de proteínas (CASTILLO-LEÓN, 2012; DEMING; AGGELI, 2012).

### 3.2.2 Peptídeo P<sub>11</sub>-2

O peptídeo P<sub>11</sub>-2, desenvolvido por Neville Boden e colaboradores na Universidade de Leeds- Inglaterra, e que tem a propriedade de se auto-organizar com a concentração de maneira totalmente controlada e de forma hierárquica partindo da forma molecular e com o aumento da concentração formando estruturas supramoleculares complexas formando fitas, fibras e géis (CARRICK et al., 2007; DAVIES et al., 2009). O peptídeo P<sub>11</sub>-2 tem a sequência CH<sub>3</sub>CO-Gln-Gln-Arg-Phe-Gln-Trp-Gln-Phe-Glu-Gln-Gln-NH<sub>2</sub> e foi projetado para ter lados hidrofóbicos e hidrofílicos, quando em uma conformação estendida, e, portanto, após a auto-organização, produzirá uma fita antiparalela que possui tanto um rosto hidrofóbico quanto hidrofílico (Figura14) (FISHWICK et al., 2003).

Figura 14 – Estrutura de peptídeo folhas  $\beta$  mostrando detalhes da ligação de hidrogênio e os alinhamentos da cadeia lateral do peptídeo P<sub>11</sub>-2.



Fonte: DAVIES et al., 2009.

O P<sub>11</sub>-2 possui natureza anfifílica, e as fitas formadas são associadas face-a face em solução aquosa, através do contato entre suas faces hidrofóbicas para produzir fitas



diméricas. Para esse peptídeo, a estrutura de faixa é formada em concentrações relativamente baixas de modo que as estruturas de fitas iniciais serão muito curtas, constituindo apenas 3-4 peptídeos de comprimento, para então as faixas começarem a se formar. A faixa é constituída por duas fitas em contato através de suas faces hidrofóbicas, e todo o objeto possui uma torção a esquerda sobre um eixo comum que corre ao longo do centro da fita. Esta torção e a sua quiralidade são devido à presença de resíduos de L-aminoácidos a partir do qual o peptídeo é composto e é indicativo da torção para esquerda de regiões folhas  $\beta$  em proteínas naturais. Vale à pena destacar que, como a faixa tem faces idênticas, não há nenhuma dobra dentro da estrutura e, ao contrário das fitas, existe como um objeto helicoidal, sem torção. Estas faixas podem empilhar-se para formar fibrilas torcidas, as características estruturais das quais são também racionalizadas por modelo teórico, o qual corresponde às dimensões reais da fibrila (em particular, o número de faixas empilhadas a partir do qual o composto é de fibrila) com os parâmetros energéticos controlando o processo de auto-organização (AGGELI et al., 2001; FISHWICK et al., 2003).

Em 1997 Aggeli e colaboradores projetaram peptídeos da família P<sub>11</sub> onde buscaram um desenho de peptídeos de complexidade mínima, que se auto-organizassem em folhas  $\beta$  antiparalelas em um determinado solvente. Isso requer uma grande mudança de energia livre negativa para a transformação de um peptídeo monomérico com estrutura aleatória (random coil) da solução até o final de uma fita em crescimento. Os peptídeos dessa família de folhas  $\beta$ , auto-organizam-se unidimensionalmente em hierarquias de estruturas bem definidas, governadas por parâmetros energéticos e pela concentração peptídica.

A estabilidade relativa de uma folha  $\beta$  em comparação com a estrutura aleatória é explicada, não pelas diferenças nas energias de ligação de hidrogênio, mas sim pelas forças entre as cadeias laterais dos aminoácidos vizinhos e as energias de solvatação das cadeias laterais (NELSON; COX, 2014).

O P<sub>11</sub>-2 (Figura 14) foi projetado racionalmente para formar fitas de folha  $\beta$  em água. Foi construído por aminoácidos polares e não polares, que promovem a formação de folha  $\beta$  através de ligações de hidrogênio entre fios do peptídeo, que mesmo sendo fracas, conferem grande estabilidade para a estrutura devido a quantidade. As porções (-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub> dos seis resíduos de glutamina (Gln) proporcionam interações intermoleculares hidrofóbicas atrativa entre as cadeias laterais. Os resíduos de fenilamina (Phe) e triptofano (Tpr) também são hidrofóbicos, portanto, fornecem interações hidrofóbicas

entre as faces das cadeias e o reconhecimento intermolecular pelas interações  $\pi$ - $\pi$ . Os aminoácidos arginina (Arg) e Ácido Glutâmico (Glu) fornecem forte interação coulombiana e complementaridade iônica, além de favorecerem um alinhamento antiparalelo. As cadeias laterais de Arg, Gln e Glu tornam uma superfície da folha  $\beta$  mais hidrofílica que a outra.

Nesse peptídeo, existem dois fluoróforos, que são a Phe e o Trp. Esses são fluoróforos intrínsecos que ocorrem naturalmente sem necessidade de adicioná-lo na amostra. Porém, na prática, a fluorescência do Trp é a mais estudada, pois possui um rendimento quântico cerca de 6,5 vezes maior que a Phe.

Devido à quiralidade dos resíduos de aminoácidos, a hierarquia estrutural dos peptídeos terá uma torção intrínseca. Para a agregação ocorrer, esses peptídeos torcidos devem dobrar e mudar sua torção para caber na moldura estabelecida pela torção imposta pelos peptídeos vizinhos, resultando no gasto de energia elástica que deve ser compensado pelo ganho de energia de atração para agregar-se a outros peptídeos.

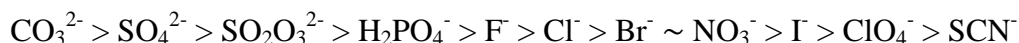
### **3.3 Série de Hofmeister**

A ciência coloidal e a biologia de membranas podem ser descritas notavelmente bem usando a teoria eletrostática de camada dupla de campo médio. A única propriedade iônica incluída nesta teoria é a carga iônica. No entanto, não há nada de específico sobre íons nesta teoria que possa explicar por que, por exemplo, a protonação proteica depende da escolha da solução salina de fundo. Os efeitos de Hofmeister que são comuns na biologia apresentaram um mistério por mais de 100 anos. Uma importante fonte de especificidade de íons perdida na teoria clássica de dupla camada é o potencial de dispersão iônico que atua entre um íon e uma interface. Os íons têm em geral uma polarização diferente do que a água circundante (específico para cada íon) e, portanto, apresenta um potencial de dispersão muito específico perto de uma interface. Em altas concentrações de sal, onde os potenciais eletrostáticos se tornam mais e mais divididos, esses potenciais de dispersão iônica dominam a interação completamente (LEBERMAN, 1991; LO NOSTRO et al., 2006).

Os efeitos dos íons da série Hofmeister foram observados pela primeira vez em 1888 pelo pesquisador Franz Hofmeister (daí o nome Série de Hofmeister), onde notou que alguns íons estabilizam proteínas contra a precipitação, e a agregação e a sedimentação das proteínas em solução de cátions e ânions pode variar notavelmente com espécies iônicas diferentes, mesmo que a valência e natureza química desses íons

sejam semelhantes. O pesquisador observou também que os ânions possuíam um maior efeito salting-in/salting-out em proteínas do que os cátions (efeito desprezível) (HOFMEISTER, 1888).

Esse comportamento é mais característico utilizando ânions ao invés de cátions. Uma ordem típica para a ação desses íons é:



Os íons destacados a esquerda do cloreto são chamados íons cosmotrópicos, e possuem a tendência de precipitar proteínas em solução e prevenir o desenovelamento de proteínas, por outro lado os íons que se encontram a direita do cloreto são denominados íons caotrópicos, que por sua vez aumentam a solubilidade e promovem a desnaturação de proteínas. O íon cloreto é considerado o ponto divisor entre os comportamentos cosmotrópicos e caotrópicos. Esses termos foram originalmente desenvolvidos referindo-se a habilidade que esses íons têm de alterarem as ligações de hidrogênio da estrutura das moléculas de água que envolvem os solutos (SACHS; WOOLF, 2003; SALAY; SCHREIER, 2004).

Esse efeito é importante para indústria, pois diversas macromoléculas sofrem alterações em suas propriedades físicas devido a presença de cátions ou ânions em solução. E apesar do grande número de estudos dedicados a esta questão, que datam mais de um século, a origem desse efeito ainda é debatida. Teorias clássicas de solução, colóides e química de superfície com modelos eletrostáticos, as teorias do tipo DLVO de superfície, e as interações intermoleculares, são insuficientes para quantificar a especificidade experimental em altas concentrações de sal (SALIS; NINHAM, 2014; ZHANG; CREMER, 2006).

