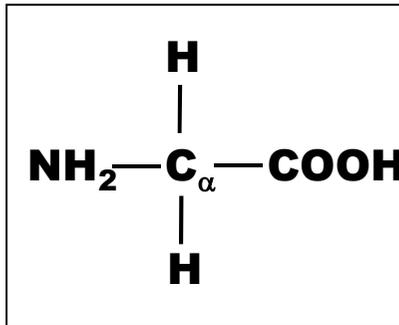


# Aminoácidos: Glicina

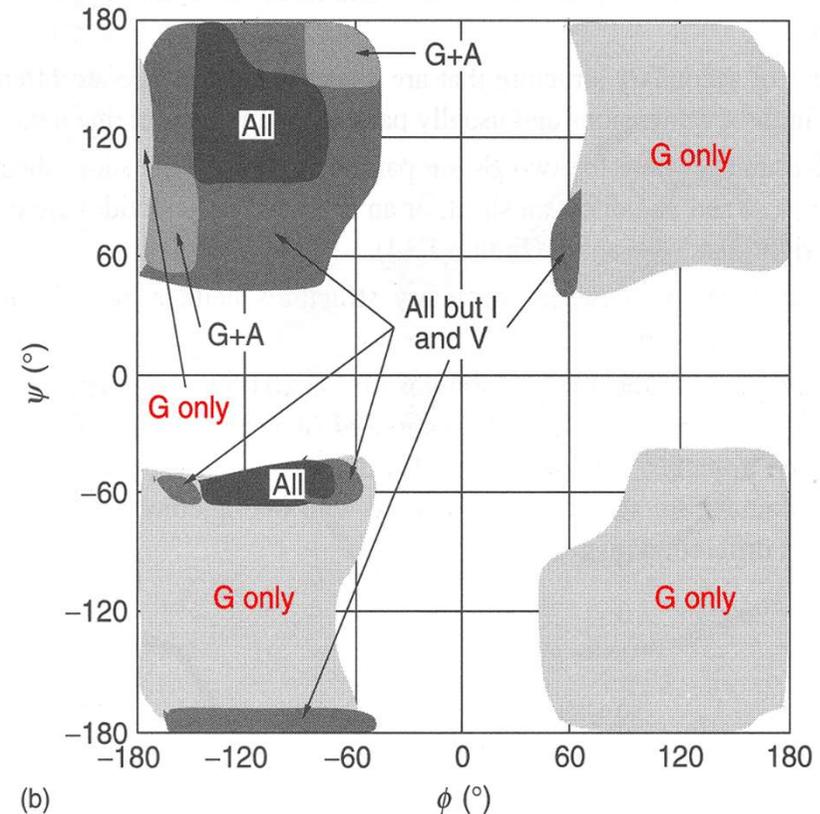


A glicina é o mais simples dos aminoácidos. Devido à simplicidade da sua cadeia lateral este resíduo é fácil de acomodar em estruturas proteicas, podendo surgir em qualquer local e em qualquer conformação.



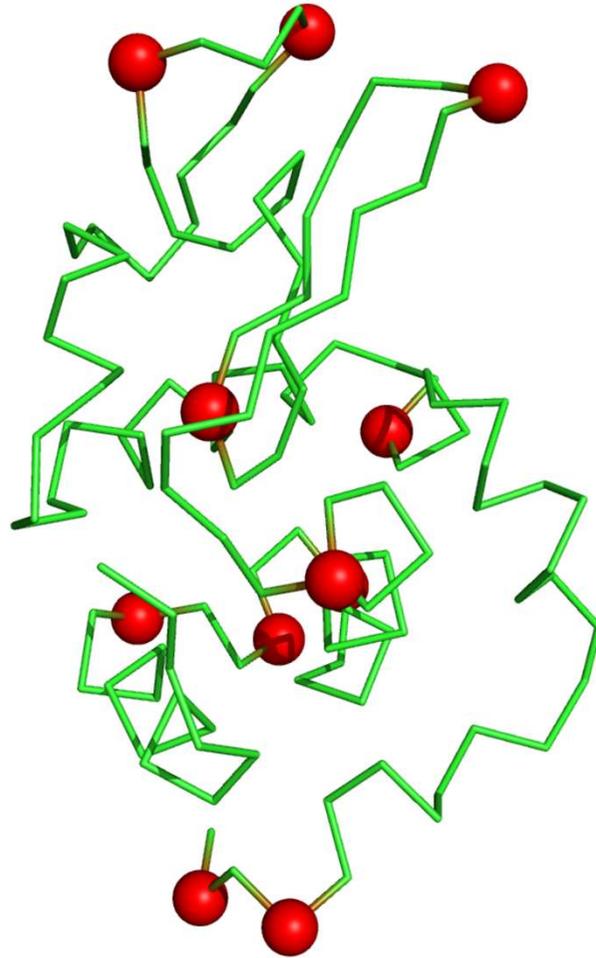
O carbono  $\alpha$  da glicina não é um centro assimétrico, não existindo assim isómeros ópticos da glicina.

Diagrama de Ramachandran ilustrando as zonas de conformacionais acessíveis aos vários aminoácidos. A **glicina** apresenta uma zona muito superior a qualquer outro resíduo, devido ao reduzido volume do seu grupo R.

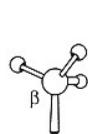


(b)

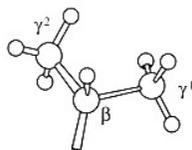
# Localização dos resíduos de Glicina na Lisozima



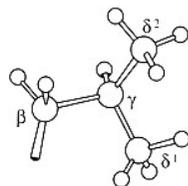
# Aminoácidos alifáticos: Ala, Val, Leu, Ile



