

## Aminoácidos, peptídeos e proteínas

As proteínas são os instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa. As proteínas são formadas por um conjunto de 20 aminoácidos.

### Aminoácidos:

Resíduos são os aminoácidos sem os elementos que formam a água de desidratação durante a ligação covalente que une essas moléculas.

Primeiro aa. a ser descoberto: asparagina 1806

Último aa. a ser descoberto: treonina 1938.

### Os aminoácidos têm características estruturais comuns:

Os aminoácidos que formam proteínas são alfa aminoácidos (aminoácidos primários), ou seja, possuem ligados ao carbono alfa um grupo amina, um grupo carboxila e 2 cadeias laterais R que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, o que influi na sua solubilidade em água. O carbono alfa na realidade é o carbono 2, já que se começa a numerar da extremidade que contém a carboxila.

A prolina possui um heterociclo ligada ao carbono alfa.

Todos os aminoácidos possuem centro quiral, exceto a glicina que possui como R um outro hidrogênio. Para todos os compostos quirais, os estereoisômeros com configuração semelhante à do L-gliceraldeído (um açúcar de 3 carbonos) são denominados L. (utiliza-se a configuração vertical e compara-se a posição do grupo amina em relação à hidroxila).

### Os resíduos de aminoácidos nas proteínas são L-estereoisômeros

Os aminoácidos nas moléculas protéicas são sempre L-estereoisômeros.

A diferença entre D e L para um sistema vivo é como se estivéssemos tratando de duas moléculas completamente diferentes porque os sítios ativos das enzimas são assimétricas, ou seja, só possuem possibilidade de ligação para o L.

### Os aminoácidos podem ser classificados pelos seus grupos R

Agrupam-se aminoácidos em 5 classes principais com base nas propriedades de seus grupos R – polaridades e possibilidade de interagir com a água em pH fisiológico.

**Grupos R não polares e alifáticos:** Aminoácidos hidrofóbicos e não-polares. A metionina possui um grupo tio-éter em sua cadeia lateral. (um dos únicos dois aminoácidos com enxofre). O grupo aminosecundário (imino) reduz a flexibilidade nas proteínas na região dos resíduos de prolina.

**Grupos R aromáticos:** Fenilalanina (mais apolar), tirosina e triptofano (estes dois menos apolares) podem realizar interações hidrofóbicas.

O triptofano possui um anel indol e a tirosina uma hidroxila, o que faz com que seja mais polares.

Triptofano e tirosina absorvem luz na região ultravioleta do espectro, no comprimento de 280 nm.

**Grupos R não-carregados, mas polares:** São mais hidrofílicos do que os apolares por possuírem grupos funcionais que formam pontes de hidrogênio com a água: serina (OH), treonina (OH), cisteína (sulfidril), asparagina (amida) e glutamina (amida).

**A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, unido covalentemente, chamado de cistina, no qual duas moléculas de cisteínas estão unidas por uma ligação dissulfeto. Esses resíduos são altamente hidrofóbicos. As pontes também são importantes na estabilização de estruturas de muitas proteínas, em virtude da formação de ligações covalentes entre diferentes partes de uma molécula protéica ou entre duas cadeias protéicas distintas.**

Os aminoácidos carregados são os mais hidrofílicos de todos e suas cargas dependem do que está presente no grupamento R.

**Grupos R carregados positivamente (básicos):** Lisina, arginina (com grupo guanidino), a histidina (grupo imidazol). A histidina é o único aminoácido primário com pKa próximo da neutralidade. (facilita reações ao servir como doador ou receptor de prótons).

**Grupos R carregados negativamente (ácidos):** Aspartato e glutamato, cada um com um segundo grupo carboxila.

**Os aminoácidos não primários também possuem importantes funções:** Além dos 20 aminoácidos as proteínas podem conter resíduos não primários criados por uma modificação dos resíduos primários já incorporados. A selenocisteína é uma modificação durante a síntese protéica. (da serina). 4 hidroxiprolina e 5 hidroxilisina que formam o colágeno. Há 300 aminoácidos adicionais que nunca aparecem em proteínas. Destaque para: ornitina e citrulina.

**Os aminoácidos podem agir como ácidos e bases:** Quando um aminoácido é dissolvido em água, ele existe na solução como um íon dipolar, ou zwitterion e este predomina em pH neutro. Este funciona como ácido ou como base, ou seja, é anfótero. Quando totalmente protonado um aminoácido é um ácido diprótico.