Diversos pesquisadores divergem sobre o mecanismo do efeito Hofmeister. Alguns seguem na linha mais tradicional e mais elementar, na qual explica o efeito por meio da propriedade caotrópica e cosmotrópica dos ânions sobre a água, levando os peptídeos e proteínas solubilizarem mais ou precipitarem. Trabalhos mais recentes mostram que a série Hofmeister catiônica e aniônica agora pode ser racionalizada principalmente em termos de interações específicas dos íons com a cadeia principal e grupos de cadeia lateral carregada na superfície da proteína ou peptídeo em solução. Nessas pesquisas atuais foram observadas limitações na separação de fenômenos de Hofmeister em contribuições catiônicas e aniônicas devido à condição de

eletroneutralidade, bem como o aparecimento de efeitos íons-específicos, levando a interações de íons de polaridade oposta (BROERING; BOMMARIUS, 2005; LIU et al., 2013; NOSTRO et al., 2004; OKUR et al., 2017; TANG et al., 2016; TIAN et al., 2015; TOLEDO GRIJALBA et al., 2006; ZHANG; CREMER, 2006, 2010b; ZHANG et al., 2005).

### **3.4 Fundamentação teórica das técnicas**

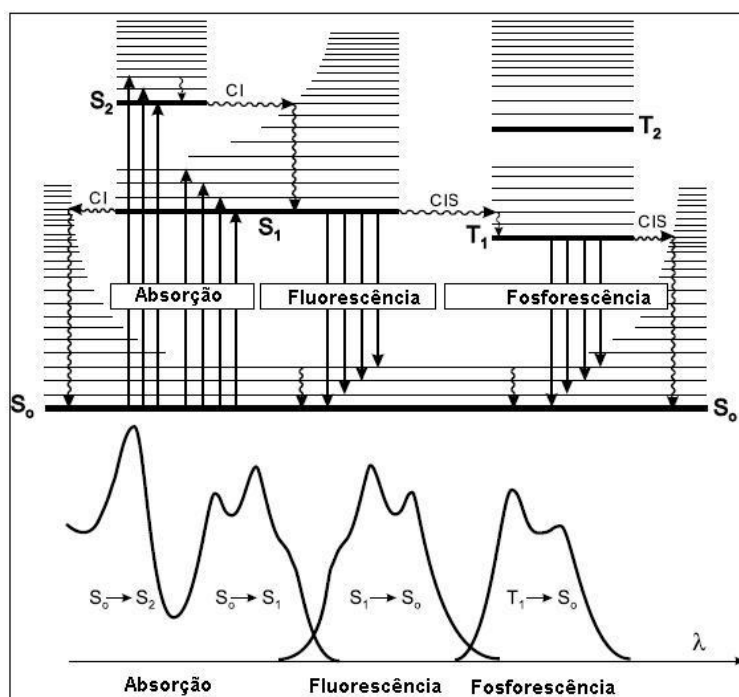
#### **3.4.1 Fluorescência**

O fenômeno da fluorescência juntamente com o da fosforescência, são casos particulares de luminescência. O modo de excitação é a absorção de um fóton, que traz as espécies absorventes para um estado excitado eletrônico. A emissão de fótons que acompanham a desexcitação é então chamada de fotoluminescência (fluorescência, fosforescência ou fluorescência desencadeada), que é um dos possíveis efeitos físicos resultantes da interação da luz com a matéria (GARRETT, 2006).

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão da luz são ilustrados pelo Diagrama de Jablonski, também conhecido como Diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 15). Tais diagramas existem em uma variedade de formas e ilustram os vários processos moleculares que ocorrem em estados excitados. Os diagramas foram assim nomeados em homenagem ao professor Alexander Jablonski (1898-1980), considerado como o pai da espectroscopia de fluorescência. Dentre as suas contribuições podemos citar sua definição do termo anisotropia para descrever a emissão polarizada de soluções (LAKOWICZ, 2006; VIRK, 2014).

Experimentos com peptídeos são feitos utilizando a técnica de fluorescência por meio da excitação no comprimento de onda de máxima absorção, em torno de 280 nm, onde o espectro de emissão se deve à contribuição tanto do triptofano como da tirosina. Entretanto, é possível excitar somente o triptofano entre 295 e 305 nm. Como os fluoróforos são sensíveis ao ambiente, a interação destas moléculas com o meio pode alterar a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a intensidade da emissão (LAKOWICZ, 2006).

Figura 15 – Diagrama de Perrin-Jablonski e a ilustração da posição relativa dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência.



Fonte: LAKOWICZ, 2006.

### 3.4.2 Dicroísmo Circular

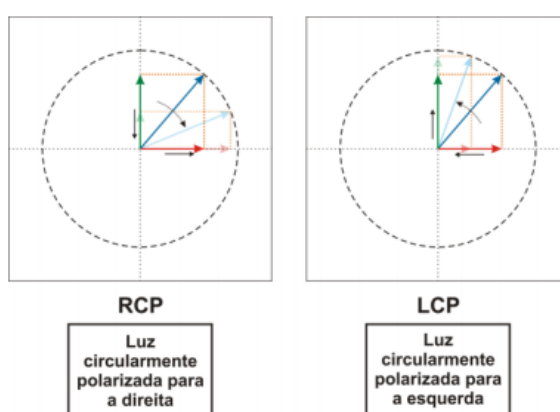
O dicroísmo circular ou CD (do inglês circular dichroism) é uma forma de espectroscopia que utiliza a absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário e/ou anti-horário. Um fenômeno que é comumente utilizado nos estudos da estrutura secundária de proteínas e destas em soluções e estudos de interações com outras moléculas (RNA, DNA e peptídeos). A fonte de luz para a instrumentação de CD é o xenônio, que gera bons resultados nos comprimentos de onda de 178 à 1000 nm (MURAKAMI; RULLER, 2016; NELSON; COX, 2014).

A espectroscopia de dicroísmo circular refere-se à absorção diferencial da luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda. A luz circularmente polarizada é obtida quando os vetores correspondentes às componentes elétrica e magnética da radiação eletromagnética, ao se somarem, geram uma componente que altera a sua direção de maneira circular ao longo do seu eixo de propagação, conforme mostra a Figura 16 (ESTEVEZ; COSTA, 2014; NELSON; COX, 2014).

Qualquer forma de assimetria estrutural em uma molécula leva a diferenças de absorção da luz circularmente polarizada para a esquerda em relação à direita. Uma estrutura ordenada, como de uma proteína dobrada, resulta em um espectro de absorção que pode ter picos ou regiões com valores tanto positivos, quanto negativos. Para proteínas, os espectros são obtidos na região de ultravioleta distante (190 a 250 nm). A entidade que absorve luz, ou cromóforo, nessa região é a ligação peptídica; um sinal é obtido quando esta ligação peptídica está em um ambiente adequado (ESTEVES; COSTA, 2014; MURAKAMI; RULLER, 2016; NELSON; COX, 2014).

A diferença em coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita é colocada no gráfico em função do comprimento de onda. As hélices  $\alpha$  e as conformações folha  $\beta$  têm espectros de CD característicos (Figura 17). Com o espectro de CD, os bioquímicos podem determinar se as proteínas estão dobradas corretamente, estimar a fração da proteína que assume qualquer uma das duas estruturas secundárias comuns e monitorar as transições entre os estados enovelados e não enovelados (ESTEVES; COSTA, 2014; MURAKAMI; RULLER, 2016; NELSON; COX, 2014).

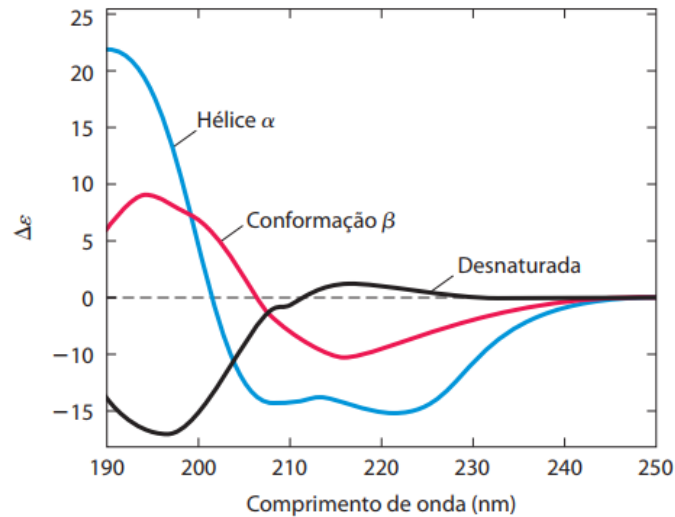
Figura 16 – Representação esquemática da polarização circular da radiação eletromagnética. A seta em vermelho corresponde à componente elétrica, a seta em verde à componente magnética e a seta em azul corresponde à soma das componentes. As demais setas indicam como variam as componentes elétrica e magnética em função do tempo.