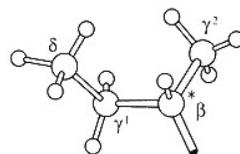
Alanine  
Ala  
A



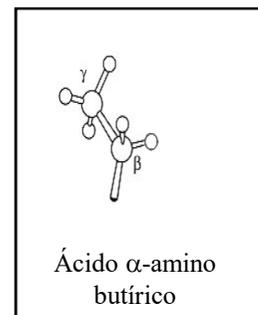
Valine  
Val  
V



Leucine  
Leu  
L

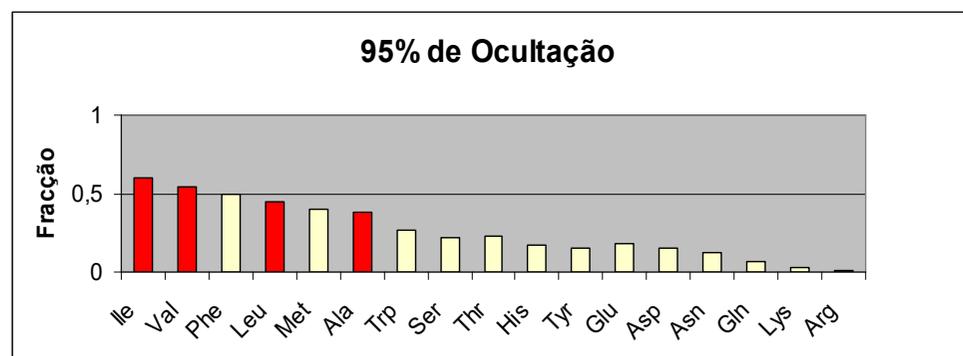


Isoleucine  
Ile  
I



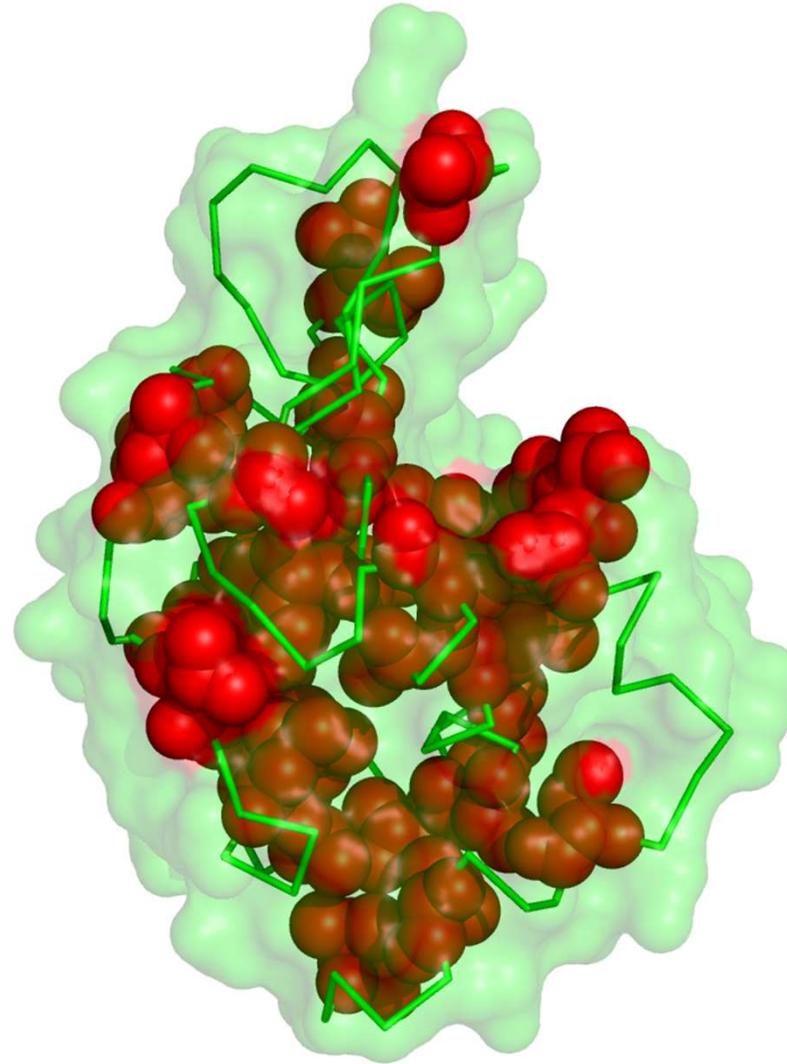
O aminoácido de dois carbonos alifáticos na cadeia, ácido α-amino butírico, não é um dos 20 aminoácidos constituintes das proteínas biológicas.

Os resíduos alifáticos são bastante inertes quimicamente, visto só conterem grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) e etileno (-CH<sub>2</sub>-). No entanto, a sua **hidrofobicidade** confere-lhes importantes características estruturais (ocorrem normalmente na região interior das proteínas globulares). A "tendência" destes resíduos para evitar o meio aquoso contribui de modo fundamental para a estabilização da estrutura nativa.



Fracção de cada um dos resíduos de aminoácido que se encontra ocultada a pelo menos 95% num conjunto representativo de proteínas globulares. Notem-se os valores elevados dos resíduos alifáticos (a vermelho).

## Localização dos resíduos alifáticos na Lisozima

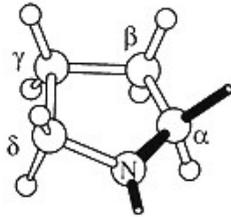


# Aminoácidos: acessibilidade ao solvente

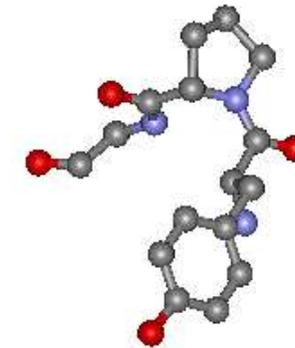
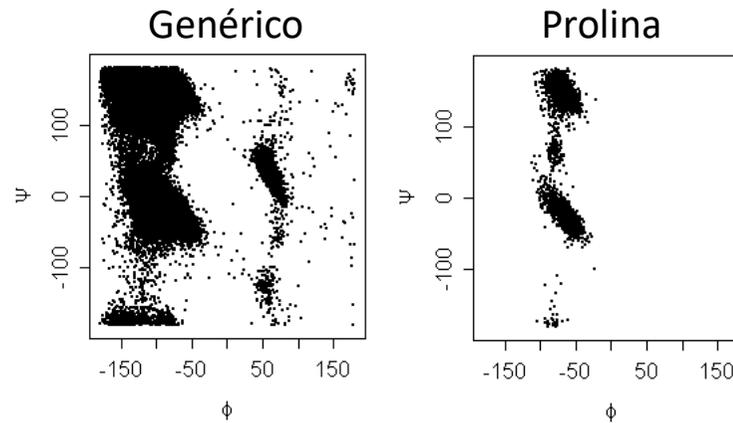
	Área superficial (nm <sup>2</sup> )	100% de ocultação	95% de ocultação	Fracção média ocultada
Ile	1,8	0,18	0,60	0,90
Val	1,6	0,18	0,54	0,88
Phe	2,2	0,14	0,50	0,89
Leu	1,8	0,16	0,45	0,87
Met	2,05	0,11	0,40	0,83
Ala	1,15	0,20	0,38	0,78
Trp	2,6	0,04	0,27	0,88
Ser	1,2	0,08	0,22	0,62
Thr	1,45	0,08	0,23	0,60
His	1,95	0,02	0,17	0,78
Tyr	2,3	0,03	0,15	0,74
Glu	1,85	0,03	0,18	0,74
Asp	1,5	0,04	0,15	0,67
Asn	1,6	0,03	0,12	0,61
Gln	1,9	0,01	0,07	0,61
Lys	2,1	0,00	0,03	0,60
Arg	2,4	0,00	0,01	0,51

- A área superficial indicada na tabela refere-se a cada resíduo X no tripéptido Gly-X-Gly (valor máximo)
- A percentagem de ocultação denota a fracção da área de cada resíduo que *não* está em contacto com o solvente na estrutura nativa
- As fracções foram calculadas para um conjunto de estruturas de proteínas não-aparentadas
- Mesmo os resíduos mais hidrofílicos ocultam, em média, uma fracção importante da sua área

# Aminoácidos: Pro



Proline  
Pro  
P

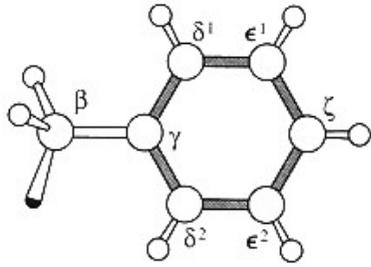


*cis*-prolina

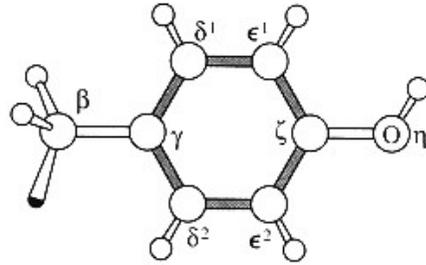
A cadeia lateral da prolina tem como característica mais importante o estar ligada ao azoto da ligação peptídica precedendo o carbono  $\alpha$ , com as seguintes consequências:

- O azoto da ligação peptídica não tem o átomo de hidrogénio capaz de formar ligações de hidrogénio estabilizadoras da estrutura secundária
- O ângulo de torção  $\phi$  do resíduo de prolina encontra-se "preso", não podendo adoptar a gama de valores normalmente acessíveis a um resíduo
- A ligação peptídica não é estabilizada por ressonância
- A diferença entre a estabilidade das formas *cis* e *trans* da ligação peptídica precedendo o resíduo de prolina é muito pequena, sendo estas ligações *cis* observadas em algumas proteínas

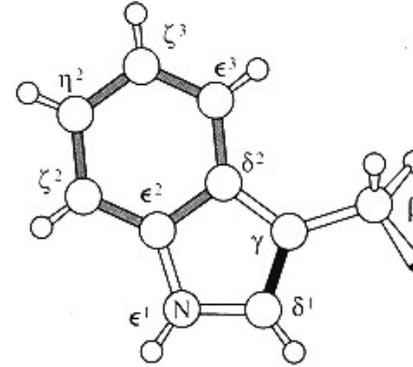
# Os resíduos aromáticos: Phe, Tyr, Trp



Phe



Tyr



Trp

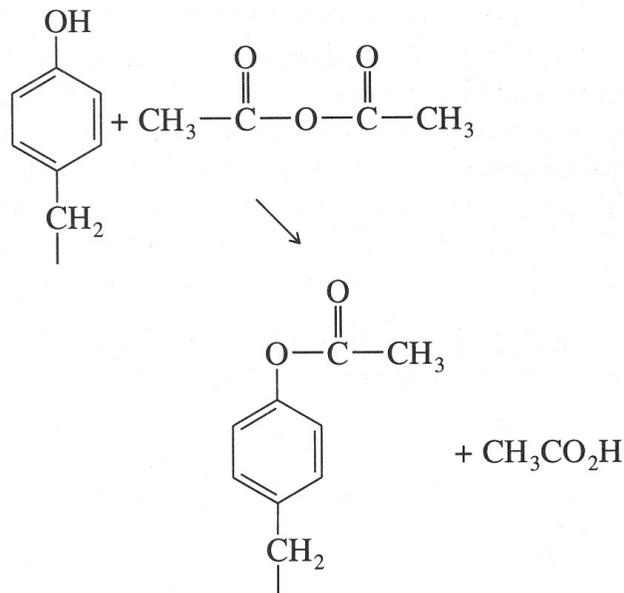
## •Phe

A fenilalanina é o único dos resíduos aromáticos que é completamente hidrofóbico, com uma preferência clara para o interior das proteínas e para as estruturas secundárias regulares. Quimicamente semelhante ao benzeno, é apolar e muito pouco reactivo nas condições relevantes para o estudo das proteínas.

