

Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Laboratório de Química Computacional

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Análise *in silico* da estabilidade estrutural de um inibidor de
proteases em complexo com a tripsina**

Diego Elias Honda
Orientador: João Batista Lopes Martins
Coorientadora: Sônia Maria de Freitas

Brasília
2016

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus avós Hilda e Jorge. Este é o resultado da vida que abriram mão por mim. Sei que ainda é pouco, mas em breve espero poder retribuir o amor perfeito que me deram. Amo-vos de todo coração.

*Tu, felina selvagem criada sobre a relva,
Eu bem sei que não és de ninguém;
Mas o verdadeiro amar não é o uso da
Liberdade para se entregar a outrem?
Gato do Mato, D.E.H.*

*Se a vida fosse uma ação,
Seria sorrir, brincar e correr.
Enfim, seria uma eterna criança
Pulando aos montes nos campos da felicidade.
Vida, D.E.H.*

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço a Deus por me querer desde sempre e por sua providência.

Aos meus avós, que me conduziram com amor por toda vida e sempre me incentivaram a perseverar nos estudos. Devo tudo que sou a eles e este trabalho é uma ínfima retribuição a tudo que fizeram por mim, muito embora nada que eu faça poderá se igualar a tamanho bem que me fizeram.

A Rebeca, pelo amor e paciência!

Ao professor João Batista, pela sua compreensão, dedicação e paciência ao me ajudar durante todo este projeto; por continuar acreditando e mim, por mais que eu não mereça; por ter me ajudado nesta etapa de crescimento e por se preocupar comigo; por sua importância nesta trajetória e por ser quem é.

À professora Sônia de Freitas, por toda sua disponibilidade e atenção para comigo.

Ao professor Politi, por ter me dado a primeira oportunidade de desenvolver um trabalho acadêmico; por sempre se mostrar solícito e prestativo.

Ao professor Edgardo, por todos os conselhos.

Ao professor Werner Treptow e seus alunos do Laboratório de Biologia Teórica e Computacional; em especial, Vinícius.

Ao Leonard, pelo apoio institucional.

Ao Victor Bonfim, por além de todo conhecimento técnico, ter me ensinado o que é ser amigo.

A Renata, por ter me ajudado a ser uma pessoa melhor e a descobrir quem eu sou.

A Dr. Berenice, por me acompanhar desde a mais tenra infância e me ajudar a superar todos os obstáculos.

Ao meu padrinho Guilherme e sua família, por terem sido tão presentes em minha vida e me ensinado a verdade.

Aos colegas de laboratório, principalmente Élton, Vítor, Ítalo, Marcos, Rogério e Érica, que tanto me ajudaram desde o início.

Um especial agradecimento à comunidade da Paróquia Santa Teresinha do Menino Jesus e aos Sevos da Caridade, que sempre estiveram presentes em minha vida. Por todas as pessoas que lá proporcionaram meus melhores momentos de alegria e, principalmente, que me ajudaram a levantar em minhas muitas e grandes quedas. Também, ao grupo de coroinhas da Paróquia Santa Teresinha do Menino Jesus, por Tudo.

† Este trabalho é dedicado à memória de Sandrielle Aires de Oliveira

Resumo

O inibidor de serinoproteases da família Bowman-Birk *Black eyed-pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor* (BTCI), encontrado em grãos de feijão de corda *Vigna unguiculata*, é uma proteína com enorme potencial biotecnológico, sendo destacado seu aspecto farmacológico. Sua estrutura possui sete ligações dissulfeto que estendem sua ação a condições mais extremas de temperatura e pH. Toda sua aplicabilidade decorre do fato de inibir as enzimas tripsina e quimotripsina. Neste trabalho, buscou-se encontrar metodologia semi-empírica que fosse capaz de extrair informações químicas sobre o processo inibitório que ocorre entre o BTCI e a tripsina, bem como a construção de um sistema que permita um olhar mais detalhado sobre os fenômenos que ocorrem na *interface* entre o inibidor e a enzima a ser inibida. Neste sentido, as propriedades avaliadas foram os orbitais de fronteira e seus quatro vizinhos imediatos. Não obstante, também foi mensurada a força de cada uma das sete ligações dissulfeto. Observou-se que, para o estudo do BTCI no vácuo, diferentes metodologias semi-empíricas forneceram resultados adversos. Conclusão semelhante foi observada para o caso do BTCI complexado com a tripsina. Todavia, quando se analisou a *interface* entre essas duas proteínas, os métodos em questão tiveram grande correspondência entre si, indicando que a Cys²² é um dos resíduos mais importantes na *interface*, provavelmente ajudando a manter a conformação durante o processo de ancoragem. Quanto às ligações dissulfeto, não foi possível afirmar sobre qual delas maior impacta a estrutura do BTCI. Contudo, verificou-se que as ligações entre os resíduos Cys³⁴ e Cys¹⁹, e Cys⁶¹ e Cys⁴⁶ foram as de menor contribuição energética.

Abstract

The Bowman-Birk Trypsin/Chymotrypsin inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds (BTCI) is a protein with high biotechnological potential, especially due to its pharmacological aspects. Its structure has seven disulfide bonds which extends BTCI working range to some severe temperature and pH conditions. All BTCI applicability is due to its trypsin and chymotrypsin inhibition. This way, we tried to find some semi-empirical methodology capable to give chemical information about the inhibition process between BTCI and trypsin, as well as to construct a system that allows a closer look about what happens within those proteins interface. To accomplish this objective, we looked to the frontier orbitals and their four immediate neighbors. Likewise, each of its seven disulfide bonds had their energy determined. We conclude that the study of BTCI in vacuum with different methodologies give different results. Similar conclusion was seen for BTCI complexed with trypsin. However, when we analyzed the interface between those two proteins all methods are in agreement, pointing that Cys²² is responsible to maintain the interface conformation during the enzyme-inhibitor docking. About the disulfide bonds, it wasn't possible to confirm which one has the greatest impact on BTCI structure. Nevertheless, we saw that bonds between Cys³⁴ and Cys¹⁹, and Cys⁶¹ and Cys⁴⁶ residues had the lowest energy contribution.

Índice

Parte I – Introdução

1	Protease e seus inibidores	13
2	O inibidor de proteases Black eyed-pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor (BTCI)	14
3	Estabilidade conformacional do BTCI	15
3.1	Estabilização conformacional por resíduos aromáticos	17
3.2	Estabilização conformacional por ligações dissulfeto	19
3.2.1	Propriedades físico-químicas e metabólicas	25
3.2.2	Implicações Estruturais	26
3.3	Estabilização conformacional por ligações de hidrogênio	27
1.3.1	Efeito hidrofóbico	29

Parte II – Objetivos

1	Objetivo geral	31
2	Objetivos específicos	31

Parte III – Metodologia

1	Software	32
2	Preparação da estrutura	32

Parte IV – Resultados e Discussões

1	Propriedades de estrutura eletrônica do BTCI no vácuo	34
1.1	AM1	34
1.2	PM3	37
1.3	PM6	39
2	Propriedades de estrutura eletrônica do complexo BTCI-Tripsina no vácuo	42
2.1	AM1	42
2.2	PM3	44
2.3	PM6	47

3 Propriedades de estrutura eletrônica da <i>interface</i> BTCl-Tripsina no vácuo	50
3.1 AM1	51
3.2 PM3	54
3.3 PM6	57
4 Análise das ligações dissulfeto	60
Parte V – Considerações Finais e Perspectivas	64
Bibliografia	66

Lista de tabelas

Tabela 1.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método AM1	35
Tabela 2.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3	37
Tabela 3.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6	39
Tabela 4.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6	43
Tabela 5.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3	45
Tabela 6.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6	48
Tabela 7.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método AM1	51
Tabela 8.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3	54
Tabela 9.	Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6	57