Fonte: ESTEVES; COSTA, 2014.

Figura 17 – Espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Este espectro mostra a polilisina inteiramente como hélice  $\alpha$ , como conformação  $\beta$  ou desnaturada, espiral aleatória. A unidade do eixo y é uma simplificação das unidades comumente utilizadas nos experimentos

de CD. Como as curvas são diferentes para as hélices  $\alpha$ , as conformações  $\beta$  e a desnaturada, o espectro de CD fornece a determinada proteína uma estimativa da fração da proteína, formada pelas duas estruturas secundárias mais comuns.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Espectroscopia de dicroísmo circular utiliza mudanças na polarização da luz ultravioleta para fazer inferências quanto à estrutura secundária da proteína. Em média, essa técnica mostrou que as proteínas de membrana têm uma grande quantidade de hélices  $\alpha$  e pouca ou nenhuma folha  $\beta$ . Esse achado foi consistente com a maioria das proteínas de membrana que possuíam estrutura globular (ESTEVEZ; COSTA, 2014; MURAKAMI; RULLER, 2016; NELSON; COX, 2014).

### 3.4.3 Espectroscopia UV-vis

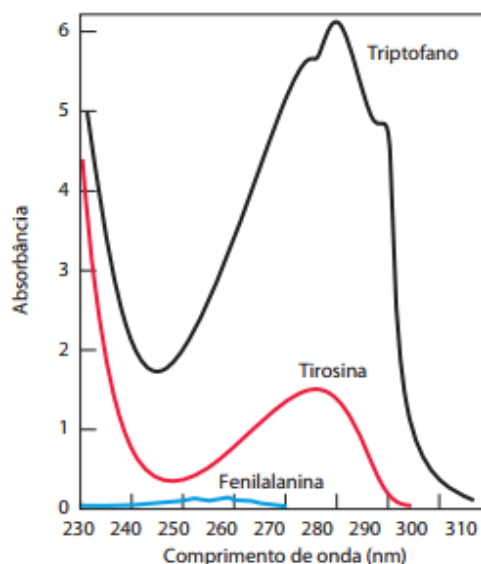
A espectroscopia por absorção no UV-vis é realizada incidindo um feixe de radiação eletromagnética sobre a amostra, sendo monitorada em função da variação do comprimento de onda. O feixe de luz monocromática atravessa uma solução contendo molécula absorvente (cromóforo), parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido como resultado de absorção. A absorção de luz depende da concentração das moléculas e do caminho óptico (GANCHOFF, 1990).

Os espectrofotômetros de absorção ultravioleta são um dos instrumentos analíticos mais versáteis e onipresentes nos modernos laboratórios de química de proteínas e peptídeos. A medição de um espectro de absorção/espectro óptico de proteína/peptídeo de alta resolução (190-400 nm) pode ser adquirida em um período de tempo muito curto (segundos a minutos) e é capaz de fornecer informações simultâneas

sobre a estrutura secundária peptídica (180- 220 nm), estrutura terciária (240-300 nm) e associação (agregação)/comportamento de dissociação (dispersão de luz acima de 300 nm). A preparação de amostras mínimas ou não, a aquisição rápida de espectros, o baixo custo e a instrumentação robusta e prontamente disponíveis tornam a UV-vis uma técnica ideal para estudar vários aspectos da estrutura e comportamento do peptídeo (ANDREW E. NIXON, 2014).

O triptofano, a tirosina e, em menor extensão, a fenilalanina, absorvem a luz ultravioleta. A absorbância medida do triptofano é mais do que quatro vezes aquela da tirosina em um comprimento de onda de 280 nm. Observe que a absorção luminosa máxima tanto para o triptofano quanto para a tirosina ocorre próxima de 280 nm. A absorção luminosa pela fenilalanina geralmente contribui pouco para as propriedades espectroscópicas das proteínas (Figura 18). Isso explica a forte absorbância de luz com comprimento de onda de 280 nm característica da maior parte das proteínas, propriedade explorada por pesquisadores na caracterização de proteínas (NELSON; COX, 2014).

Figura 18 – Absorção da luz ultravioleta por aminoácidos aromáticos. Comparação dos espectros de absorção de luz dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina em pH 6,0. Os aminoácidos estão presentes em quantidades equimolares ( $10^{-3}M$ ) sob condições idênticas.



Fonte: NELSON; COX, 2014.



## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Materiais e equipamentos utilizados**

#### 4.1.1 Materiais

- Água MiliQ
- Peptídeo P<sub>11-2</sub> (CH<sub>3</sub>CO-Gln-Gln-Arg-Phe-Gln-Trp-Gln-Phe-Glu-Gln-Gln-NH<sub>2</sub>) – Sintetizado no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por metodologia de síntese em fase sólida.
- Sulfato de Sódio (SIGMA)
- Cloreto de Sódio (SIGMA)

#### 4.1.2 Equipamentos

- Espectrofluorímetro RF-5301 - SHIMADZU
- Espectropolarímetro modelo JASCO 815
- Espectrofotômetro UV-vis modelo NOVA 1600 UV

### **4.2 Metodologia utilizada**

#### 4.2.1 Espectroscopia de Fluorescência

Medições de fluorescência foram obtidas usando um Espectrofluorímetro RF-5301 - SHIMADZU do laboratório de Pesquisa em Química situado na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), com celas de quartzo de 1 x 0,2 cm, operando com uma faixa de comprimento de onda de 290-500 nm, numa temperatura de 22 °C. Foram utilizados o peptídeo P<sub>11-2</sub> na concentração de 30 µM, e soluções contendo o peptídeo na mesma concentração com NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 M.

#### 4.2.2 Espectroscopia Ultravioleta – Visível

Medições de absorvância foram obtidas usando um espectrofotômetro modelo NOVA 1600 UV do laboratório de Pesquisa em Química situado na UESC, com celas de quartzo de 2 mm, operando com uma faixa de comprimento de onda de 290-500 nm,

numa temperatura de 22 °C. Foram utilizados o peptídeo P<sub>11-2</sub> na concentração de 30 µM, e soluções contendo o peptídeo na mesma concentração com NaCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 M. O peptídeo possui absorção característica em  $\lambda = 280$  nm, típica do fluoróforo Trp.

#### 4.2.3 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD podem ser utilizados para diversos tipos de estudos como, interações entre biomoléculas, monitoramento de mudança conformacional, etc. (LIMA et al., 2014). As conformações de peptídeos random coil, hélice  $\alpha$  e folha  $\beta$ , possuem espectros bastante característicos conforme mostrado na Figura 17.