# Os resíduos aromáticos: Phe, Tyr, Trp

## •Tyr

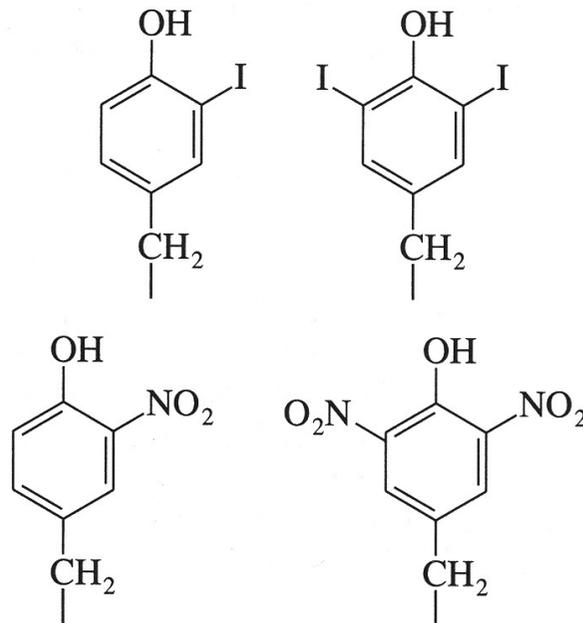
A tirosina possui um grupo hidroxilo com  $pK_a \sim 10$ , estando portanto ionizado em muito pequeno grau em condições fisiológicas. O grupo hidróxilo é, no entanto, um formador de ligações de hidrogénio e pode participar em reacções tais como a acetilação:



# Os resíduos aromáticos: Phe, Tyr, Trp

## •Tyr(cont.)

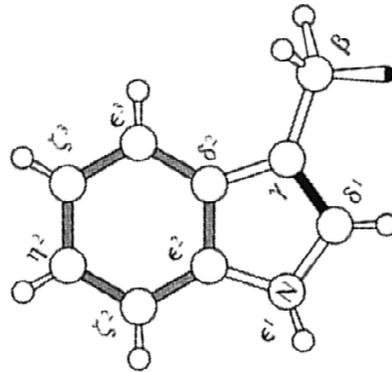
A presença do grupo -OH confere uma certa electrofilicidade ao anel de tirosina, tornando-o reactivo em reacções de substituição electrófila, originando diversos derivados:



# Os resíduos aromáticos: Phe, Tyr, Trp

## • Trp

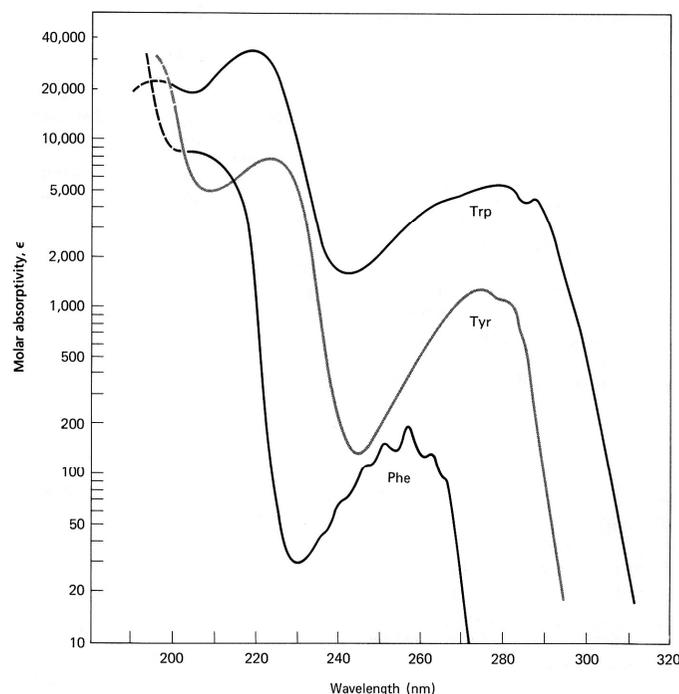
A cadeia de triptofano é a maior e a que ocorre menos frequentemente nas sequências proteicas. Tem um hidrogênio disponível para formar uma ligação de hidrogênio, mas mesmo assim é extremamente hidrofóbico. Juntamente com Phe e Tyr constitui um elemento frequente do "core" das proteínas globulares, seja "empacotado" ao longo de uma sequência de ligações peptídicas, seja rodeado de grupos metilo de resíduos alifáticos. A cadeia de Trp pode sofrer oxidação irreversível por parte do ozono ou outros agentes oxidantes, ou ser alquilado de modo a introduzir uma variedade de grupos que alteram as suas propriedades de fluorescência e/ou absorvência.



# Propriedades espectroscópicas dos resíduos aromáticos

Os resíduos aromáticos são responsáveis pela principal parte da absorvência e fluorescência das proteínas na gama dos ultravioleta. Estas propriedades são extremamente sensíveis ao ambiente dos resíduos, tornando-os excelentes "pontas de prova" para analisar as propriedades estruturais do micro-ambiente circundante. O triptofano absorve mais fortemente e no comprimento de onda mais longo ( $\lambda_{\text{max}}=280 \text{ nm}$ ).

A fluorescência do triptofano tem um máximo entre 300 e 350 nm. O máximo de emissão varia inversamente com o grau de ocultação do resíduo na proteína, permitindo por exemplo analisar alterações conformacionais.



# Propriedades espectroscópicas dos resíduos aromáticos

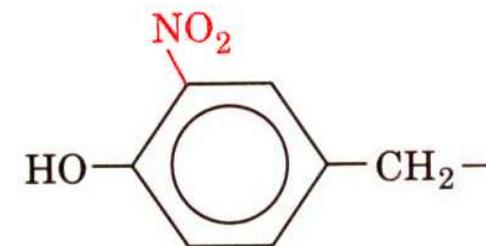
A tirosina tem um máximo de absorção próximo do triptofano, mas dependendo do estado de ionização do resíduo (a desprotonação da tirosina desloca o máximo de 274 para 293 nm). A modificação da tirosina, por exemplo para nitrotirosina, pode deslocar o  $pK_a$  do grupo para valores mais úteis, aumenta ainda mais o deslocamento de absorção observado. O estudo do espectro da nitrotirosina permite avaliar a carga do meio circundante. Por outro lado, a titulação com tetranitrometano permite avaliar o grau de exposição dos resíduos de tirosina ao solvente.

Table 1.4 Spectroscopic Properties of Tyrosine and Several Derivatives

	$pK_{app}$ of —OH	Nonionized OH		Ionized Hydroxyl	
		$\lambda_{max}$ (nm)	Molar absorbance ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	$\lambda_{max}$ (nm)	Molar absorbance ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
Tyrosine	10.1	274.5	1400	293	2400
$\epsilon$ -Iodotyrosine	8.2	283	2750	305	4100
$\epsilon 1, \epsilon 2$ -Diiodotyrosine	6.5	287	2750	311	6250
$\epsilon$ -Nitrotyrosine	7.2	360	2790	428	4200
$\epsilon$ -Aminotyrosine	10.0 <sup>a</sup>	275	1600	320	4200
O-Acetyltyrosine	—	262	262	—	—

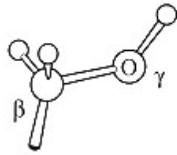
<sup>a</sup> The  $pK_{app}$  of the aromatic amino group is approximately 4.8.

From A. N. Glazer, in H. Neurath and R. L. Hill (eds.), *The Proteins*, 3rd ed. vol. 2, pp. 1–103. New York, Academic Press, 1976.