Tabela 10.	Nomenclatura atribuída às ligações dissulfeto	60
Tabela 11.	Fator energético referente a cada ligação dissulfeto avaliado pelo método AM1	61
Tabela 12.	Fator energético referente a cada ligação dissulfeto avaliado pelo método PM3	62
Tabela 13.	Fator energético referente a cada ligação dissulfeto avaliado pelo método PM6	62

Lista de figuras

Figura 1.	Resíduos responsáveis pela formação do complexo ternário	16
Figura 2.	Ligações dissulfeto do BTCI	19
Figura 3.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ²⁴ e Cys ³²	20
Figura 4.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ⁵¹ e Cys ⁵⁹	21
Figura 5.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ²² e Cys ⁶⁸	22
Figura 6.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ³⁴ e Cys ¹⁹	22
Figura 7.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ⁴⁹ e Cys ⁴²	23
Figura 8.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ⁶¹ e Cys ⁴⁶	23
Figura 9.	Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys ¹⁸ e Cys ⁷²	24
Figura 10.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCI no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1	36
Figura 11.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCI no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3	38
Figura 12.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCI no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM6	41
Figura 13.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCI-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1	44
Figura 14.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCI-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3	47
Figura 15.	Resíduo contido nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCI-tripsina no vácuo, pelo método PM6	50
Figura 16.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface	53

	BTCl-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1	
Figura 17.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface BTCl-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3	56
Figura 18.	Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface BTCl-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM6	59
Figura 19.	Ligações dissulfeto e seus respectivos subdomínios	63

Parte I

Introdução

1 Proteases e seus inibidores

Proteases são enzimas que atuam na clivagem de ligações peptídicas. O mecanismo pelo qual este processo de clivagem ocorre quase sempre envolve moléculas de água, e o processo como um todo é denominado hidrólise. De uma certa maneira, proteases também são classificadas como hidrolases, haja vista que atuam como catalisadores em uma reação hidrolítica.

A função das proteases em um organismo é variada. A principal ação dessas enzimas é a participação em processos de degradação e síntese de nutrientes. Deste modo, contribuem ativamente para o metabolismo celular ao serem artífices do sistema digestivo. Pode-se citar como exemplo as enzimas tripsina e quimotripsina, ambas sintetizadas pelo pâncreas.

Todavia, tão importante quanto a atividade anteriormente descrita é a sua atuação em realizações que podem servir como vias de auxílio ao sistema imunológico. Isso reside no fato que uma quantidade considerável de vírus expressa seu conjunto proteico essencial em somente uma longa cadeia polipeptídica. Com isso, faz-se necessário um agente que não só reconheça as unidades proteicas – ou seja, suas partes terminais -, como também clive as ligações responsáveis pela junção das proteínas singulares. Este é o papel das proteases no ciclo celular viral. De uma maneira geral, estas proteases são vitais para a existência e manutenção de vírus, microrganismos e seres eucariotos em geral.

Sabendo disso e tendo em vista que o controle reprodutivo visando o decréscimo populacional, bem como o controle do metabolismo celular são de extrema importância para o controle de funções vitais nas células, uma maneira de conter sua proliferação é por meio da obtenção de moléculas que atuem como inibidores de proteases. Um exemplo da importância dos inibidores de proteases é no controle da propagação do

vírus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Uma das formas de controlar a doença provocada por esse vírus é a utilização de medicamentos que foram desenvolvidos com o intuito de inibir proteases, como: indinavir, nelfinavir, lopinavir e saquinavir. Estas drogas são classificadas como inibidores de aspartil proteases, visto que inibem enzimas que apresentam no sítio catalítico um ou mais resíduos de aspartato.

Além dos inibidores de aspartil proteases, também existem os inibidores de serino proteases, cisteíno proteases e metaloproteases, todos diferindo por meio do sítio ativo enzimático a ser suprimido.

2 O inibidor de proteases *Black eyed-pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor* (BTCl)

Inibidores pertencentes à família Bowman-Birk (BBI) têm sido testados massivamente nos mais diversos tipos de ensaios, visando uma potencial aplicação biotecnológica. Já é sabido que inibidores da família Bowman-Birk podem controlar a proliferação do HIV por meio da inibição da transcriptase reversa com uma taxa de eficiência compatível com vários antirretrovirais naturais.²⁷

O inibidor de proteases *Black eyed-pea Trypsin/Chymotrypsin Inhibitor* – abreviado pelo acrônimo BTCl – é um BBI extraído de grãos de feijão de corda *Vigna unguiculata*. Este inibidor vem sendo estudado desde a década de 60. Um dos pioneiros que isolou esta molécula é o professor Manuel Mateus Ventura, o qual, além de purificar, caracterizou extensivamente o BTCl sob o ponto de vista físico-químico e estrutural.²⁸ Esta proteína tem se destacado como uma molécula com potencial para aplicações biotecnológicas em várias áreas do conhecimento, especialmente na área farmacológica, onde foi descrito como agente anticarcinogênico de câncer de mama²⁵, como potencializador de efeitos natriuréticos e cardiovasculares em modelos *in vivo*.²⁶

Toda essa gama de aplicações está relacionada com a capacidade de o BTCl inibir a ação da tripsina e da quimotripsina, bem como de outras enzimas cujo sítio reativo é semelhante ao das duas enzimas supracitadas. Desde já, tem-se claro a importância

de se observar de maneira mais pormenorizada a estrutura do BTCl, bem como suas propriedades físico-químicas, a fim de se melhor entender o processo inibitório.

3 Estabilidade conformacional do BTCl

A estabilidade de uma proteína pode ser aferida observando-se como a variação de parâmetros físico-químicos altera sua atividade, usualmente em relação às condições metabólicas normais. Neste contexto, o BTCl apresenta propriedades não usuais quando comparado com outros inibidores de serino proteases.

Parte destas propriedades foram estudadas por da Silva *et al* e suas conclusões são, no mínimo, interessantes.² O BTCl é estável em uma ampla faixa de pH e sua atividade inibitória é altamente conservada para valores entre 3 e 10. Igualmente estável é seu comportamento sob elevadas variações de temperatura. Em pH 3, a capacidade inibitória se mantém constante entre uma faixa de 20°C a 95°C. O BTCl se mostrou sensível a uma variação conjunta de extremos de temperatura e pH. A partir de 75°C em pH 8,2 sua atividade cai em 20%. Entretanto, ainda assim o processo inibitório se mostra eficaz. Por fim, comprovou-se que a variação de temperatura também não gera mudanças em sua conformação.

Tal estabilidade conformacional é uma das características mais marcantes do BTCl. Mesmo formando um sistema com a tripsina, por meio do resíduo Lys²⁶, a distância entre os carbonos alfa de seus dois sítios reativos (32,5 Å) é similar a sua forma livre, o que aponta para a não ocorrência de mudanças conformacionais significativas em sua estrutura mediante a formação de um sistema binário.¹ Além disso, a formação de um sistema ternário envolvendo a quimotripsina, mediado pelo fragmento Phe⁵³, revela que, mesmo após a ocorrência do binário, complexações posteriores ocorrem de maneira independente à primeira e geram complexos que, quando cristalizados, formam sólidos de morfologia prismática e triangular, igualmente estáveis.⁴ A localização dos resíduos responsáveis pelas ligações que formam o complexo ternário e que, conseqüentemente, desencadeiam o processo inibitório, estão representadas na figura 1 a seguir.

Esta di-valência de regiões inibitórias homólogas do BTCl já foi testada em condições extremas e um dos estudos mais reveladores neste aspecto foi realizado por

Odani *et al*⁶, utilizando o inibidor de proteases BBI isolado de soja. Nele, por meio de clivagens químicas e enzimáticas, foi realizada uma cisão de algumas ligações peptídicas, gerando fragmentos com sítios potencialmente ativos. O que se viu a seguir foi a conservação da capacidade inibitória de todos os subsistemas.