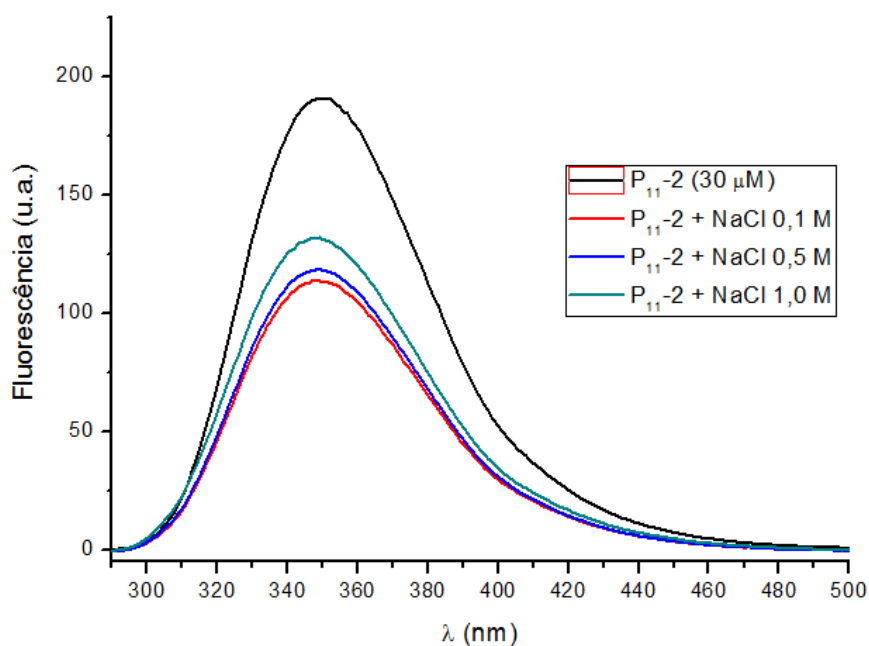
As análises conformacionais por CD foram realizadas utilizando um espectropolarímetro modelo JASCO 815 do Centro de Biotecnologia e Genética-CGB situado na UESC, no qual os espectros adquiridos foram do P<sub>11-2</sub> na concentração de 50 µM, e soluções contendo o peptídeo na mesma concentração com NaCl a 0,1; 0,2 e 0,3 M e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,5 M. O espectro de CD foi adquirido a 22°C utilizando uma cela de quartzo de 0,1 cm, no intervalo de comprimento de onda 190 a 260 nm. Foram realizadas 4 varreduras para cada amostra, com velocidade de varredura de 100 nm/min. Em seguida, os espectros foram tratados, onde foi feito a subtração do branco de cada amostra, a correção da linha de base, a transformação em elipticidade molar e depois a transformação em elipticidade molar residual.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Peptídeo P<sub>11-2</sub> na presença de NaCl

No espectro de emissão da Figura 19 pode-se observar o gráfico da intensidade da fluorescência versus o comprimento de onda ( $\lambda$ ) em nanômetros. Nesse espectro, é possível observar um comprimento de onda máximo de emissão  $\lambda_{\text{máx}} = 350$  nm, característico do Trp, na solução de P<sub>11-2</sub> a 30  $\mu\text{M}$  na ausência e na presença de diferentes concentrações de NaCl.

Figura 19 – Espectros de fluorescência de P<sub>11-2</sub> (30  $\mu\text{M}$ ) em meio aquoso na presença de NaCl  $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm, fenda: 3, Cella: 1 x 0,2 cm.



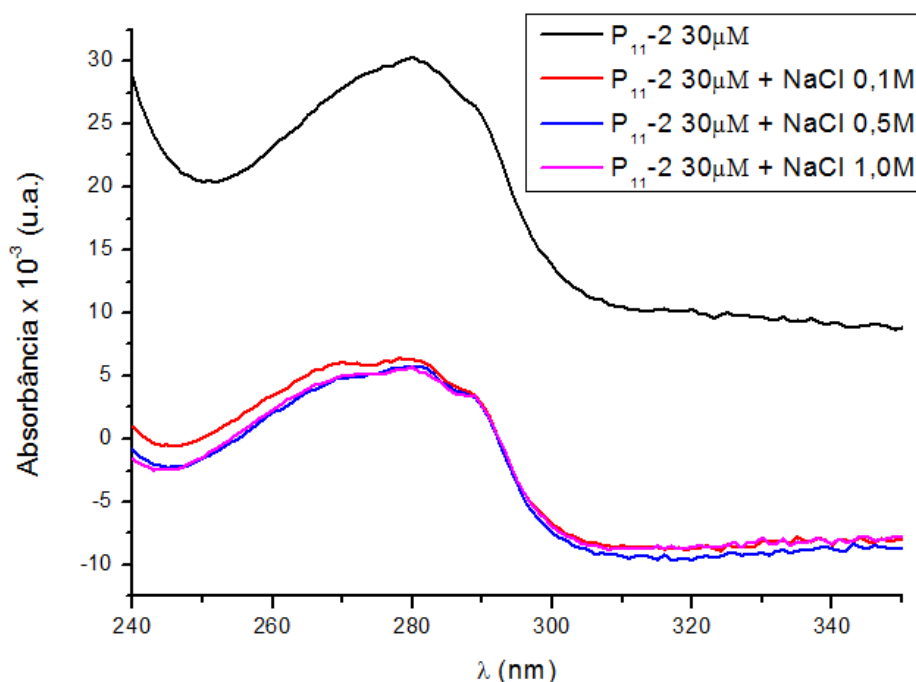
Fonte: Dados da pesquisa

Na concentração de 0,1 M do sal é possível observar que houve uma maior supressão da fluorescência do triptofano, e com o aumento da concentração do NaCl observa-se um aumento da emissão pelo triptofano. Esse comportamento do peptídeo com a adição de NaCl, condiz com a pesquisa de Parmar e Muschol 2009, na qual classifica o íon Cl<sup>-</sup> como agente levemente caotrópico, pois causa o efeito de salting-in (solubilização) em proteínas e peptídeos. Entretanto, levando em consideração somente

o fato de que o íon cloreto seja um agente levemente caotrópico, era de se esperar um aumento (mesmo que pequeno) da intensidade da emissão do triptofano, desde a adição de 0,1 M de NaCl. Porém, trabalhos recentes demonstram que para compreender o efeito Hofmeister em proteínas e peptídeos, não deve ser levado em conta somente o efeito do íon na solvatação da água, mas sim também as interações específicas entre os íons e a superfície das proteínas e peptídeos (HLADÍLKOVA et al, 2013; OKUR et al, 2017).

No estudo de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis utilizando o NaCl com o P<sub>11</sub>-2 (Figura 20) é mostrado que a adição do sal na solução do peptídeo, faz com que ocorra uma diminuição da absorção pelo Trp. É possível observar também que o aumento da concentração desse sal não mostra uma diferença significativa na absorbância.

Figura 20 – Espectros de absorbância UV-vis do P<sub>11</sub>-2 na presença e ausência de NaCl em diferentes concentrações.



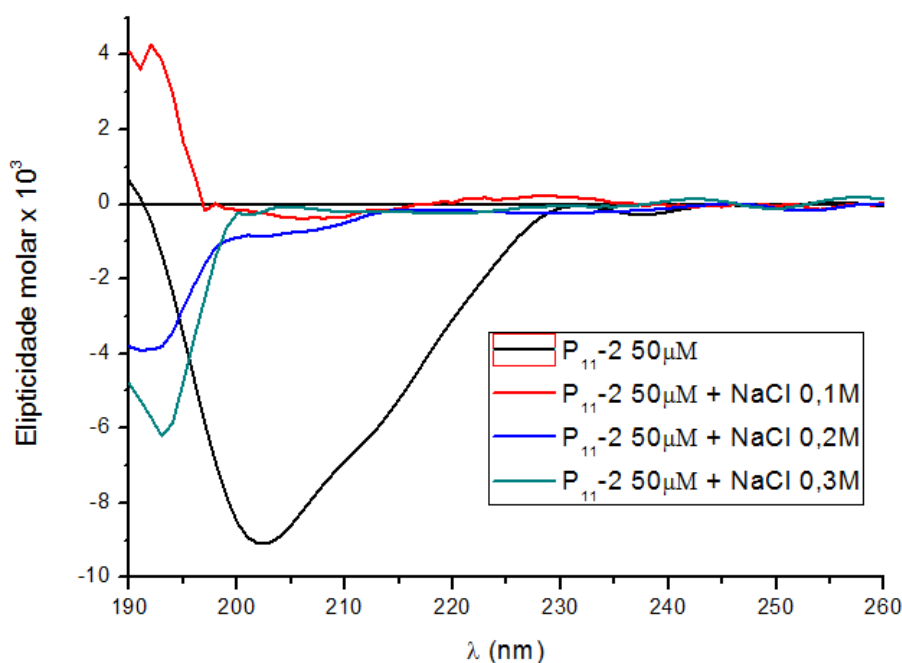
Fonte: Dados da pesquisa

Segundo Franz Hofmeister (1888), o cloreto geralmente é considerado a linha divisória entre esses dois tipos de comportamento (caotrópicos e cosmotrópicos) na série de Hofmeister. Segundo Mancinelli et al., 2007, os íons cloreto podem ser acomodados em solução sem causar distorções dramáticas na estrutura da água. A

diminuição da absorbância do Trp na presença de cloreto pode ser explicada por interação do cloreto com a superfície do peptídeo no qual favorece o colapso hidrofóbico e também pela leve tendência cosmotrópica do  $\text{Na}^+$ . Os cátions, segundo Hofmeister 1888, possuem efeito Hofmeister insignificante em relação aos ânions, porém diversos pesquisadores criticam essa afirmação e mostram que os cátions devem ser levados em consideração devido a interação dos cátions com a superfície do peptídeo (KALYUZHNYI; VLACHY, 2016; OKUR et al., 2017). O Trp por ser um aminoácido hidrofóbico, na presença de cargas negativas (íons cloreto) altera a estrutura do peptídeo de modo que o Trp não fique exposto ao meio polar (PEGRAM; RECORD, 2008; PEGRAM et al., 2010).