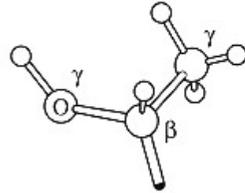


$\epsilon$ -nitrotirosina

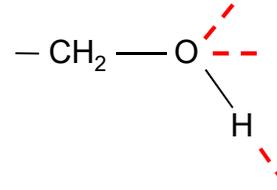
# Aminoácidos hidroxílicos: Ser, Thr



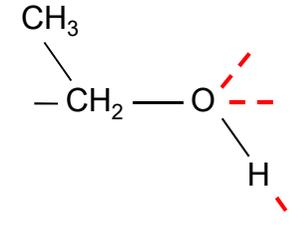
Serine  
Ser  
S



Threonine  
Thr  
T



Ser



Thr

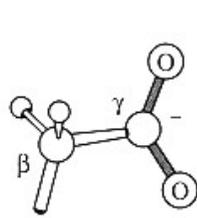
As cadeias da serina e da treonina são alifáticas, mas possuem um grupo hidroxilo polar que lhes confere propriedades características. São dadores ou aceitadores na formação de ligações de hidrogénio.

A reactividade destes resíduos é comparável à do etanol, pelo que não participam em muitas reacções de interesse para as proteínas.

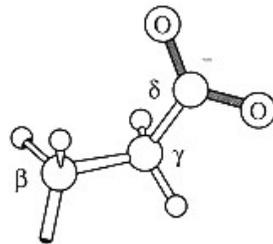
A treonina tem um carbono  $\beta$  assimétrico, ocorrendo apenas um dos isómeros nos organismos vivos.

A treonina tem um carácter um pouco mais hidrófobo que a serina, ocorrendo mais frequente no interior das proteínas globulares que esta última. O resíduo de serina surge mais frequentemente em regiões desordenadas em "loops", devido às suas pequenas dimensões.

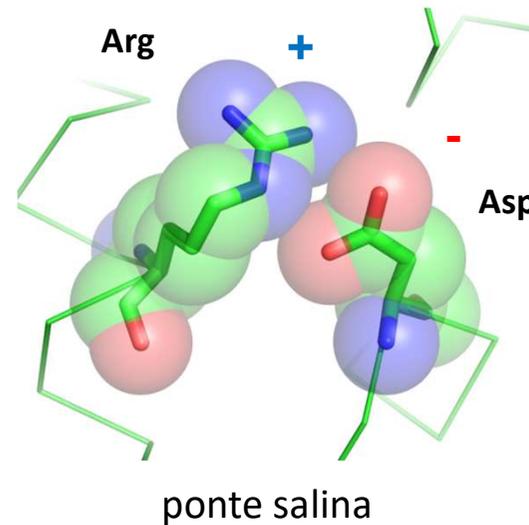
# Aminoácidos ácidos: Asp, Glu



Aspartic acid  
Asp  
D



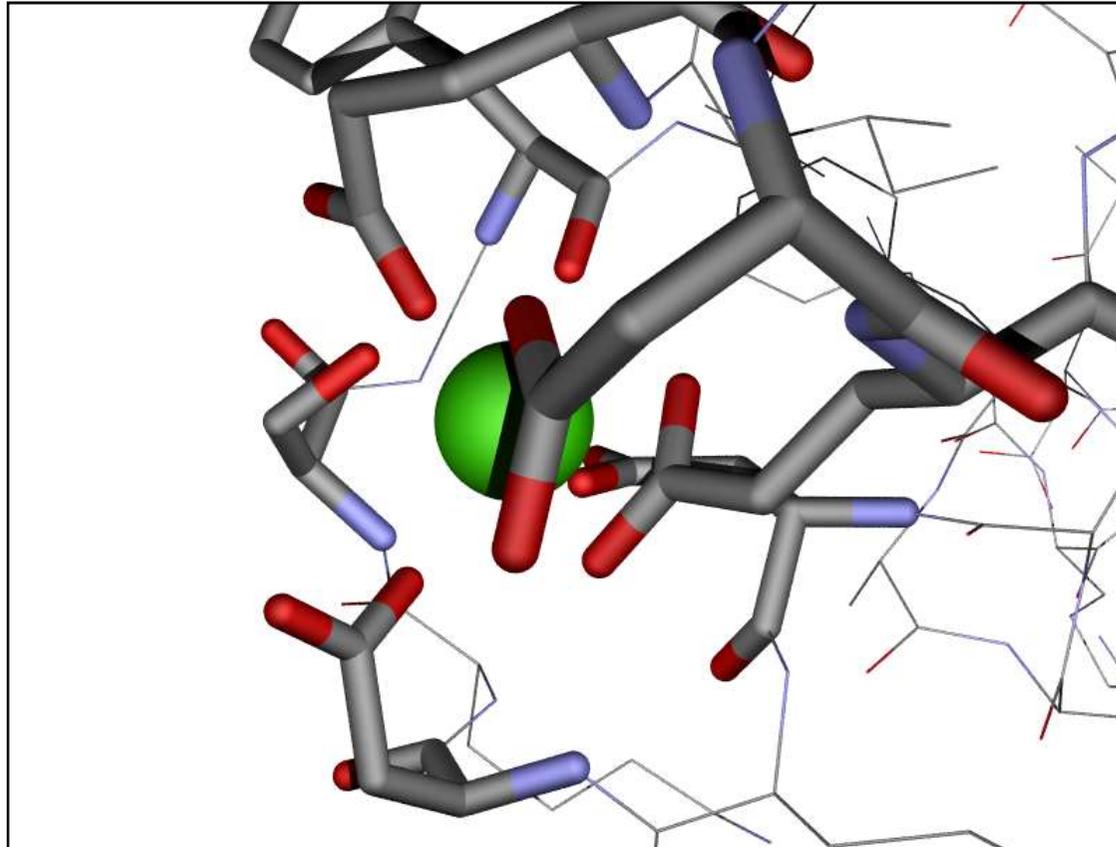
Glutamic acid  
Glu  
E



As cadeias laterais de Asp e Glu diferem apenas num grupo metileno, todavia a diferença é suficiente para provocar importantes diferenças de reactividade e de função estrutural. Estes resíduos estão normalmente ionizados a pH fisiológico, sendo uma fonte de carga negativa na proteína. Por esta razão, ocorrem muito mais frequentemente na superfície exterior das proteínas.

Os oxigénios destes resíduos podem actuar como aceitadores em ligações de hidrogénio, ou formar *pontes salinas* com resíduos positivamente carregados.

## Aminoácidos ácidos: Asp, Glu

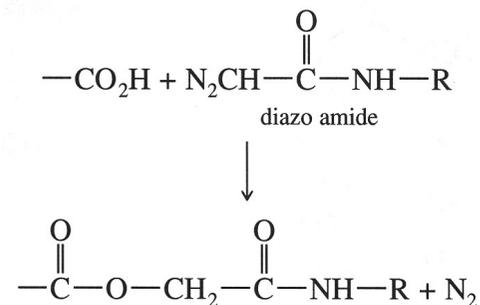


Asp e Glu podem ser quelantes eficazes de íão metálicos numa proteína. Na figura, dois resíduos Asp e dois Glu complexam um íão  $\text{Ca}^{2+}$  na parvalbumina

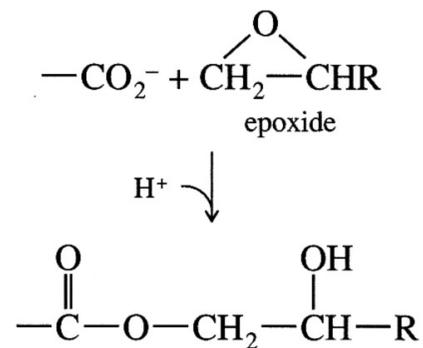
# Aminoácidos ácidos: Asp, Glu

A reactividade química dos resíduos Asp e Glu é semelhante à dos ácidos orgânicos correspondentes - esterificação, acoplamento a amins ou redução a álcoois são as reacções mais comuns

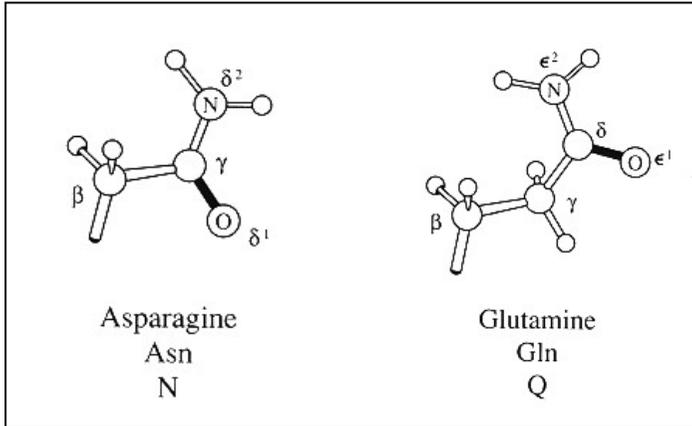
O estado de ionização de um grupo carboxilo pode, por vezes, ser determinado pela sua susceptibilidade a diferentes reagentes orgânicos. Compostos como os ésteres de diazoacetato e as amidas reagem com forma não-ionizada:



Por outro lado, os epóxidos reagem com a forma ionizada:



# As amidas: Asn, Gln

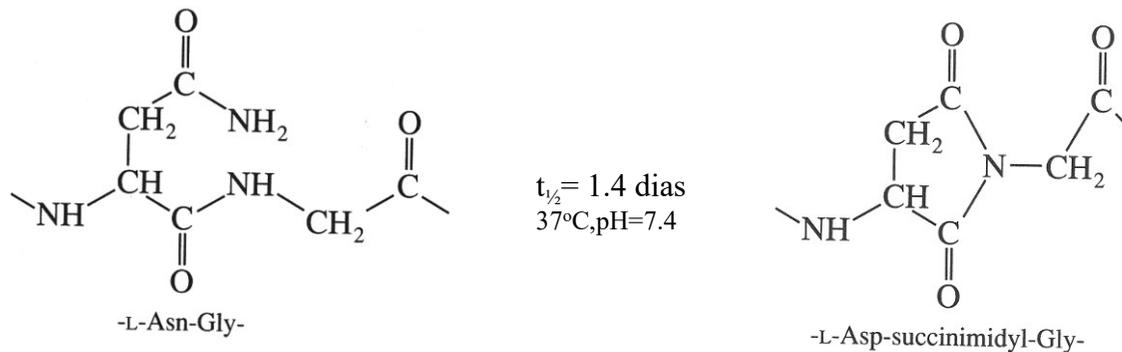


Ocorrem naturalmente, e não por amidacão de Asp e Glu, sendo incorporadas directamente nas proteínas.

Não são muito reactivos, mas são polares e simultaneamente dadores e aceitadores de ligações de hidrogénio.

Os grupos amida são lábeis para extremos de pH e temperatura, podendo desamidar em Asp e Glu.

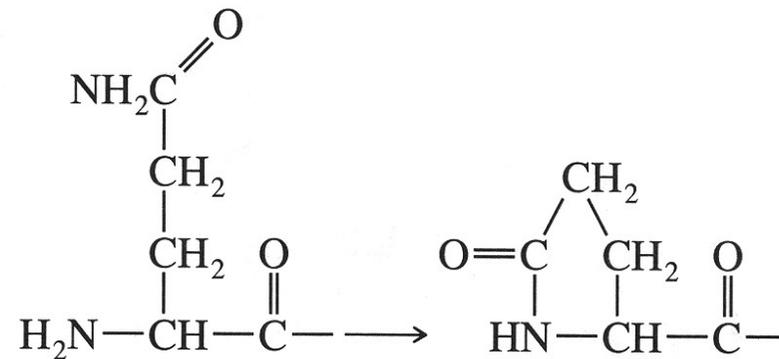
A pH alcalino, Asn é muito mais lábil que Gln pois a sua cadeia lateral pode interagir com o -NH do resíduo seguinte para formar um derivado succinimidílico:



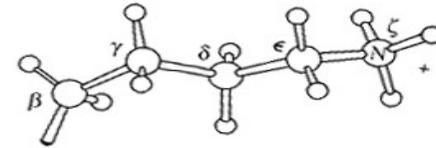
Esta reacção é 30 a 50 vezes mais lenta se o resíduo seguinte não for um glicina, devidos aos impedimentos estéricos da cadeia lateral.

# As amidas: Asn, Gln

Os resíduos de Gln na primeira posição de uma cadeia polipeptídica ciclizam espontaneamente de acordo com a reacção:



# Os resíduos básicos: Lys, Arg

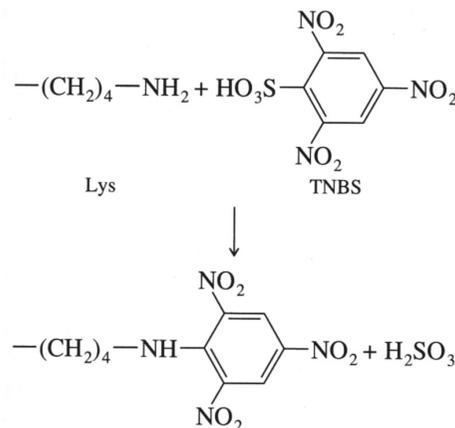


## •Lys

Os resíduos de Lys encontram-se quase sempre à superfície das proteínas, devido à carga positiva do grupo amina terminal que, tendo um pKa de 11.1, se encontra ionizado na maioria das condições fisiológicas.

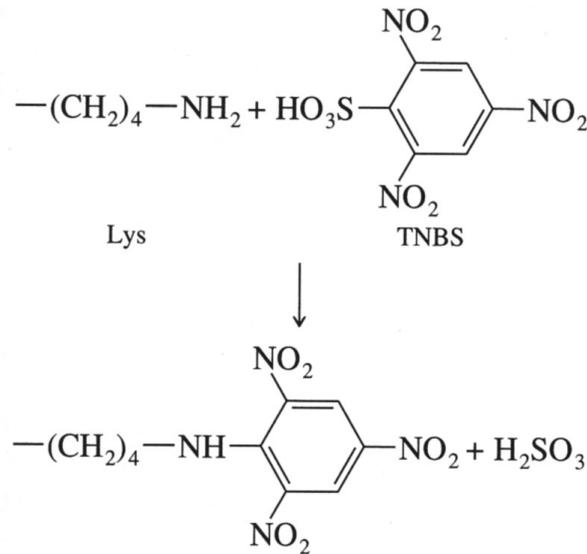
O N terminal é um nucleófilo muito potente na sua forma neutra, podendo participar em diversas reacções orgânicas tais como alquilação, arilação e acilação. A velocidade com que estas reacções se dão tende a aumentar com o pH, pois aumenta o número de grupos não ionizados.

O número de grupos amina pode ser determinado através da reacção com o sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS):



# Os resíduos básicos: Lys, Arg

O número de grupos amina pode ser determinado através da reacção com o sulfonato de 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS):

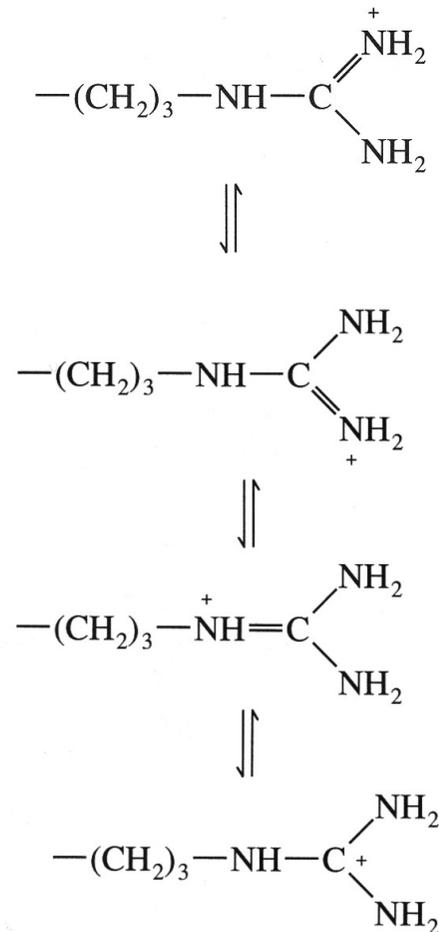
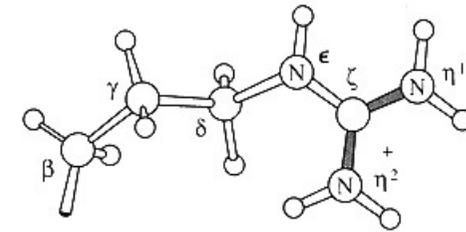


O grupo modificado absorve fortemente na região dos 367 nm, podendo a reacção ser seguida espectrofotometricamente.