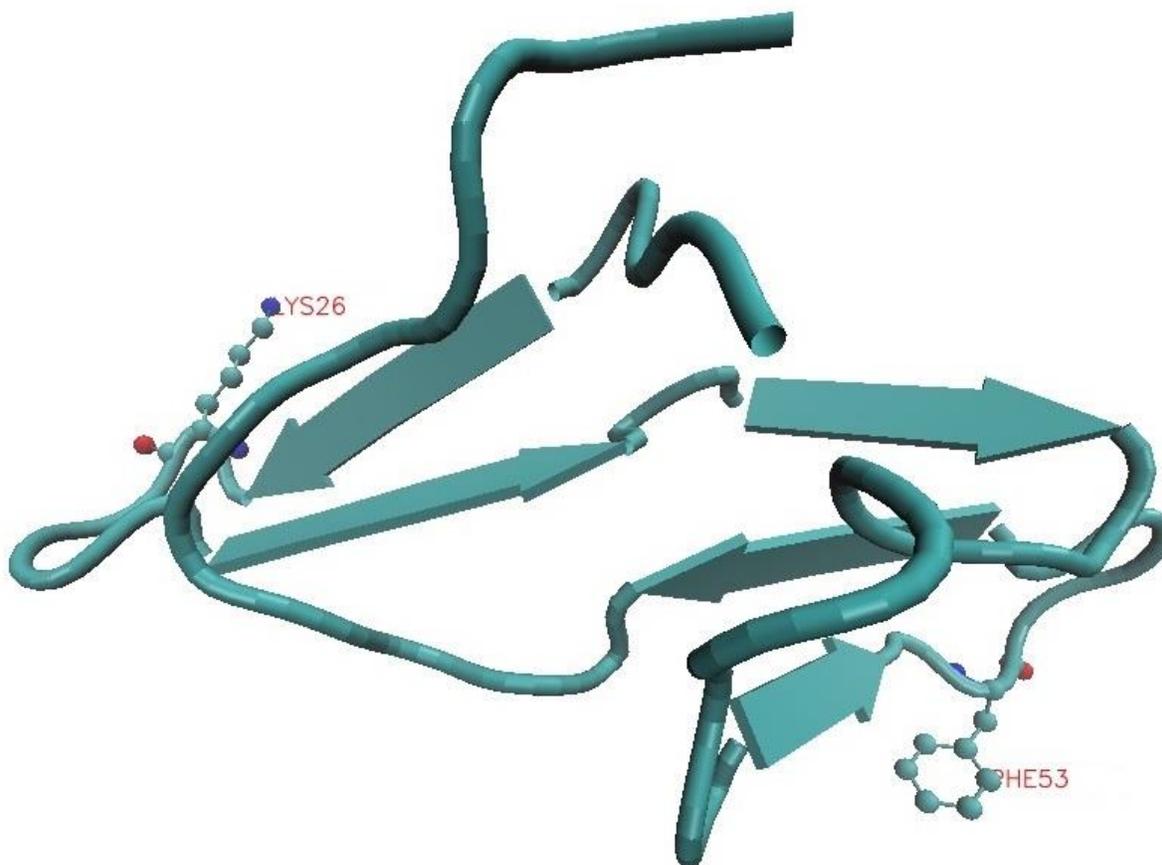


Figura 1. Resíduos responsáveis pela formação do complexo ternário

gerados - em relação à forma nativa-, a qual se manteve em níveis altos quando comparadas com o inibidor em sua forma natural. Aproximadamente 84% das interações inibidor-tripsina foram efetivas, indicando o quão estáveis são os subdomínios do BTCl.

A resistência a variações de pH e temperatura, a conservação da distância entre os carbonos alfa, a versatilidade de formação de sistemas binários e ternários, bem como a manutenção da atividade inibitória após clivagem, corroboram, dentre outros fatores, a

estabilidade conformacional do BTCI. Portanto, é necessária maior elucidação a respeito dos fatores geradores de tal estabilidade.

3.1 Estabilização conformacional por resíduos aromáticos

Ao se estudar a maneira com a qual grupos funcionais se organizam, para dar forma às disposições espaciais secundárias e terciárias de uma proteína, percebe-se que anéis aromáticos podem formar *clusters* confinados na parte mais interna da macromolécula. Estes *clusters*, juntamente com outros resíduos apolares pertencentes a cadeia lateral, dão origem a um centro hidrofóbico não acessível aos solventes mais comumente utilizados por sistemas biológicos. Termodinamicamente, esta é a configuração de menor energia para uma proteína em estado não ligado, pois sua estrutura é contrabalaneada por fragmentos hidrofílicos estabilizados pelo meio, minimizando os efeitos entrópicos.

Entretanto, dados espectroscópicos revelam que os resíduos aromáticos do BTCI se dispõem de maneira a formar interações explícitas com o solvente.²⁴ Além disso, existem aminoácidos, cuja cadeia lateral possui grupos aromáticos, localizados na parte externa da macromolécula. A exposição desses grupos hidrofóbicos favorece o processo de auto-associação, tanto no estabelecimento de uma estrutura oligomérica (quaternária), quanto na tendência de agregação.

Para ser corretamente interpretada, essa abordagem deve levar em consideração as possibilidades de auto-associação protéica. É verdade que a presença de sítios aromáticos sobre a superfície da proteína enfraquece as forças de van der Waals intermoleculares oriundas da interação entre o solvente e a proteína. Todavia, a capacidade multimérica destas macromoléculas faz com que outras configurações termodinamicamente viáveis passem a existir.

Neste sentido, um estudo pioneiro foi realizado por Burley e colaboradores.⁸ Como se sabe, a estrutura molecular de um anel aromático toma forma a partir do estabelecimento de ligações covalentes. Estas ligações apresentam elevada força interatômica, conferindo rigidez à conformação adotada. Contudo, sua organização supramolecular é totalmente determinada por interações eletrostáticas, cuja ordem de grandeza é consideravelmente menor do que uma ligação química.

Se observado o mapa de distribuição eletrônica para o benzeno, percebe-se que a ligação carbono-hidrogênio é polarizada, sendo que a disposição mais negativa é localizada sobre o carbono. Isso por sua vez favorece a formação de interações intermoleculares a partir de uma aproximação ortogonal entre os anéis, onde o hidrogênio da extremidade de uma molécula se posiciona rente a face da molécula adjacente.

Burley conseguiu então identificar o mecanismo de estabilização protéica pelo efeito de interações estritamente aromáticas. Estas eram caracterizadas por uma distância de 4,5 Å a 7 Å entre o centro dos anéis. Além disso, os ângulos de diedro residiam entre 30° e 90°; e a energia de formação limitada a uma faixa de -0,6 kcal/mol a -1,3 kcal/mol. Dentre todas as interações aromáticas por ele estudadas, aproximadamente 80% delas ligavam diferentes estruturas secundárias, o que o levou a concluir que tal efeito era responsável por estabilizar a estrutura terciária da proteína. Não obstante, notou-se também a ausência de interações entre grupos aromáticos em regiões onde a cadeia polipeptídica é distorcida. Esses resultados indicam que as ligações aromáticas promovem a formação de sítios de nucleação durante o enovelamento, fazendo com que os peptídeos sejam mantidos em uma conformação compacta, contribuindo assim para a manutenção da estabilidade conformacional protéica.