No espectro de CD da Figura 21, foi realizado a análise do  $\text{P}_{11-2}$  à  $50 \mu\text{M}$  na presença e ausência de NaCl em diferentes concentrações. A Figura 22 é o mesmo espectro da Figura 21, porém com a imagem ampliada e somente o perfil do peptídeo na presença de íons NaCl.

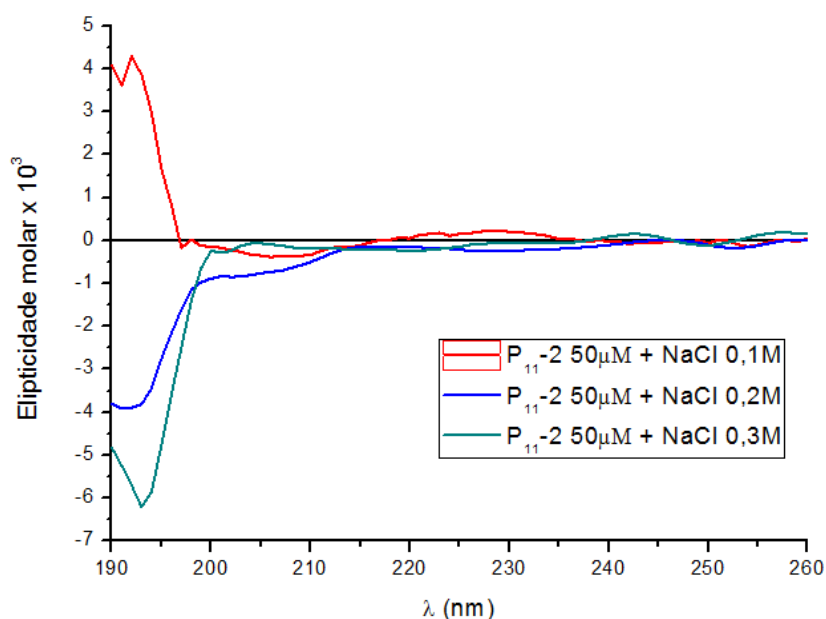
Figura 21 – Espectro de CD do  $\text{P}_{11-2}$  na ausência e presença de NaCl em diferentes concentrações .



Fonte: Dados da pesquisa

É possível observar nos espectros (Figuras 21 e 22) um ruído devido ao uso do NaCl na faixa de 190 a 200 nm, que deve ser descartado da análise. É possível observar também que o peptídeo sem adição do sal possui a conformação random coil (Figura 21) e após adição do sal apresenta uma mudança conformacional, porém desconhecida nas concentrações de 0,3 e 0,2 M (Figuras 21 e 22).

Figura 22 – Espectro de CD do P<sub>11</sub>-2 na presença de NaCl em diferentes concentrações .



Fonte: Dados da pesquisa

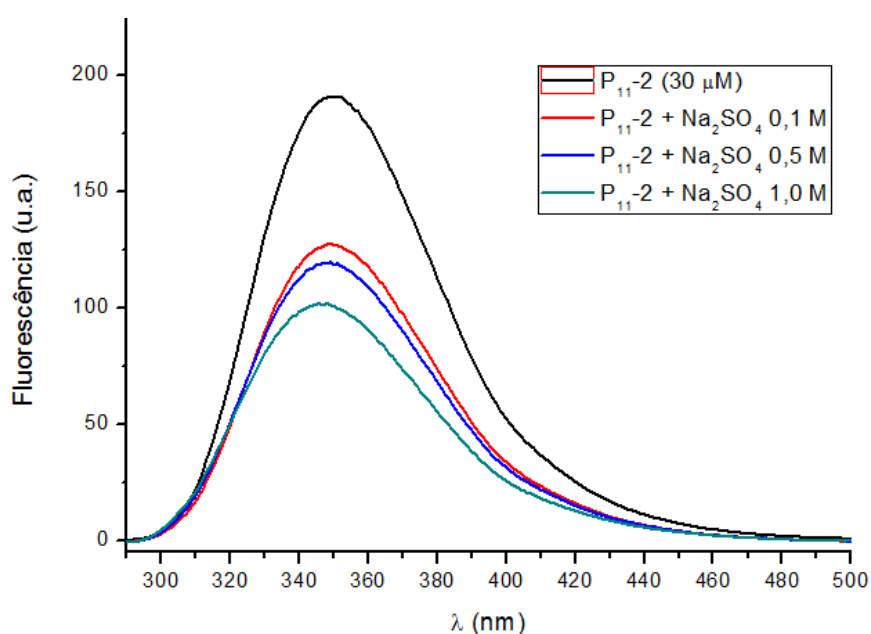
Essa possível formação de folha  $\beta$  em menor concentração de cloreto pode ser esperada devido a interações do cloreto com a superfície do peptídeo favorecendo o colapso hidrofóbico e também interações do  $\text{Na}^+$ , que segundo a série de Hofmeister, tem caráter cosmotrópico (BOSTRÖM et al., 2004; CARRICK et al., 2007; PARMAR e MUSCHOL, 2009; KALYUZHNYI; VLACHY, 2016; OKUR et al., 2017).

## 5.2 Peptídeo P<sub>11</sub>-2 na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

No espectro da Figura 23, é possível observar também um comprimento de onda máximo de emissão  $\lambda_{\text{máx}} = 350$  nm, característico do Trp, na solução de P<sub>11</sub>-2 a 30  $\mu\text{M}$ , bem como nas soluções do peptídeo com diferentes concentrações de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

É possível observar nesse espectro o efeito cosmotrópico do sulfato, no qual induz a precipitação do peptídeo pela supressão da fluorescência do Trp. O sulfato “organiza” a água de tal maneira que o peptídeo tenha menos contato com ela, fazendo com que ocorra o salting-out (PATEROVÁ et al., 2013).

Figura 23 – Espectros de fluorescência de P<sub>11</sub>-2 (30 µM) em água na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> λ<sub>exc</sub> = 280 nm, fenda: 3, Cella: 1 x 0,2 cm .



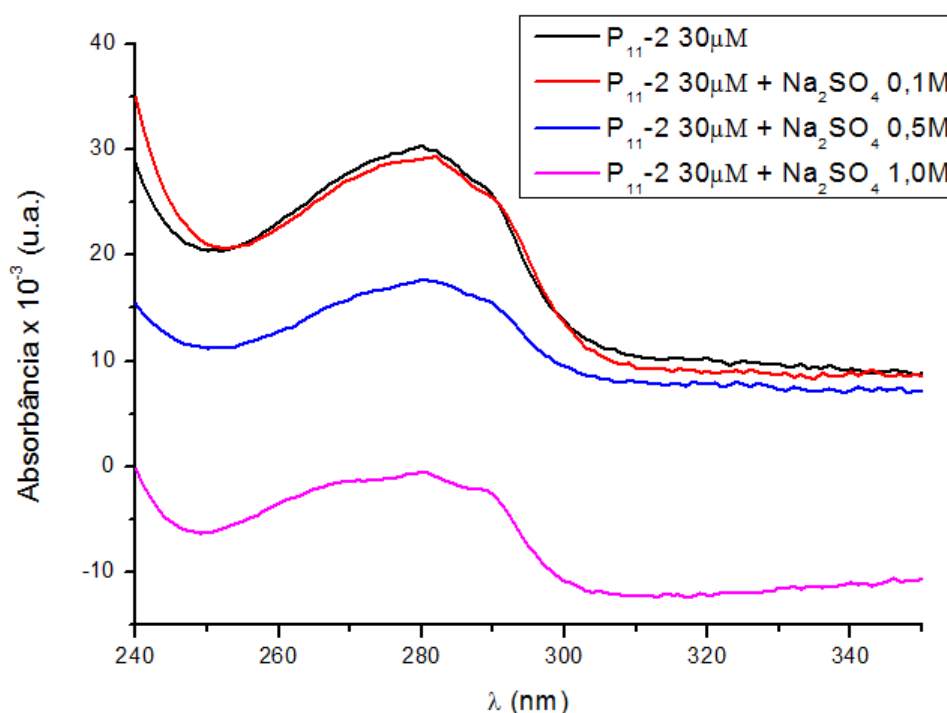
Fonte: Dados da pesquisa

Esse efeito é mais acentuado em concentrações mais altas de sulfato como visto no espectro. Salay e Schreier 2004, mostraram esse mesmo efeito cosmotrópico do íon sulfato no composto antitumoral doxirubicina, no qual o sulfato causou uma auto-organização pronunciada do fármaco, evidenciado pela diminuição da intensidade de fluorescência e pelo fato de na presença de lipossomos fazer com que a doxurubicina interagisse com os mesmos, particularmente lipossomos com carga negativa, com a carga negativa sendo uma característica da membrana lipídicas de célula tumorais. Esse espectro pode ser explicado somente com o efeito do ânion na “organização” da água. Porém, para diversos pesquisadores, essa consideração não é suficiente para explicar o

efeito Hofmeister, e (KALYUZHNYI; VLACHY, 2016; OKUR et al., 2017; ZHANG; CREMER, 2006; JUNGWIRTH; CREMER, 2014; PATEROVA et al., 2013).