# Os resíduos básicos: Lys, Arg

## •Arg

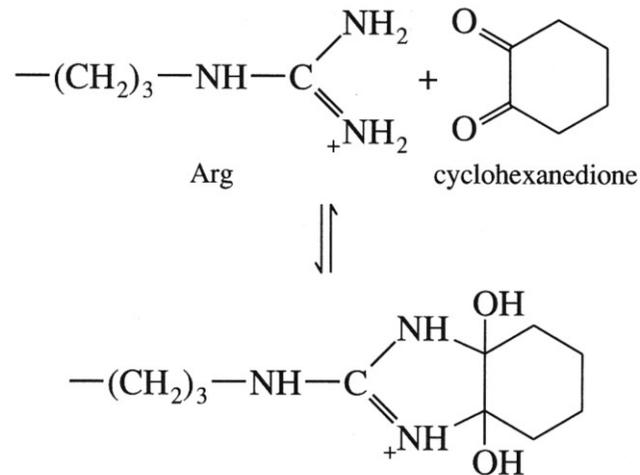
A cadeia lateral de Arg consiste em 3 grupos metileno apolares e um grupo guanidina fortemente básico (pKa~12). A forma protonada deste grupo é estabilizada por ressonância, sendo o grupo guanidina planar e simétrico em torno do carbono  $\zeta$  (3 ligações de carácter híbrido)



# Os resíduos básicos: Lys, Arg

## •Arg (cont.)

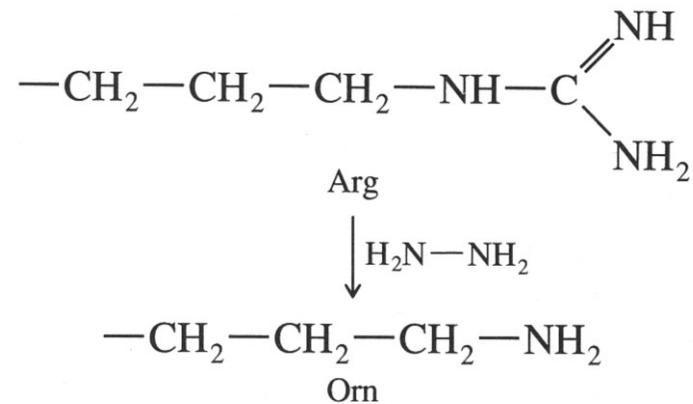
A forma protonada do grupo guanidínico é muito pouco reactiva, e a pH fisiológico a fracção de grupos não protonados é extremamente pequena. No entanto, observam-se algumas reacções, como seja a condensação heterocíclica com compostos dicarbonilo. Exemplo:



# Os resíduos básicos: Lys, Arg

- Arg (cont.)

O grupo guanidínico pode ser também clivado pela hidrazina, dando origem à cadeia lateral da ornitina:

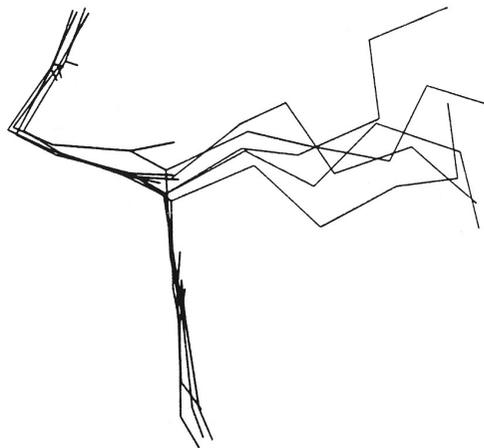


Esta reacção é geralmente acompanhada pela cisão da cadeia polipeptídica.

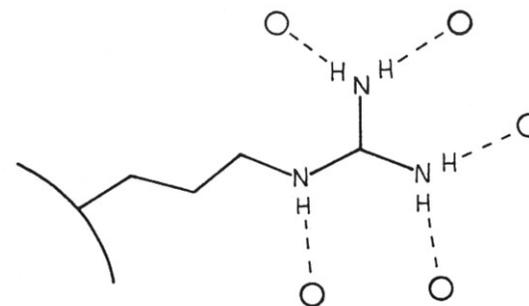
# Os resíduos básicos: Lys, Arg

• **Lys** - o resíduo de maior mobilidade nas proteínas, a sua cadeia longa e flexível estende-se para o solvente e pode assumir uma enorme variedade de conformações. Por este motivo, os átomos a partir do carbono  $\beta$  são muitas vezes invisíveis nas densidades electrónicas obtidas por difracção de raios X. Apesar da natureza consideravelmente hidrofóbica da sua cadeia lateral, é o resíduo que oculta a menor fracção de área ao solvente

• **Arg** - as cadeias de arginina são mais ordenadas que as de lisina e ocultam uma maior área fraccional. Embora seja extremamente raro encontrar uma Arg totalmente oculta, a sua cadeia lateral forma muitas vezes uma superfície hidrofóbica com extensos contactos de vdW que pode fazer o papel de um resíduo hidrofóbico.



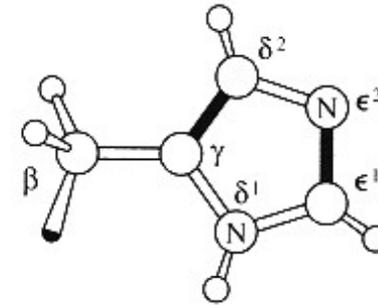
Conformações da Lisina



Ligações de hidrogénio entre a Arginina e H<sub>2</sub>O

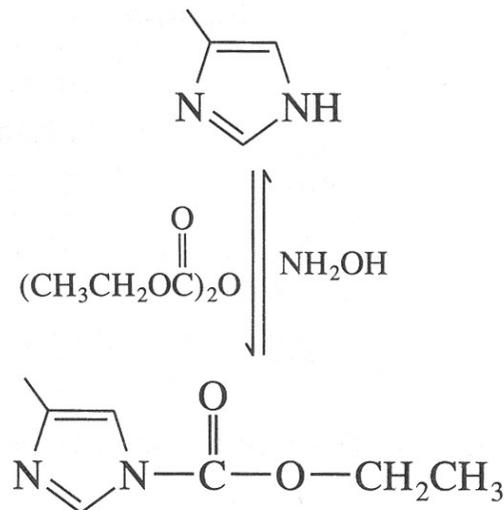
# A histidina

A cadeia de imadazol da histidina tem características um pouco à parte das dos outros resíduos. O imidazol tem um pKa próximo de 7, sendo portanto uma base extremamente forte a pH neutro.



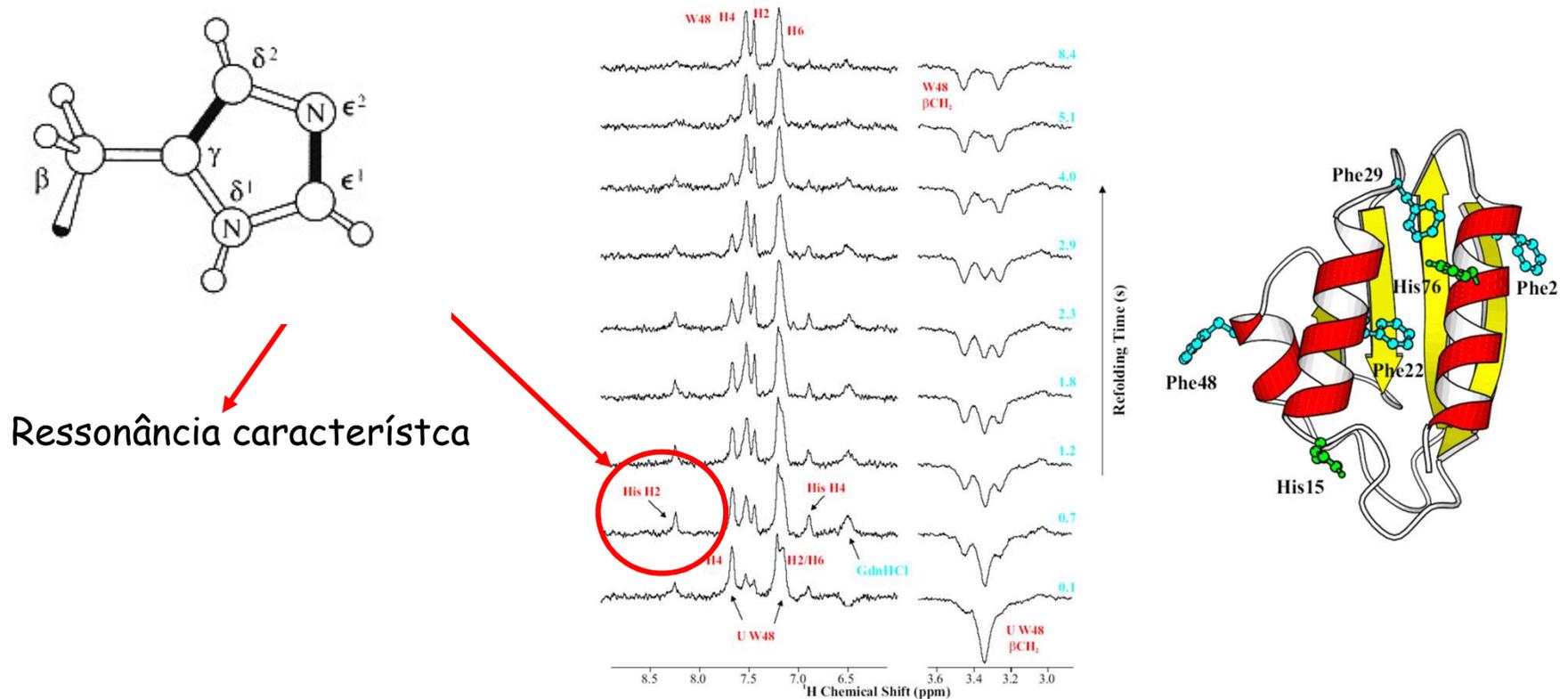
O azoto não-protonado da histidina é um nucleófilo extremamente potente a pH 7 e um aceitador de ligações de hidrogénio, enquanto o azoto protonado é electrófilo e dador de hidrogénio. O resíduo de histidina apresenta assim uma extrema versatilidade química, ocorrendo frequentemente nos centros activos enzimáticos.