O BTCI possui um cluster formado por três anéis aromáticos ortogonais altamente conservados, os quais estão localizados em *loops* nos seguintes resíduos: Phe⁶⁷, Tyr⁶⁹ e His⁴³. A presença de grupos aromáticos na cadeia lateral do BTCI favorece a formação de oligômeros, o que, além de aumentar a área superficial, reduz as taxas de degradação.⁷

Um fato que embasa e comprova a oligomerização do BTCI é a discrepância entre a massa molecular de sua forma livre e em solução.⁹ Também já é conhecido o estabelecimento de um equilíbrio termodinâmico entre suas organizações monoméricas, diméricas, triméricas e hexaméricas. A estruturação destas formas poliméricas se dá de maneira espontânea e gera estruturas bem definidas.⁷ Outrossim, há estudos mostrando que os três anéis aromáticos de um BBI correlato formam um cluster cujas geometrias, ao serem avaliadas em pares, são ortogonais entre si; não obstante, a distância entre os centros é inferior a 7 Å, traçando assim um perfil claro de estabilização aromática.⁶

Em suma, pode-se dizer que, ao contrário do que se esperava, a presença de um grupo hidrofóbico na superfície do BTCI tende a estabilizar sua estrutura terciária por meio de interações intramoleculares fracas; assim como proporcionar a formação de um arranjo supramolecular oligomérico.

3.2 Estabilização conformacional por ligações dissulfeto

Uma das características mais marcantes do BTCI é o fato sua estrutura conter 14 resíduos de cisteína, estabelecendo sete ligações dissulfeto, conforme representado na figura 2 abaixo. Para se entender a maneira pela qual estas ligações estabilizam as cadeias peptídicas do inibidor, é preciso mapear sua localização e função estrutural.

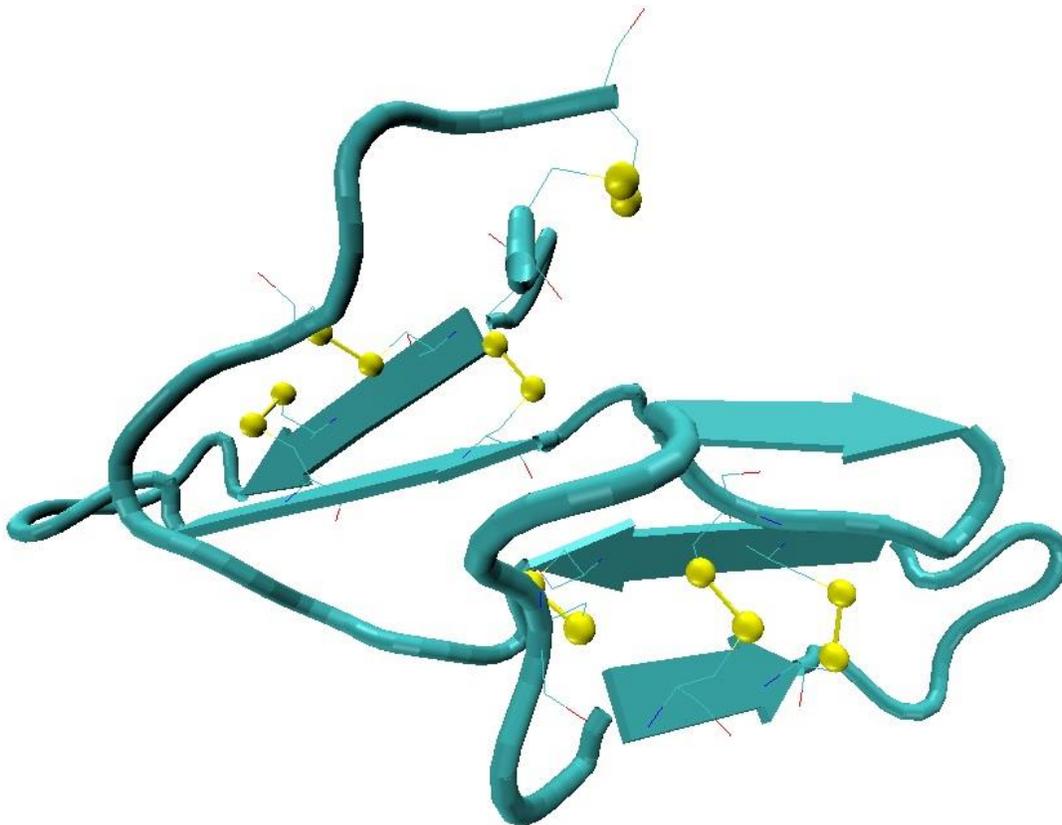


Figura 2. Ligações dissulfeto do BTCI

O BTCI contém folhas beta antiparalelas formando β -hairpins facilmente distinguíveis em sua estrutura. Estas β -hairpins são análogas e em seus β -turn estão localizados os sítios reativos para a tripsina e quimotripsina (Lys²⁶ e Phe⁵³, respectivamente). A estabilidade de cada β -hairpin é um dos fatores que vão gerar todas propriedades peculiares do BTCI citadas anteriormente no início deste capítulo. A estrutura toda, como se pode perceber, possui duas β -hairpins.

As ligações dissulfeto exercem um papel decisivo nesta estabilização, haja vista que estão localizadas em duas regiões altamente conservadas e bem definidas de um mapa de densidade eletrônica.¹ Estas ligações envolvem os resíduos Cys²⁴ e Cys³² para o subdomínio 1, bem como Cys⁵¹ e Cys⁵⁹ para o subdomínio 2, como pode ser observado por meio das figuras 3 e 4, logo abaixo. Esses resíduos fazem uma ponte direta entre as fitas intrínsecas de cada β -hairpin.