**Os aminoácidos têm curvas de titulação características:** Titular significa protonar ou desprotonar determinada substância. Utilizando-se a glicina na sua forma totalmente protonada temos que quando o  $pH=pK_a$  temos um tampão eficiente e coexistem concentrações iguais da forma protonada e do zwitterion. A seguir ao se atingir o ponto isoelétrico temos que a forma desprotonada é predominante. Depois desprotona-se o grupo amino.

É bom lembrar que nos patamares tem-se um tampão eficiente, quando o  $pH=pK_a$ .

E também que o  $pK_a$  indica a facilidade de desprotonação, uma unidade maior no  $pK_a$  indica 10 vezes mais de dificuldade de perda de um hidrogênio.

As configurações da molécula e do entorno da molécula fazem com que seu  $pK_a$  seja alterado. Por exemplo, a glicina possui  $pK_a$  muito menor para seus grupos carboxila e amino do que o normal por causa das interações entre esses na molécula.

**As curvas de titulação predizem a carga elétrica dos aminoácidos** O  $pH$  característico no qual a carga total é igual a zero (íon dipolar) é denominado ponto isoelétrico. Para quem não possui grupos ionizáveis na cadeia lateral é simplesmente a média aritmética dos  $pK_a$ s. A carga depende do  $pH$ , bastante olhar no gráfico de titulação a sua carga líquida.

### **Os aminoácidos diferem em suas propriedades acidobásicas**

Generalizações: todos os aminoácidos com um único grupo alfa amino e alfa carboxila desprevidos de grupos ionizáveis têm curvas de titulação que se assemelham à da glicina. Apenas a histidina tem um grupo R capaz de exercer função tamponante significativa próxima do  $pH$  neutro.

Aminoácidos podem ter três estágios correspondentes aos três passos de ionizações possíveis.

### **Aminoácidos e peptídeos**

A ligação covalente que une 2 aa é chamada de amida substituída ou peptídica. Trata-se de uma desidratação, uma reação de condensação.

O número de ligações corresponde ao n. de aa menos 1.

Oligopeptídeos refere-se à ligação de poucos aminoácidos.

Polipeptídeos geralmente têm peso molecular menor que 10.000.

No peptídeo encontra-se dois aminoácidos nas extremidades: o N-terminal e o C-terminal.

Apesar de serem altamente exergônicas (favoráveis) as ligações peptídicas não são hidrolisadas porque requerem uma energia de ativação muito alta (meia vida de 7 anos).

### **Os peptídeos podem ser distinguidos entre si por seu comportamento de ionização**

O comportamento acidobásico de um peptídeo pode ser predito a partir dos seus grupos alfa-amino e alfa-carboxila livres (terminais) e da natureza dos seus inúmeros grupos R ionizáveis.

Os  $pK_a$ s não são necessariamente iguais quando os aminoácidos livres se tornam resíduos de proteínas.

**Peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos ocorrem em uma ampla faixa de tamanhos:** Não existe uma relação entre tamanho e função dos peptídeos. Peptídeos muito pequenos podem exercer funções importantes: aspartame, oxitocina (secretada pela hipófise posterior e que participa das contrações uterinas), bradisinina (inibe o processo inflamatório).

Oligopeptídeos: por exemplo a insulina (hormônio pancreático com duas cadeias polipeptídicas, uma delas com 30 resíduos e a outra com 21). Glucagon: 29 resíduos. Corticotropina: 39 resíduos.

Proteínas podem possuir dois ou mais polipeptídeos associados de forma não-covalente. Essas proteínas são multissubunitárias e se pelo menos duas cadeias forem iguais também é chamada de oligomérica e as unidades idênticas de protômeros. A hemoglobina possui 2 cadeias alfa iguais e 2 betas iguais. (tetrâmero ou dímero de protômero de alfabeta).

Algumas proteínas contêm duas ou mais cadeias unidas covalentemente. Aí não se trata de subunidades e sim de cadeias mesmo. Ex. insulina ligada por pontes de dissulfeto.

Para saber o número de resíduos de uma proteínas divide-se seu peso molecular por 110.

### **Os polipeptídeos possuem composição de aminoácidos características:**

Pode-se repetir vários resíduos ou não ter um determinado resíduo em uma dada proteína.

### **Algumas proteínas contêm outros grupos químicos além dos aminoácidos:**

Proteínas simples: ribonuclease e quimotripsinogênio.

Proteínas conjugadas: Com componentes químicos permanentemente associados além dos aminoácidos. A porção não aminoácídica é chamada de **grupo prostético**. As proteínas conjugadas são classificadas com base na natureza do grupo prostético (lipo, glico e metalo).