Uma das reacções mais específicas para os resíduos de His é a com o dietilpirocarbonato (revertida pela hidroxilamina):

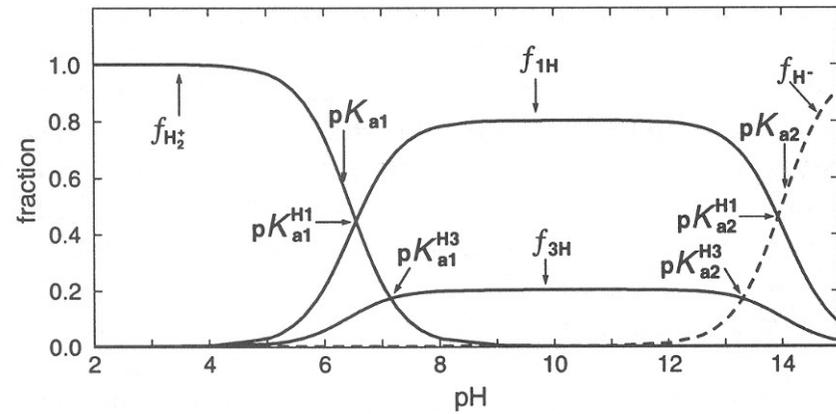
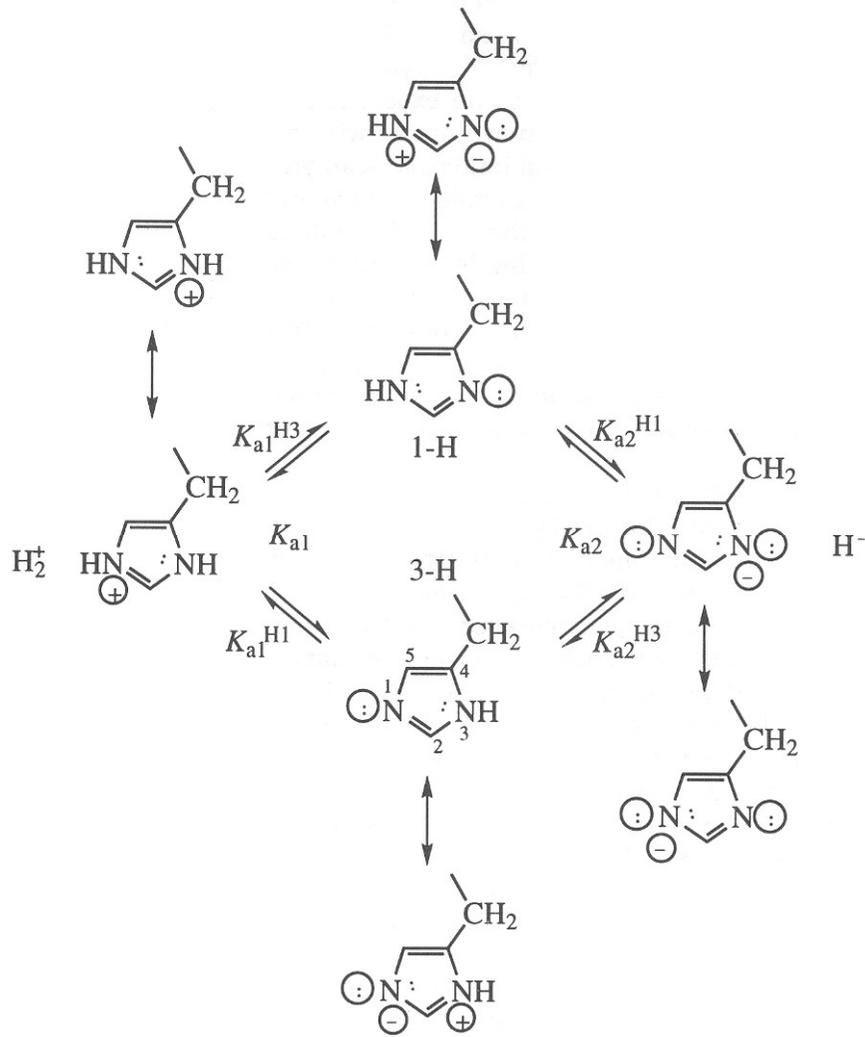


# A histidina

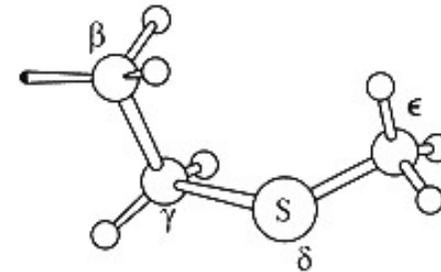
Os resíduos de histidina são extremamente úteis na análise da estrutura das proteínas por  $^1\text{H-NMR}$ , porque a ressonância do carbono  $\epsilon^1$  se destaca perfeitamente das ressonâncias dos outros hidrogénios polipeptídicos.



# A histidina: equilíbrio ácido-base

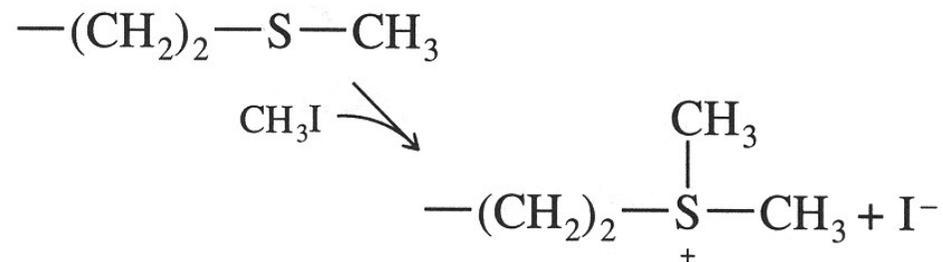


# Resíduos com enxofre: Cys, Met



## • Met

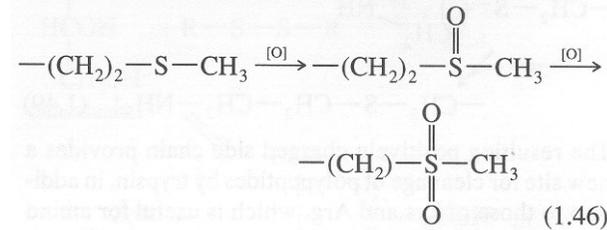
A metionina é um resíduo bastante hidrofóbico, e o único resíduo não-polar que não possui cadeia ramificada. O átomo de enxofre tem um caráter nucleofílico, e dado que não pode ser protonado, é o nucleófilo mais potente nas proteínas a pH ácido. Nessas condições apresenta especificidade para várias reações, tais como formação de sulfonatos a partir da reação com agentes alquilantes como o iodeto de metilo:



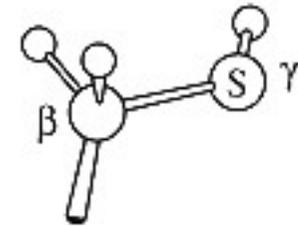
# Resíduos com enxofre: Cys, Met

O átomo de enxofre de Met associar-se ao  $\text{PtCl}_4^{-2}$  formando um complexo não-covalente (utilizado no método de substituição de átomos pesados para elucidação de estruturas por difracção de raios X).