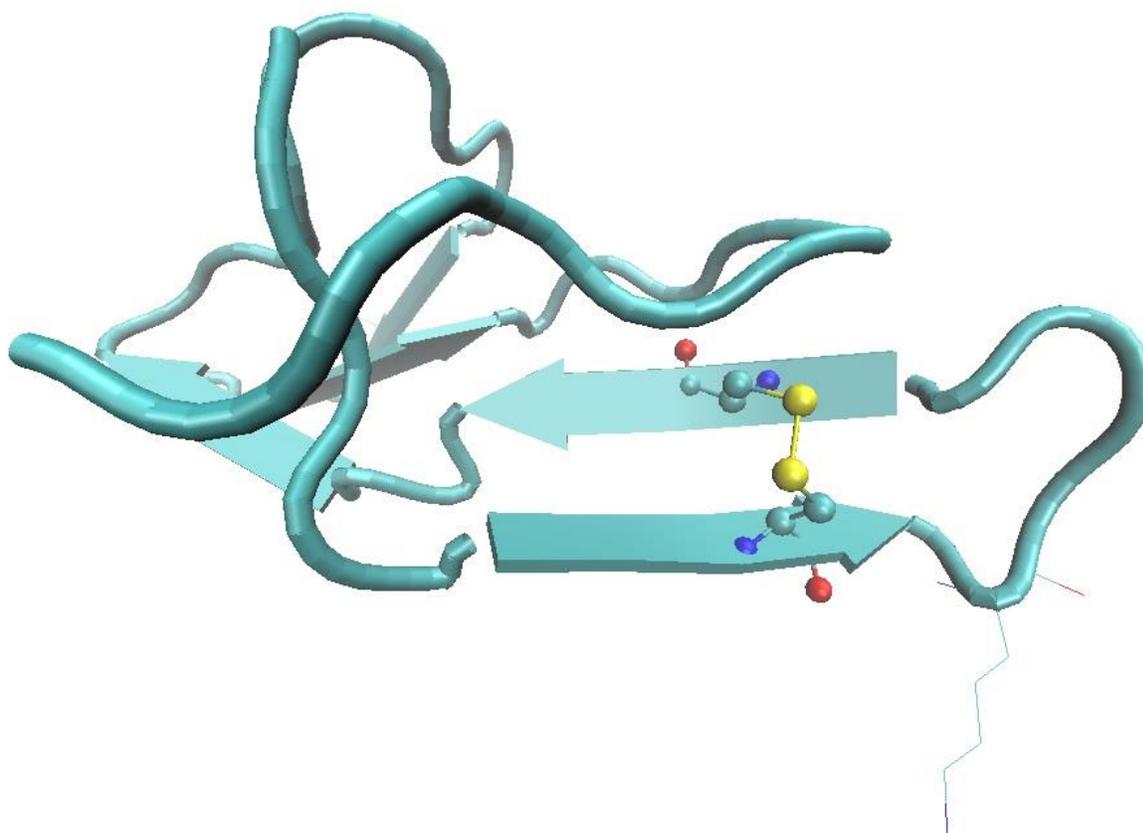


Figura 3. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys²⁴ e Cys³²

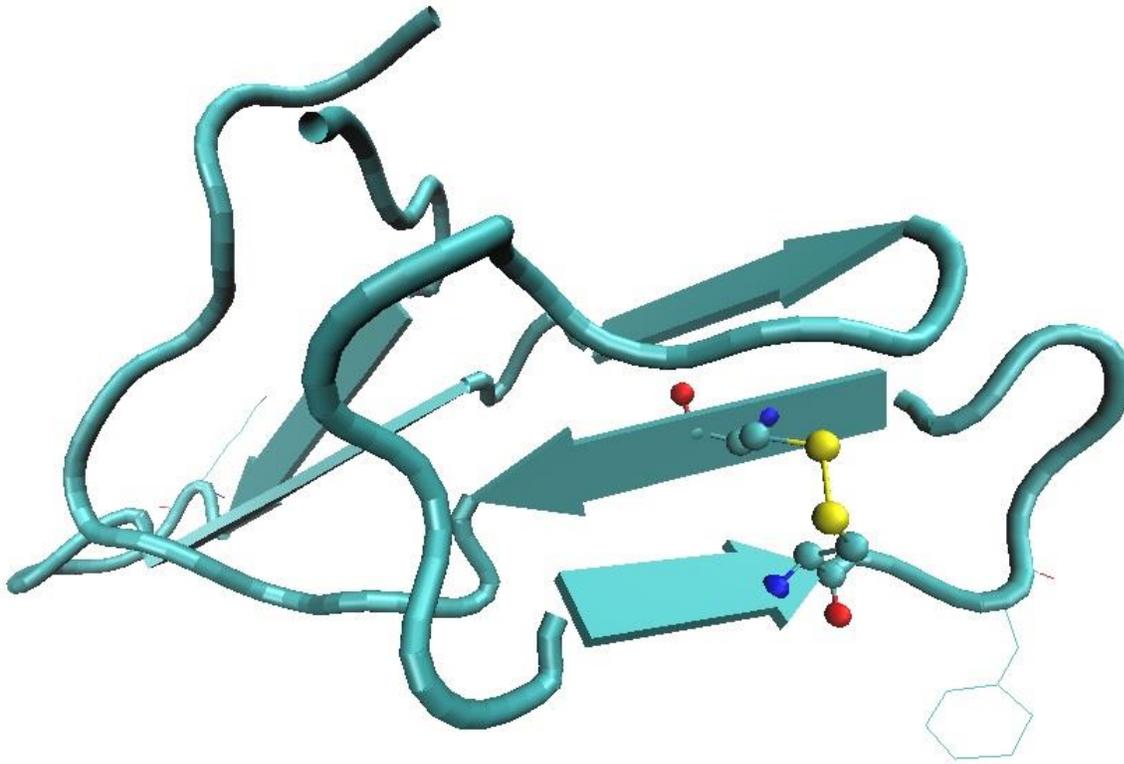


Figura 4. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys⁵¹ e Cys⁵⁹

Além desse fator de estabilização interna da folha beta, outros quatro conjuntos de ligações análogas dão origem a uma estabilização externa que proporciona a organização da estrutura terciária. São elas: Cys²²-Cys⁶⁸ e Cys³⁴-Cys¹⁹ para a porção do inibidor que mais interage com a tripsina; tal como Cys⁴⁹-Cys⁴² e Cys⁶¹-Cys⁴⁶ para a porção que mais interage com a quimotripsina. Estas ligações são análogas no sentido de ligarem uma fita de β -hairpin a um loop. Da primeira folha beta, a Cys²² liga uma fita e a Cys³⁴, a outra; da segunda, a Cys⁴⁹ liga uma fita e a Cys⁶¹, outra. Todavia, os loops com os quais elas se ligam não são equivalentes. Os loops do subdomínio 1 são terminais e distintos entre si, enquanto ambas as cadeias da β -hairpin do subdomínio 2 se ligam ao mesmo loop. Por sua vez, este loop está contido em um terceiro subdomínio localizado entre os dois sítios catalíticos. As figuras 5, 6, 7 e 8, a seguir, melhor ilustram estas disposições.