No estudo de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis utilizando o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  com o  $\text{P}_{11}$ -2 (Figura 24) verifica-se que a adição do sal na solução do peptídeo, faz com que ocorra uma diminuição da absorção pelo Trp em função do aumento de concentração do sal.

Figura 24 – Espectros de absorbância UV-vis do  $\text{P}_{11}$ -2 na presença e ausência de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  em diferentes concentrações. .



Fonte: Dados da pesquisa

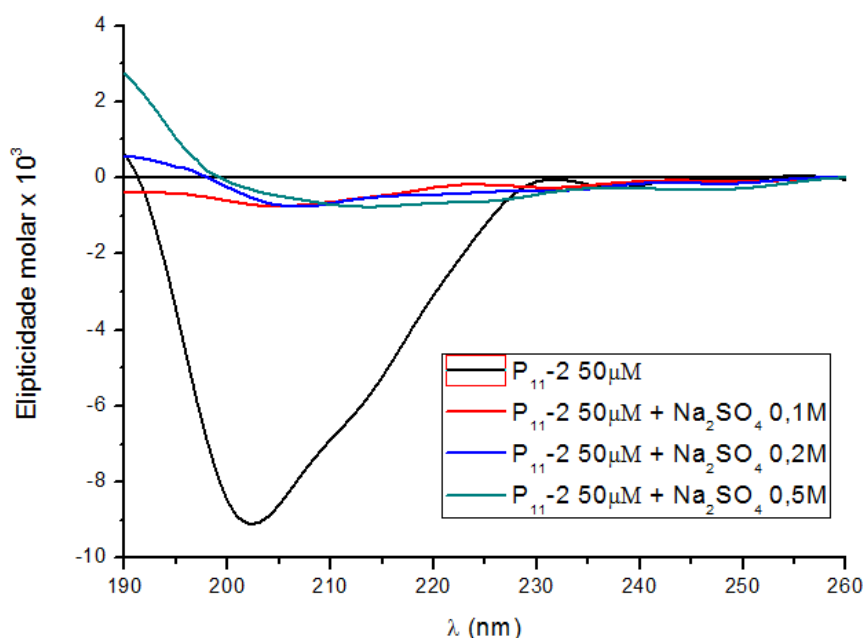
Com uma concentração pequena do sal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 M), praticamente não se verificou efeito significativo na absorção pelo triptofano, porém com uma concentração de 5 a 10 vezes maior, é possível observar uma diminuição substancial na absorbância. O íon sulfato é considerado por Hofmeister 1888 um íon cosmotrópico, ou seja, um íon que altera a estrutura da água tornando-a “mais ordenada”, fazendo com que as proteínas e peptídeos se precipitem (salting-out) alterando sua conformação. Esses íons cosmotrópicos atraem as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as moléculas de peptídeo o que acarreta na diminuição da solubilidade. O efeito Hofmeister dos agentes cosmotrópicos é diretamente proporcional a concentração dos íons. O efeito cosmotrópico do sulfato em soluções com biomoléculas



condiz com o relatado na literatura, onde existem trabalhos que evidenciam o salting-out dependente da concentração desse sal (KOU et al., 2015; LI et al., 2013; SALAY, L. C. e SCHREIER, 2004; SALAY, et al., 2015; TIAN et al., 2015; YAN et al., 2016).

No espectro de CD da Figura 25 foi utilizado o P<sub>11</sub>-2 na concentração de 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , abaixo da concentração que forma folha  $\beta$  que é 70  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (BERRET, 2004). Também foram utilizadas misturas do peptídeo com o sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes concentrações 0,1; 0,2 e 0,5 M, que se comporta como agente cosmotrópico segundo a série de Hofmeister.

Figura 25 – Espectro de CD do P<sub>11</sub>-2 na ausência e presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes concentrações.

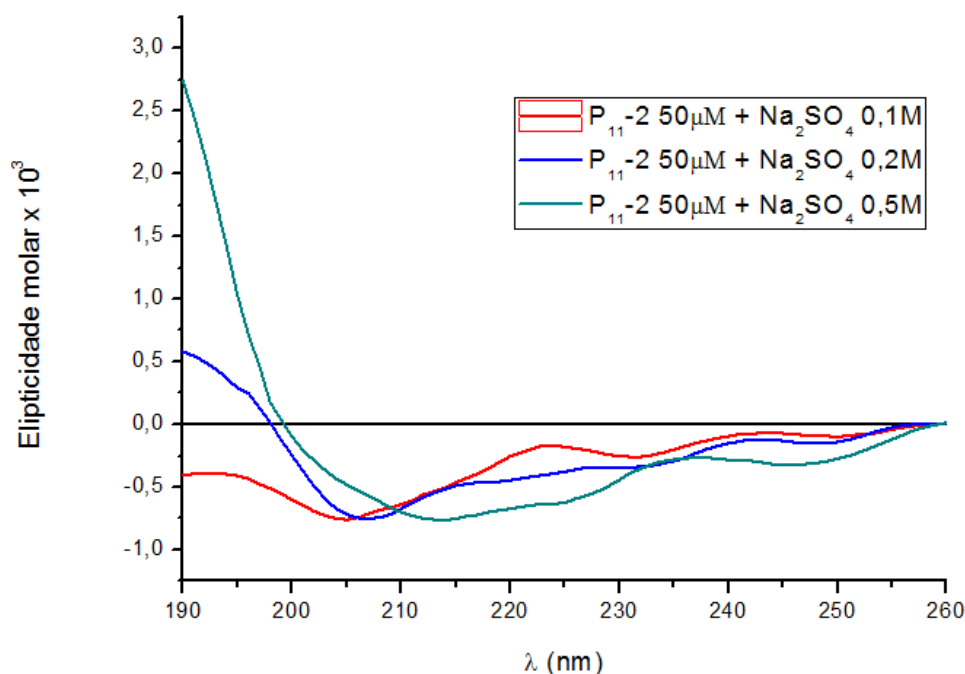


Fonte: Dados da pesquisa

Ao analisar o espectro da Figura 25, é possível observar uma banda negativa entre 200 e 205 nm característico da conformação random coil do peptídeo P<sub>11</sub>-2 (BERRET, 2004). Após a adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, é possível observar a mudança de conformação de random coil para folha  $\beta$  nas concentrações de 0,2 e 0,5 M do sal (Figura 26), com o aparecimento de uma banda positiva em 190 nm e de uma banda negativa entre 210 e 225 nm, particularmente na maior concentração de sal. No espectro é possível observar que a adição de 0,1 M do sulfato não alterou de modo significativo a

conformação do peptídeo, resultado condizente com a análise de UV-Vis para o mesmo sal.

Figura 26 – Espectro de CD do P<sub>11</sub>-2 na presença de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em diferentes concentrações.



Fonte: Dados da pesquisa

Essa mudança de conformação do peptídeo, de random coil para folha β, era esperada para o sulfato devido ao fato de o mesmo ser um agente cosmotrópico segundo a série de Hofmeister. O sulfato possui capacidade de alterar a estrutura da água tornando-a menos disponível para interagir com o peptídeo, fazendo com que o mesmo mude sua conformação formando estruturas supramoleculares. Ao tornar a água um ambiente menos favorável para as moléculas do peptídeo, o mesmo se auto-organiza em estruturas supramoleculares com conformação folha beta, mesmo em concentrações abaixo da concentração de agregação crítica, evidenciando o efeito Hofmeister do íon cosmotrópico sulfato. Diversos trabalhos mostram que o íon sulfato é um ótimo agente cosmotrópico e que o aumento da concentração desse íon aumenta a precipitação de proteínas e peptídeos (LIGHT, et al., 2016; SALAY; SCHREIER, 2004; TADEO et al., 2009; SALAY, et al., 2015).