Outra reacção possível é a oxidação pelo ar ou por outros reagentes oxidantes como o peróxido:



# Resíduos com enxofre: Cys, Met



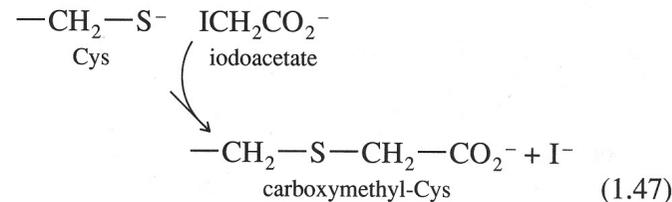
- **Cys**

O resíduo de cisteína é o mais reactivo de todos os resíduos, apresentando uma extraordinária versatilidade química e estrutural. Podem ocorrer 3 tipos de resíduos Cys em proteínas:

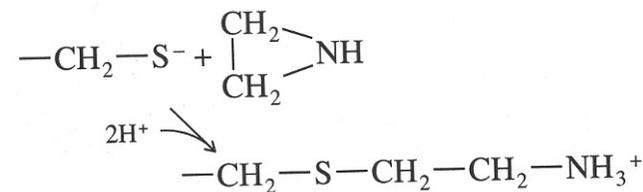
- **cys livres** - são resíduos de cisteína que não se encontram quimicamente ligados, e que desempenham um papel puramente estrutural. Apesar da semelhança aparente com a Ser, o resíduo Cys tem propriedades bem distintas, sendo um muito pior formador de ligações de hidrogénio e aparecendo como um dos resíduos com maior percentagem de ocultação no interior da proteína.
- **cys ligadas** - as cisteínas podem ser ligadas para uma grande variedade de metais e grupos prostéticos, incluindo Fe, Zn, Cu, centros de Fe-S e hemos. Geralmente duas ou quatro cisteínas com um espaçamento pequeno na sequência aparecem como ligandos do grupo prostético
- **cistinas** - pares de resíduos de cisteína ligados em pontes de persulfureto -S-S-, têm um papel muito importante na estabilização da estrutura nativa das proteínas *extracelulares* (o meio intracelular é redutor, pelo que a maioria das proteínas intracelulares não apresenta pontes de persulfureto).

# Resíduos com enxofre: Cys, Met

Sendo Cys o mais reactivo de todos os resíduos, existe uma lista extensa de reacções características. Apontam-se aqui algumas das mais conhecidas. A forma carregada da cisteína ( $pK_a \sim 9$ ) pode reagir com aletos de alquilo, como o iodoacetato, originando os correspondentes derivados de alquilo. Ex:



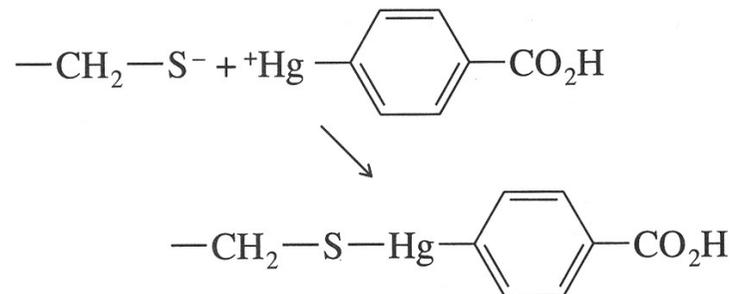
A reacção com a etilenoimina:



forma um resíduo positivamente carregado que é local de clivagem para tripsina, para além dos habituais Lys e Arg, o que tem utilidade para a sequenciação de péptidos.

# Resíduos com enxofre: Cys, Met

Os grupos tiol formam complexos com uma variedade de compostos contendo metais pesados. A reacção com o ácido *p*-mercuribenzoico:

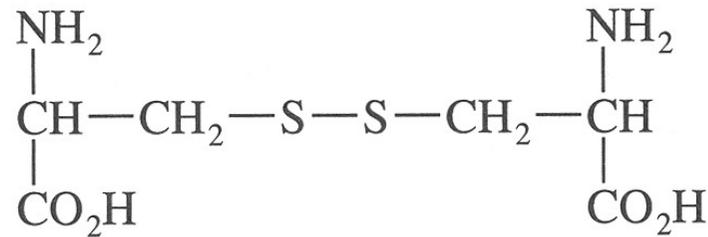


(cont.) tem uma estequiometria precisa de 1:1 e pode ser usada para titular os grupos tiol através medidas espectroscópicas. As reacções com compostos de mercúrio são, também, um dos métodos mais usados para produzir proteínas com substituintes metálicos para cristalografia de raios X.

Os grupos tiol podem formar complexos com uma variedade de iões de elementos metálicos incluindo prata, cobre, ferro, zinco, cobalto, molibdénio, manganésio e cádmio.

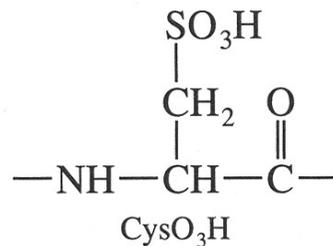
# Resíduos com enxofre: Cys, Met

Para além da forma tiólica, existem apenas dois estados de oxidação do enxofre de Cys geralmente observados, o persulfureto (-S-S-), produzido pela oxidação atmosférica:



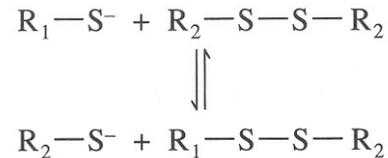
Cistina

e os ácidos sulfónicos, produzidos por agentes oxidantes mais potentes:



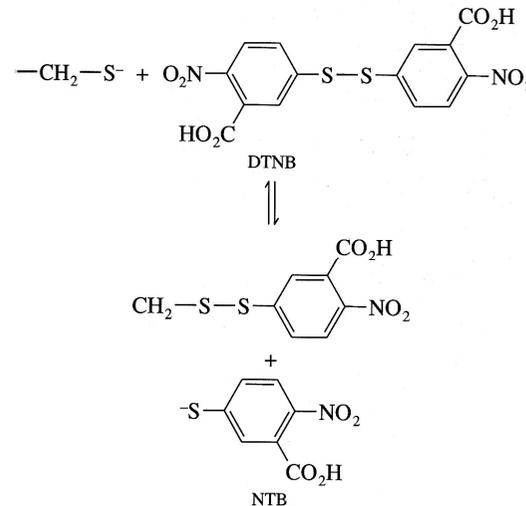
# Resíduos com enxofre: Cys, Met

O equilíbrio entre tióis e persulfuretos:



é próximo da unidade para tióis alifáticos simples e persulfuretos. Uma vez que a espécie reactiva é o anião tiolato, a extensão da reacção aumenta com o pH.

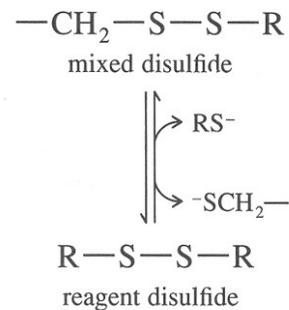
O equilíbrio entre tióis e persulfuretos aromáticos está na base de um dos métodos mais convenientes para determinação do número de grupos tiol numa proteína - o ácido ditiobisnitrobenzóico (reagente de Ellman, DTNB) é adicionado em excesso a uma solução de proteína:



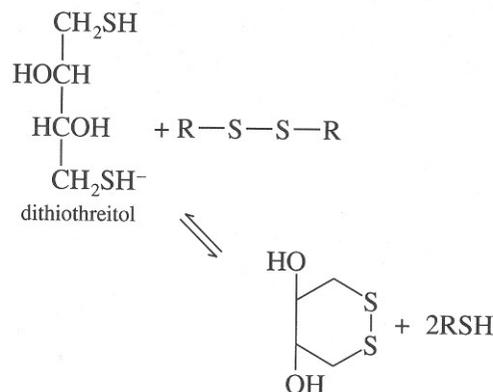
# Resíduos com enxofre: Cys, Met

(cont.) produz quantidades estequiométricas do composto NTB de cor amarela viva, que pode ser doseado espectrofotometricamente.

As pontes persulfureto das proteínas podem ser reduzidas eficazmente por reagente tiólicos como o mercaptoetanol:



O reagente de Cleland, ditioneitol, é também muito usado para quebrar pontes -S-S- em proteínas e moléculas pequenas:



A grande estabilidade do anel intermolecular do produto faz com que o equilíbrio esteja largamente deslocado para a direita.