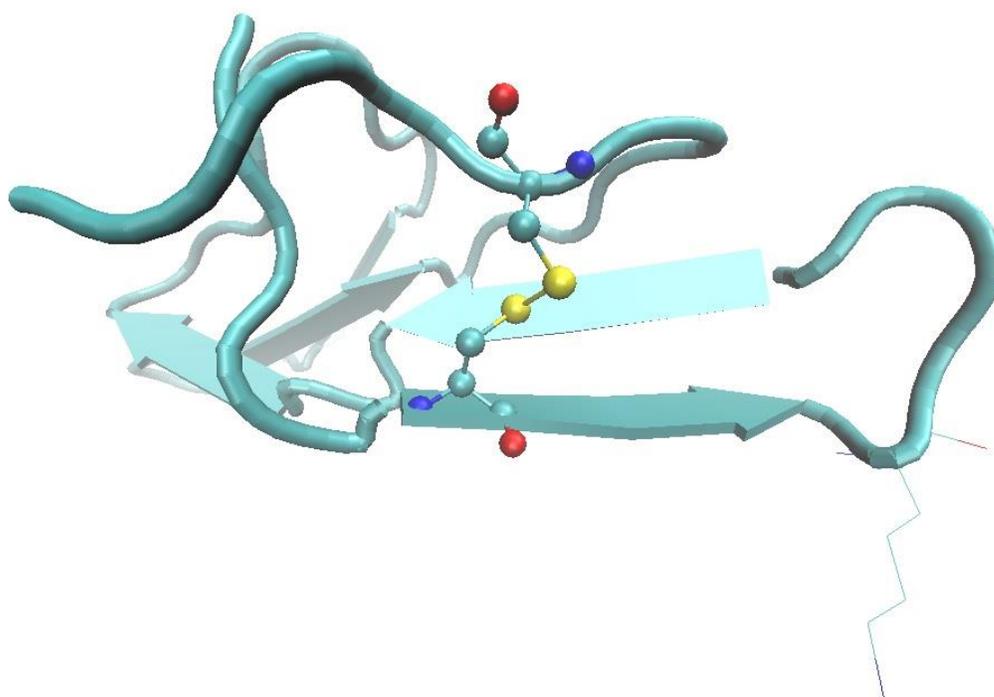


Figura 5. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys²² e Cys⁶⁸

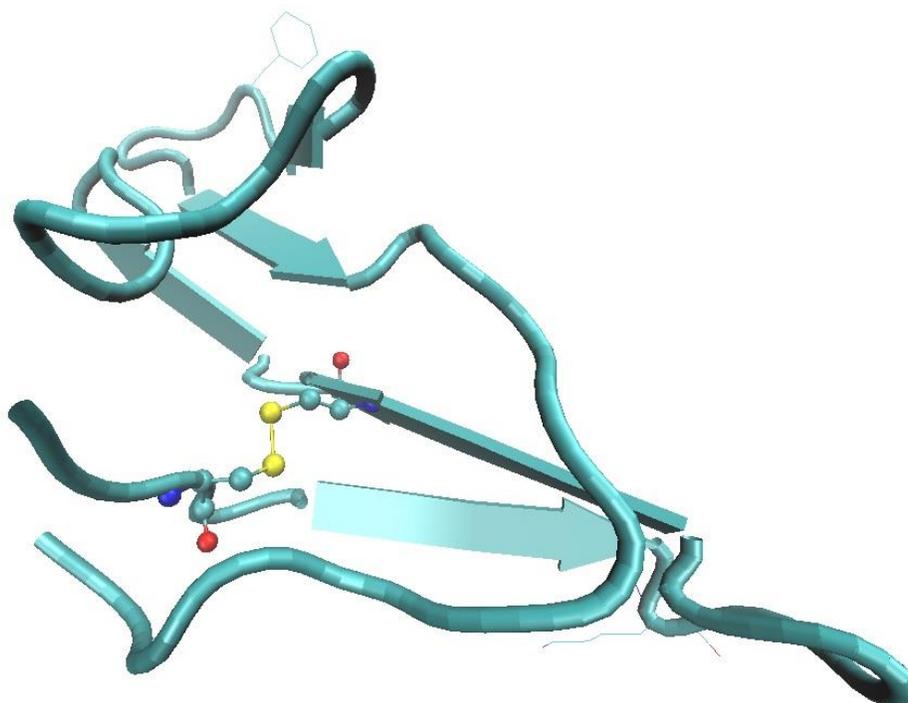


Figura 6. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys³⁴ e Cys¹⁹

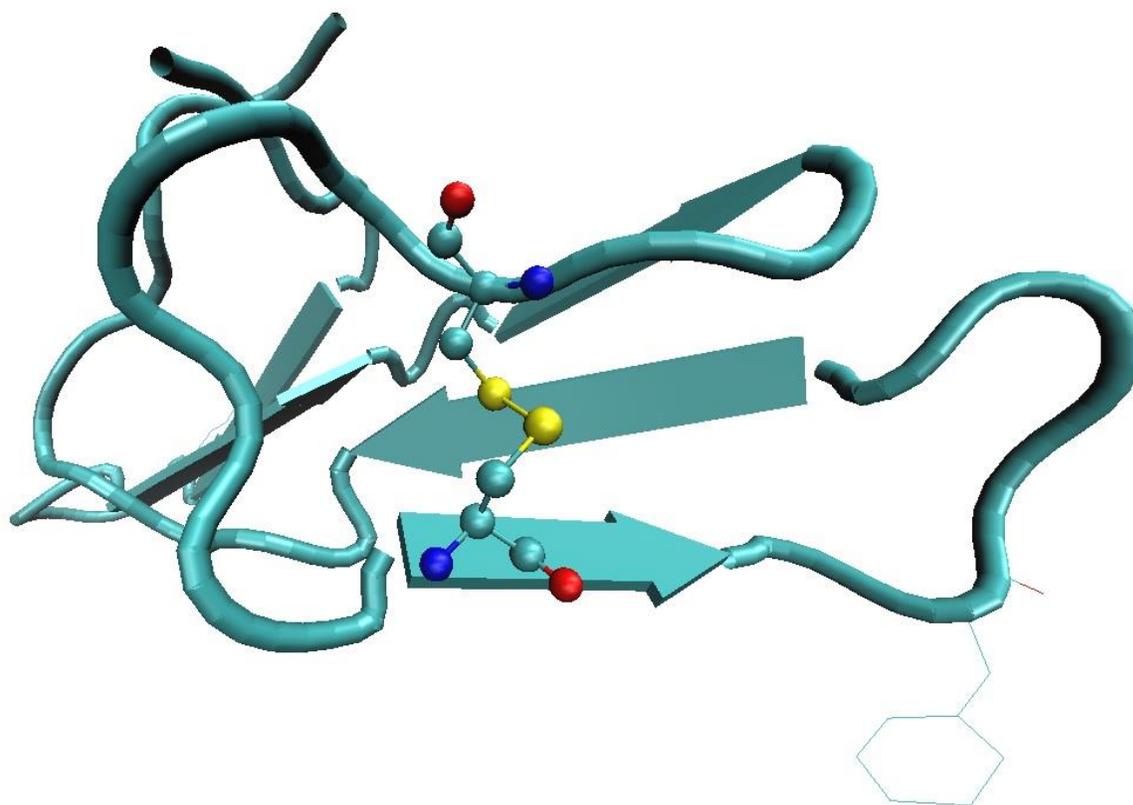


Figura 7. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys⁴⁹ e Cys⁴²

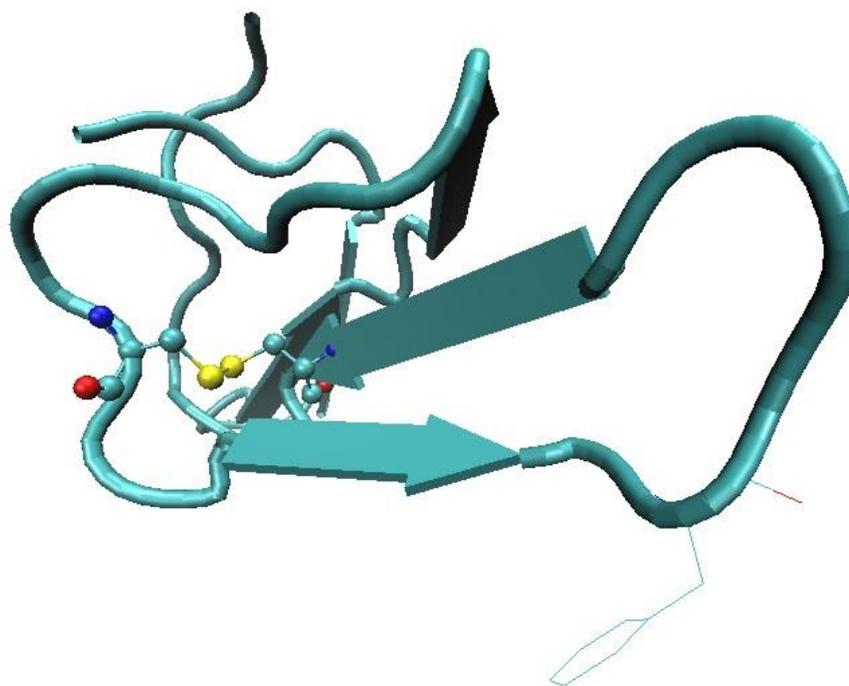


Figura 8. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys⁶¹ e Cys⁴⁶

Por fim, a Cys¹⁸ gera uma ligação dissulfeto com a Cys⁷², como mostra a figura 9 abaixo. Cada qual integra um *loop* terminal da proteína, levando a crer que a ligação estabelecida entre eles faz o BTCI não possuir terminais muito flexíveis, mantendo razoável grau de compactação. Esta hipótese é sustentada pelos resultados de Richardson, os quais mostram que os ângulos torcionais χ_1 e χ_2 , bem como a distância entre os carbonos alfa, são as características estruturais mais bem conservadas em ligações dissulfeto.¹⁴