Ions of Hofmeister induzem interações interfaciais complexas devido à sua propensão a alterar a estrutura da água (ZHANG; CREMER, 2006; CHEN et al., 2007; ZHANG; CREMER, 2010; COLLINS; WASHABAUGH, 1985). A imagem

convencional é que os íons cosmotrópicos (sulfato, fosfato, citrato) aumentam, enquanto os caotrópicos (tiocianato, perclorato e tricloroacetato) diminuem a estrutura da água, alterando a rede de ligação de hidrogênio da água ) COLLINS; WASHABAUGH, 1985). Entretanto, A natureza complexa do fenômeno de Hofmeister engloba tantos fatores que é difícil, no momento, elaborar um modelo quantitativo universal e a natureza detalhada desse fenômeno ainda é uma questão de debate (ZHANG; CREMER, 2006; GURAL et al., 2004; BALDWIN, 1995; BOSTRÖM et al., 2002; RONSTED, 2007; PARETOVÁ et al., 2007; JUNGWIRTH; CREMER, 2014; SONG, 2015). Estrutura de água, interações eletrostáticas e forças de dispersão são propostas para desempenhar um papel (ZHANG; CREMER, 2006; GURAL et al., 2004; BALDWIN, 1995; BOSTRÖM et al., 2002; ROMSTED, 2007; PARETOVÁ et al., 2007; JUNGWIRTH; CREMER, 2014; SONG, 2015). De fato, a noção de que a estrutura da água que faz e quebra pelos sais como característica principal do fenômeno de Hofmeister é posta de lado devido a várias evidências experimentais que indicam que a interação direta íons-macromoléculas é o principal fator responsável pela maioria dos aspectos do efeito de Hofmeister.

## CONCLUSÃO

Através dos estudos espectroscópicos realizados, foi observado que tanto nos espectros de fluorescência quanto nos de UV-Vis e CD, para o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , foi possível observar uma tendência significativa a mudança de conformação do  $\text{P}_{11-2}$  da estrutura secundária random coil para a do tipo folha  $\beta$  com o aumento da concentração do íon. Esse fenômeno pode ser explicado pela tendência dos íons cosmotrópicos alterarem a estrutura da água, tornando-a mais organizada e ocasionando o fenômeno de salting-out no peptídeo, porém, diversos estudos, demonstram que o efeito salting-out nos peptídeos e proteínas não dependem unicamente da interação do íon com a água, e sim em interações locais dos íons com a superfície dos peptídeos e proteínas.

Para o  $\text{NaCl}$ , analisando os espectros de fluorescência, UV-Vis e CD, é possível observar que houve uma tendência mista e pouco intensa de efeitos cosmotrópicos e caotrópicos desse sal. Essa última, observada claramente para o íon cloreto, uma vez que o cloreto ocasionou o efeito salting-in no peptídeo, de forma não tão significativa. O efeito cosmotrópico desse sal pode ter sido originado do íon  $\text{Na}^+$ , que é um cátion cosmotrópico de Hofmeister. Nas análises espectroscópicas foi possível observar que ao adicionar o  $\text{NaCl}$  na solução do peptídeo ocorreu uma mudança de conformação, porém não foi possível saber qual estrutura foi formada.

Diversos pesquisadores não consideravam que os cátions tinham um papel importante para explicar o efeito Hofmeister, pois a ideia de que os mesmos contribuíam de forma insignificante para o efeito era defendida por muitos, porém atualmente é defendido que os cátions possuem uma importância considerável no efeito Hofmeister. Além da necessidade de satisfazer a condição de eletroneutralidade no ambiente, pode haver interações de cátion/ânion particularmente fortes para sais específicos que tornam questionável o tratamento separado de cátions e ânions na série Hofmeister.

Contudo, há uma infinidade de funções biológicas que são controladas por íons, que vão desde homeostase e sinalização de cálcio, até papéis fundamentais de cátions específicos em metaloproteínas. E a maioria desses processos ultrapassam as interações genéricas de Hofmeister (interações íon/água). Tudo isso implica que existem outros efeitos específicos de íons nas interações com peptídeos além do alcance da série de Hofmeister o que continua a ser um importante desafio científico e tecnológico.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que são necessários estudos de simulações moleculares, juntamente com experimentos espectroscópicos, termodinâmicos e microscopia eletrônica de transmissão, afim de uma maior compressão da complexidade do efeito dos íons da série de Hofmeister com o peptídeo nanoestruturado P<sub>11</sub>-2, contribuindo de forma significativa para elucidação de diversos processos industriais na nanoescala.

## REFERÊNCIAS

AGGELI, A. et al. Engineering of peptide  $\beta$ -sheet nanotapes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 1135–1145, 1997.

AGGELI, A. et al. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide  $\beta$ -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 11857–11862, 2001.

AKRAM, M.; BHAT, I. A.; KABIR-UD-DIN. Effect of salt counterions on the physicochemical characteristics of novel green surfactant, ethane-1,2-diyl bis(N,N-dimethyl-N-tetradecylammoniumacetoxyl) dichloride. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 493, p. 32–40, 2016.

ANDREW E. NIXON. **Therapeutic Peptides: Methods and Protocols**. Cambridge, USA: [s.n.] 2014.

BAEK, K. et al. Self-Assembly of Nanostructured Materials through Irreversible Covalent Bond Formation. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2221–2229, 2015.

BALDWIN, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. **Biophysj**, v. 71, n. 4, p. 2056–2063, 1996.

BARRETT G. C.; ELMORE D. T. **Amino Acids and Peptides**. [s.l: s.n.], 2004.

BERRET, J. F. **Molecular Gels**. [s.l: s.n.], 2004.

BOSTRÖM, M.; WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W. Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1-2, p. 48–52, 2004.

BOWERMAN, C. J.; NILSSON, B. L. Self-assembly of amphipathic  $\beta$ -sheet peptides: insights and applications. **Biopolymers**, v. 98, n. 3, p. 169–84, 2012.

BROERING, J. M.; BOMMARIUS, A. S. Evaluation of hofmeister effects on the kinetic stability of proteins. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 43, p. 20612–20619, 2005.

NIEMEYER, C. A. M. **Nanobiotechnology: Concepts, Applications and**

**Perspectives.** [s.l: s.n.], 2007.

CARRICK, L. M. et al. Effect of ionic strength on the self-assembly, morphology and gelation of pH responsive  $\beta$ -sheet tape-forming peptides. **Tetrahedron**, v. 63, n. 31, p. 7457–7467, 2007.

CASTILLO-LEÓN, J. L. S. W. E. S. **SELF-ASSEMBLED PEPTIDE NANOSTRUCTURES: Advances and applications in nanobiotechnology.** [s.l: s.n.], 2012.

DAVIES, J. S. **Amino Acids, Peptides and Proteins, Volume 29.** [s.l: s.n.]. v. 41, 2012.

CHEN, X. et al. Specific Ion Effects on Interfacial Water Structure near Macromolecules. **Langmuir**, n. 22, p. 12272–12279, 2007.

COLLINS, K. D.; NEILSON, G. W.; ENDERBY, J. E. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. **Biophysical Chemistry**, v. 128, n. 2-3, p. 95–104, 2007.

DAI, C.; CHOI, S. Technology and Applications of Microbial Biosensor. **Open Journal of Applied Biosensor**, v. 02, n. 03, p. 83–93, 2013.

DAVIES, R. P. W. et al. **Mechanisms and Principles of 1D Self-Assembly of Peptides into  $\beta$ -Sheet Tapes.** First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc, 2009. v. 35

DEMING, T.; AGGELI, A. **Peptide-based materials.** [s.l: s.n.], 2012.

ESTEVEZ, L. F.; COSTA, L. A. S. Computational Research About Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy (VCD) of *R* -alanine and *S* -alanine Amino Acids. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 924–936, 2014.

FANUN, M. Colloids in Biotechnology. **CRC Press**, p. 574, 2010.

FENDLER, J. H. Self-Assembled Nanostructured Materials. v. 4756, n. 96, p. 1616–1624, 1996.

FISHWICK, C. W. G. et al. Structures of Helical  $\beta$ -Tapes and Twisted Ribbons: The Role of Side-Chain Interactions on Twist and Bend Behavior. **Nano Letters**, v. 3, n. 11, p. 1475–1479, 2003.