### **Existem diversos níveis de estrutura protéica:**

Estrutura primária: descrição de todas as ligações covalente (ligações peptídeos e de dissulfeto) unindo os resíduos de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica.

Estrutura secundária: Refere-se aos arranjos particularmente estáveis dos resíduos de aminoácidos.

Estrutura terciária: Descreve todos os aspectos do dobramento tridimensional de um polipeptídeo.

Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo espacial é denominado de estrutura quaternária.

**Trabalhando com as proteínas:** As proteínas devem ser separadas e suas propriedades devem ser determinadas.

**As proteínas podem ser separadas e purificadas:** O primeiro passo é o rompimento de células microbianas, liberando suas proteínas em uma solução denominada extrato bruto ou total. O extrato é submetido a tratamentos que separam as proteínas em frações diferentes, baseados em alguma propriedade como carga ou tamanho, processo denominado de fracionamento. Salting out: a solubilidade de uma proteína é reduzida em presença de sal, que pode precipitar seletivamente proteínas.

Realiza-se diálise da solução de interesse: separa-se a proteína do solvente. O extrato é posto em uma bolsa ou tubo feito de uma membrana semipermeável. Quando essa membrana é suspensa em um volume maior de solução tamponada de força iônica apropriada, a membrana permite a livre passagem de sais e do tampão, mas não das proteínas.

Um dos métodos mais poderosos de fracionamento protéico é cromatografia em coluna. Rc. Na cromatografia de troca catiônica a matriz sólida possui grupos carregados negativamente. Na fase móvel as proteínas com carga líquida positiva migram mais lentamente pela matriz do que as com carga líquida negativa. Existem cromatografias: de troca iônica, de exclusão por tamanho e de afinidade.

Um refinamento mais moderno é o HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência.

Usa-se inicialmente processos mais simples e baratos para só depois fazer uso da cromatografia que é mais caro e sofisticado.

### **As proteínas podem ser separadas e caracterizadas por eletroforese:**

Baseia-se na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico.

Não é usado freqüentemente porque existem métodos mais simples e também porque pode alterar a estrutura/função da proteína. Importante método analítico, permite estimar o grau de pureza e o número de proteínas distintas além do ponto isoelétrico e do peso molecular aproximado.

A migração de uma proteína em um gel de poliacrilamida durante a eletroforese é, portanto, uma função de seu tamanho e de sua forma.

Pode adicionar um detergente, SDS – dodecil sulfato de sódio, que muda a conformação da proteína e a sua carga, deixando todas as proteínas semelhantes e fazendo com que a variação na migração seja exclusivamente baseada nos tamanhos e pesos das proteínas. Assim, após aplicar o corante "Coomassie blue" que se liga à proteína mas não ao gel, sabendo-se o peso de determinadas proteínas pode-se estimar o peso de um outra que tenha migrado entre duas conhecidas. As proteínas mais leves chegam mais rápido à extremidade inferior.

A focalização isoelétrica é um procedimento utilizado para determinar o ponto isoelétrico de uma proteína. Um gradiente de pH estabelece-se ao se deixar uma mistura de ácidos e bases orgânicos de baixo peso molecular sob a ação de um campo elétrico ao longo de um gel. Quando a mistura protéica é aplicada, cada proteína irá migrar até alcançar a região de pH igual ao seu pI.

A eletroforese bidimensional (combina-se a focalização isoelétrica com a eletroforese na presença de SDS) separa proteínas de peso molecular idêntico que diferem no valor de seus pI, ou proteínas com valores de pI semelhantes que apresentam pesos diferentes.

### **Proteínas que não foram separadas podem ser quantificadas:**

Para proteínas que são enzimas, a sua quantidade em uma determinada solução ou extrato tecidual pode ser medida em termos do efeito catalítico que a enzima produz. Por acordo internacional 1 unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que provoca a transformação de 1 micromol de substrato por minuto a 25 graus sob condições ótimas de medida. A atividade específica é o número de unidade enzimáticas por miligrama de proteína total. (medida da pureza enzimática).

A razão entre a quantidade de enzimas (atividade) e quantidade total de proteínas = **atividade específica**. Durante a purificação perde-se tanto enzimas como proteínas inespecíficas, ou seja, diminui-se a proteína total e também a atividade total. Entretanto, a atividade específica aumenta porque como objetivo é separar as proteínas inespecíficas suas quantidades decrescem muito mais. Proteína pura quando não há aumento da atividade específica e quando só detecta-se uma única proteína por eletroforese.

Outras proteínas que não enzimas possuem formas variadas de quantificação.