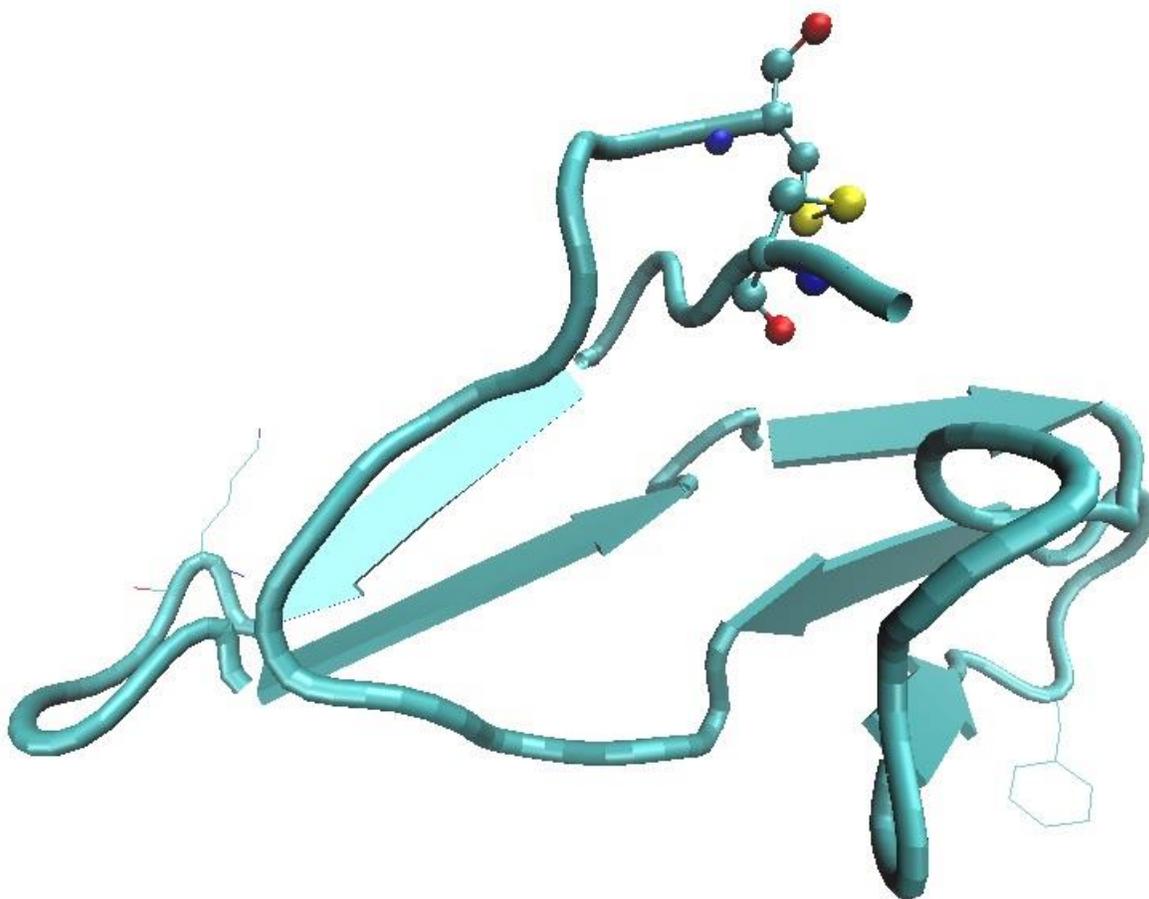


Figura 9. Ligação dissulfeto entre os resíduos Cys¹⁸ e Cys⁷²

Por possuírem tais ligações assumindo funções estruturais diferentes, pressupõe-se que cada uma não contribua de maneira equitativa para a estabilização da estrutura. Corroborando esta proposição, pode-se afirmar que as ligações dissulfeto entre as cadeias de uma folha beta mais influenciam a organização secundária da proteína, enquanto a ligação entre os *loops* terminais está mais relacionada a distribuição terciária da mesma. Um estudo de Katz e Kossiakoff também aponta para esta contribuição não igualitária ao propor que *loops* e folhas melhor se adequam às mudanças conformacionais advindas da formação de ligações dissulfeto do que hélices.¹³ Ou seja, são estruturas mais aptas a dissiparem energia de deformação.

Uma consequência importante da presença destas ligações no BTCl diz respeito às suas interações intermoleculares. A julgar pela não polaridade da ligação, é notório que interações dissulfeto conferem um caráter hidrofóbico ao meio que as circunda. Por isso, a região em torno dela geralmente é inacessível ao solvente,¹² e isso deriva do fato de que os dois enxofres são unidos covalentemente, formando um centro apolar. Juntamente com a estabilização por resíduos aromáticos, este é um outro fator crucial que explica a tendência do BTCl em formar sistemas oligoméricos.

3.2.1 Propriedades físico-químicas e metabólicas

Por serem ligações fortes, pode-se dizer que a presença de ligações dissulfeto melhora a estabilidade estrutural de uma macromolécula ao conferir maior rigidez conformacional. Por sua vez, a alteração desta disposição espacial traz consigo modificações importantes nas características físico-químicas do sistema, as quais estão diretamente relacionadas com o metabolismo de proteínas.

Um estudo que mostra claramente o impacto destas variações foi realizado por Natalia *et al.*¹⁰ Nele, uma enzima derivada da espécie *Saccharomycopsis fibuligera*, a α -amilase R64 (Sfamy01), foi modificada geneticamente de modo que dois resíduos de aminoácidos se convertessem em cisteínas, formando uma nova enzima contendo uma ligação dissulfeto na região entre seus domínios (Sfamy02).

Na primeira etapa de caracterização, foi evidenciada uma clara e magnificente diferença entre as massas moleculares. A espécie Sfamy01 apresentou um déficit de

4096 Da, evidenciando uma perda de aminoácidos a ponto de indicar que a variante em questão sofreu clivagem proteolítica. Esta constatação sugere que a presença de ligações dissulfeto pode prevenir a proteólise.

Ambas amilases mantiveram 90% de sua atividade quando aquecidas a 60°C. Entretanto, a 65°C a variante Sfamy01 perdeu boa parte de seu desempenho, enquanto a Sfamy02 manteve 60% de sua capacidade catalítica. Aparentemente, o aumento da estabilidade térmica da enzima não compromete sua ação. Além disso, a Sfamy02 manteve sua funcionalidade em valores de pH entre 4,5 e 7,5; o que, comparado com o intervalo de 5,4 a 6,8 da Sfamy01, aponta para uma maior versatilidade em relação a diferentes solventes. Ou seja, seu uso pode ser adequado para sistemas biológicos mais diversificados.

Quanto ao produto gerado pelas duas amilases, tanto uma quanto outra produziram quantidades similares de maltotriose, maltose e glucose, esboçando que a especificidade da enzima não se altera. Ademais, o T_m para a forma natural é aproximadamente 1,5°C menor que o relativo à expressão modificada. Isso também é compatível com o aumento do IC50 mediante à elevação de temperatura.

3.2.2 Implicações estruturais

A característica mais marcante dos inibidores de proteases da família Bowman-Birk é a presença de 7 ligações dissulfeto. Entretanto, o que mais chama a atenção é a maneira como estas ligações estão distribuídas espacialmente. Em 6 modelos de inibidores amplamente conhecidos (identificados pelos PDB 1H34, 1BBI, 1PBI, 1MVZ, 1PI2, 1DF9), a localização destas interações é exatamente a mesma, dando origem à importantes implicações estruturais para o sistema como um todo.

De um modo geral, a distribuição espacial das ligações dissulfeto indicam o grau de ordenamento conformacional para uma dada proteína.¹⁵ Um sistema protéico desordenado tende a apresentar suas ligações dissulfeto distribuídas de maneira aleatória. Por outro lado, quanto mais ordenada uma proteína for, mais bem conservada será a disposição espacial de suas ligações dissulfeto.

Este ordenamento é expresso na forma de todas as funções estruturais citadas no

início desta seção, as quais são comuns aos 6 modelos observados. Obviamente, tal ordenamento não é justificado em si mesmo, mas originário de algum fator decisivo para o enovelamento protéico.

Ora, foi observado que somente as ligações dissulfeto nativas (presentes na configuração funcional da proteína) dão origem a uma estrutura terciária estável.¹⁵ Além disso, somente a estrutura terciária nativa é obtida quando do processo de enovelamento oxidativo. Dado o início do processo oxidativo, a proteína se equilibra rapidamente para a formação de uma distribuição na qual as ligações dissulfeto nativas são favorecidas. Entretanto, é claro que muitas das espécies não-nativas também se fazem presentes, pois as interações individuais que estabilizam as ligações nativas não são tão maiores a ponto de favorecer uma em detrimento de outra. De fato, ligações nativas e não-nativas apresentam força similar.