GANCHOFF, J. Analytical Chemistry: An Introduction, Fifth Edition (Skoog, Douglas

A.; West, Donald; Holler, F. James). **Journal of Chemical Education**, v. 67, n. 11, p. A293, nov. 1990.

GARRETT, P. Fluorescence and Phosphorescence: Lecture 24. 2006.

GSPONER, J.; VENDRUSCOLO, M. Theoretical approaches to protein aggregation. **Protein and peptide letters**, v. 13, n. 3, p. 287–293, 2006.

HAMLEY, I. W. Introduction to Soft Matter: Synthetic and Biological Self-Assembling Materials. 2007.

HLADÍLKOVÁ, J. et al. Effects of end-group termination on salting-out constants for triglycine. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, n. 23, p. 4069–4073, 2013.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung. **Archiv Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 24, n. 4-5, p. 247–260, 1888.

JANC et al. Salt-specific effects in lysozyme solutions. **Condensed Matter Physics**, v. 19, n. 2, p. 23601, 2016.

JULIANO, L. **Química de Peptídeos - Uma breve revisão dos processos de síntese.pdf**Química Nova, , 1990.

JUNGWIRTH, P.; CREMER, P. S. Beyond Hofmeister. **Nature Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 261–263, 2014.

KALYUZHNYI, Y. V.; VLACHY, V. Explicit-water theory for the salt-specific effects and Hofmeister series in protein solutions. **Journal of Chemical Physics**, v. 144, n. 21, 2016.

KOU, R. et al. Interactions between Polyelectrolyte Brushes and Hofmeister Ions: Chaotropes versus Kosmotropes. **Langmuir**, v. 31, n. 38, p. 10461–10468, 2015.

KUNZ, W.; LO NOSTRO, P.; NINHAM, B. W. The present state of affairs with Hofmeister effects. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1-2, p. 1–18, 2004.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy**. [s.l: s.n.], 2006.

LANGEL, Ü. **Cell-Penetrating Peptides**. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. v. 683



- LEBERMAN, R. The Hofmeister series and ionic strength. **FEBS Letters**, v. 284, n. 2, p. 293–294, 1991.
- LI, L.; RYU, J. H.; THAYUMANAVAN, S. Effect of hofmeister ions on the size and encapsulation stability of polymer nanogels. *Langmuir*, v. 29, n. 1, p. 50–55, 2013.
- LIGHT, T. P. et al. Hofmeister Ion-Induced Changes in Water Structure Correlate with Changes in Solvation of an Aggregated Protein Complex. **Langmuir**, v. 32, n. 5, p. 1360–1369, 2016.
- LIU, X. et al. Hofmeister Effects on Cation Exchange Equilibrium : Quantification of Ion Exchange Selectivity. 2013
- LIU, Z. et al. Dissolution of cellobiose in the aqueous solutions of chloride salts: Hofmeister series consideration. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 295–305, 2016.
- LO NOSTRO, P. et al. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 208–213, 2006.
- MALEKSHAHI, M. R. **Self-assembled peptide nanostructures : production , structural characterization and in vivo application as cancer vaccine**. [s.l: s.n.], 2015.
- MANCINELLI, R. et al. Hydration of sodium, potassium, and chloride ions in solution and the concept of structure maker/breaker. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 48, p. 13570–13577, 2007.
- MURAKAMI, L.; RULLER, R. Uso da técnica de difração circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. p. 2–7, 2016.
- NAMUR, J. A. M. et al. Hofmeister series ions protect diphtheria toxoid from structural damages at solvent/water interface. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 765–775, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 th ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NIEMEYER, C. M. Part II Nanostructures for Analytics. 2007.
- NORONHA, L. M. S. et al. Evaluation of the Effects of Hofmeister Series on Salting Out in the Determination of Organophosphorous Pesticides and Pyrethroids by LDS/DLLME. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 9, p. 1897–1901,

2015.

NOSTRO, P. LO et al. Hofmeister specific ion effects in two biological systems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1-2, p. 97–101, 2004.

NYRKOVA, I. A et al. Fibril stability in solutions of twisted beta-sheet peptides: a new kind of micellization in chiral systems. **European Physical Journal B**, v. 17, n. 3, p. 481–497, 2000.

OKUR, H. I. et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 9, p. 1997–2014, 2017.

PARMAR, A. S.; MUSCHOL, M. Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: Effects of chaotropic versus kosmotropic ions. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 2, p. 590–598, 2009.

PATEROVÁ, J. et al. Reversal of the hofmeister series: Specific ion effects on peptides. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 27, p. 8150–8158, 2013.

PEGRAM, L. M. et al. Why Hofmeister effects of many salts favor protein folding but not DNA helix formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 17, p. 7716–7721, 2010.

PEGRAM, L. M.; RECORD, M. T. Thermodynamic origin of hofmeister ion effects. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 31, p. 9428–9436, 2008.

RAD-MALEKSHAHI, M. et al. Biomedical Applications of Self-Assembling Peptides. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 3–18, 2016.

ROMSTED. Do amphiphile aggregate morphologies and interfacial compositions depend primarily on interfacial hydration and ion-specific interactions? The evidence from chemical trapping. n. 9, p. 4120–4129, 2007.

SACHS, J. N.; WOOLF, T. B. Understanding the Hofmeister effect in interactions between chaotropic anions and lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 29, p. 8742–8743, 2003.

SALAY, L. C. et al. Membrane interactions of a self-assembling model peptide that mimics the self-association, structure and toxicity of A $\beta$ (1-40). **Biochimica et**

**Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 9, p. 1714–1721, 2009.

SALAY, L. C. et al. Adsorption of the antimicrobial peptide tritrypticin onto solid and liquid surfaces: Ion-specific effects. **Biophysical Chemistry**, v. 207, p. 128–134, 2015.

SALAY, L. C.; SCHREIER, S. Effect of a kosmotropic ion on doxorubicin self-assembly and interaction with biomimetic systems. **Surface and Colloid Science**, p. 156–158, 2004.

SALIS, A.; NINHAM, B. W. Models and mechanisms of Hofmeister effects in electrolyte solutions, and colloid and protein systems revisited. **Chem. Soc. Rev.** **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 43, p. 7358–7377, 2014.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; DE PAULA, E. Surface active drugs: Self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1508, n. 1-2, p. 210–234, 2000.

SEWALD; JAKUBKE. **Peptides Chemistry & Biology**. [s.l: s.n.]. v. 53, 2009.

SONG, J. et al. Ion specific effects: decoupling ion–ion and ion–water interactions. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, n. 13, p. 8306–8322, 2015.

TADEO, X. et al. Protein stabilization and the hofmeister effect: The role of hydrophobic solvation. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 9, p. 2595–2603, 2009.

TANG, Y. et al. Impact of electric field on Hofmeister effects in aggregation of negatively charged colloidal minerals. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 1, p. 141–151, 2016.

TIAN, R. et al. Origin of Hofmeister effects for complex systems. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 10–13, 2015.

TOLEDO GRIJALBA, M. et al. Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 6, p. 973–979, 2006.

VIRK, H. S. Luminescence - Basic Concepts, Applications and Instrumentation. p. 276, 2014.

VISAKH, P. M. Chemistry of Nanoscience and Technology. p. 21–74, 2016.

WHITESIDES, G. M.; KRIEBEL, J. K.; MAYERS, B. T. Self-Assembly and Nanostructured Materials. **Nanoscale Assembly**, p. 217–239, 2004.

WILLIAMS, D. R. M.; NINHAM, B. W.; BOSTRO, M. Specific Ion Effects : Why the Properties of Lysozyme in Salt Solutions Follow a Hofmeister Series. v. 85, n. August, p. 686–694, 2003.

YANG, H. et al. Anion Effect on the Nanostructure of a Metal Ion Binding Self-Assembling Peptide Anion Effect on the Nanostructure of a Metal Ion Binding Self-Assembling Peptide. v. 2, n. 16, p. 8553–8562, 2006.

YANO, Y. F. et al. Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air-water interface. **Langmuir**, v. 32, n. 38, p. 9892–9898, 2016.

YEH, V. et al. The Hofmeister effect on amyloid formation using yeast prion protein. **Protein Science**, v. 19, n. 1, p. 47–56, 2010.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658–663, 2006.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Chemistry of Hofmeister Anions and Osmolytes. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 63–83, 2010.

ZHANG, Y. J. et al. Specific Ion effects on the water solubility of macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister series. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, n. 23, p. 14505–14510, 2005.