O que gera tamanho favorecimento da forma nativa é a conformação adotada durante o processo de enovelamento. Ela, por sua vez, isola estericamente as ligações dissulfeto nativas de agentes redutores provenientes do solvente ou da própria proteína. Deste modo, ligações dissulfeto nativas não são formadas por serem extremamente favorecidas, mas por serem menos expostas à redução ou rearranjo intramolecular, explicando não só o fato de os inibidores da família Bowman-Birk possuírem resíduos de cisteína extremamente conservados, como também tais resíduos serem, em grande parte, inacessíveis ao solvente.

3.3 Estabilização conformacional por ligações de hidrogênio

O BTCl possui um *cluster* formado por 4 resíduos cujas cadeias laterais são polares e carregadas. São eles: Asp³⁶, Arg³⁸, His⁴³ e Asp⁶³. Este *cluster* é frequentemente encontrado em inibidores da família Bowman-Birk,^{6,17} e sua ocorrência possibilita a formação de ligações de hidrogênio mediadas por água.¹ É importante salientar que os aminoácidos deste *cluster* dispõem suas cadeias laterais de maneira que o cerne da proteína seja exposto a um potencial eletrostático, o que dá origem a um razoável confinamento de moléculas de água em seu interior, formando um verdadeiro reduto hidrofílico.

Outrossim, as interações eletrostáticas são tão importantes para a bioquímica do BTCl que sua ancoragem à molécula de tripsina se dá por meio de um contato polar formado pela Lys²⁶, o qual conta com a participação de duas moléculas de água, as quais, por meio de ligações de hidrogênio, mediam a estabilização da carga positiva no terminal amino da Lys²⁶.

A presença destas ligações de hidrogênio compõe a lista dos fatores que contribuem para a estabilidade conformacional do BTCl. Em um estudo realizado por Vogt *et al*, foi demonstrado que de 16 famílias de proteínas observadas, em mais de 80% delas constatou-se um aumento da termoestabilidade em virtude do acréscimo da quantidade de ligações de hidrogênio entre os átomos de uma mesma proteína.¹⁶ Não obstante, o crescimento do número de átomos de nitrogênio e oxigênio na superfície também contribuiu para o aumento de ligações de hidrogênio com o solvente e com outras proteínas.

Mecanicamente, o estudo de Vogt não é revelador. Todavia, outros estudos envolvendo moléculas pequenas e proteínas cristalizadas revelaram que o ângulo da ligação de hidrogênio $R_1-O-H\cdots O-R_2$ adota preferencialmente valores próximos de 180°.¹⁹ Senão ainda, ligações de hidrogênio envolvendo doadores com hibridização sp^2 tendem a apresentar uma distribuição geométrica com seus receptores situados no plano da espécie sp^2 e vice-versa.²⁰ Isso explica em parte a localização das moléculas de água dentro da cavidade interna do BTCl e na interface formada por ele e as respectivas proteases.

Stickle *et al* também mostraram que grande parte das ligações de hidrogênio presentes em uma proteína se dão entre os átomos da cadeia principal.¹⁸ Mais especificamente, envolvem elementos provenientes da estrutura secundária, sendo que quase a totalidade delas ocorrem entre resíduos adjacentes ou muito próximos em relação a sequência de aminoácidos.

Concomitantemente, ligações de hidrogênio cooperativas são mais fortes do que as não-cooperativas. De modo que a carboxila de um resíduo com ligação de hidrogênio formada a partir do grupo amina do mesmo resíduo será fortalecida ao ter todo peptídeo polarizado.²⁰ Este fato, quando analisado em um contexto global, faz com que a contribuição das ligações de hidrogênio para a estabilidade conformacional de uma

proteína seja ainda mais acentuada devido à presença de uma rede de ligações de hidrogênio.

Por si só, os elementos das quatro cadeias laterais dos resíduos citados anteriormente (resíduos Asp³⁶, Arg³⁸, His⁴³ e Asp⁶³), sendo polares e formando ligações de hidrogênio, são, então, parte dos agentes que conferem estabilidade conformacional ao BTCl. Contudo, a contribuição energética destas ligações de hidrogênio para o enovelamento protéico como um todo ainda é pequena, abrindo espaço para indagamentos sobre quão essencial o são. Dado que a energia de uma ligação de hidrogênio é da ordem de 2 a 10 kcal/mol, em uma conjuntura local sua contribuição é desprezível. Todavia, há de se expandir o escopo observado e se levar em conta a cooperatividade destas ligações, as quais, polarizando o peptídeo e o ambiente ao redor, favorecem a formação de outras ligações que por sua vez originam uma verdadeira rede que confere certa rigidez à proteína. De maneira semelhante, como existe uma grande extensão de resíduos cujas cadeias laterais polares estão confinadas no interior da proteína, o estabelecimento de ligações de hidrogênio intramoleculares é crucial para regular o potencial eletrostático interno.

3.3.1 Efeito hidrofóbico

Conforme tem sido descrito, é nítida a existência de uma correlação entre as ligações de hidrogênio e o ambiente químico. Neste sentido, um estudo de Duan *et al* explicitou os fatores ambientais que afetam e se deixam afetar pela presença destas ligações.²²

Segundo ele, a força das ligações de hidrogênio presentes na cadeia principal se vincula com o ambiente eletrostático local. O modo para se aferir este potencial elétrico está intimamente ligado com a quantidade de moléculas de água presentes na primeira camada de solvatação. Desta maneira, as ligações de hidrogênio têm sua força acentuada em um ambiente hidrofóbico em detrimento do aumento da solvatação por um solvente aquoso; sugerindo que tais ligações são mais fortes em ambientes apolares do que em ambientes polares. Concomitantemente ao efeito citado, para um melhor entendimento do efeito hidrofóbico, deve-se levar consideração a competição da ligação

de hidrogênio pelas moléculas do solvente

Os efeitos da polarizabilidade do ambiente foram explorados por Gao *et al* em um estudo que revelou a contribuição energética deste fator.²³ De acordo com ele, ao diminuir a polarizabilidade do microambiente em torno de uma ligação de hidrogênio, a estabilidade desta ligação pode ser aumentada em até 1,2 kcal/mol. Também, a introdução de cadeias laterais hidrofóbicas na superfície de uma proteína gera certa estabilização energética da molécula devido à tendência de auto associação.

Todos estes fatores aumentam a força das ligações de hidrogênio em seu estado nativo. Quando combinados, dão origem a um grande fator estabilizador que reforça amplamente o estado nativo em relação a um possível desenovelamento protéico.

É interessante notar que estes resultados foram verificados em ambientes cujas estruturas secundárias adotam a forma de folha ou hélice. Inference-se então que a dependência existente entre a força das ligações e os aspectos microambientais é um fator crucial para se entender não só a maneira pela a qual uma estrutura terciária é formada, como também para um estudo pormenorizado da ação das forças responsáveis pelo enovelamento protéico.

Parte II

Objetivos

1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é avaliar as propriedades físico-químicas que determinam a estabilidade estrutural do inibidor de proteases BTCI, bem como deste inibidor associado com a tripsina. Estas propriedades serão avaliadas por metodologias computacionais que representem um sistema macromolecular em detalhe atômico. É de interesse que os resultados gerados permitam prever quais resíduos são mais propícios a participarem de uma reação química, além de avaliar qualitativamente a importância de cada ligação dissulfeto para a estabilidade conformacional do BTCI

2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a eficácia dos métodos semi-empíricos AM1, PM3 e PM6 para o estudo do BTCI no vácuo;
- b. Avaliar a eficácia dos métodos semi-empíricos AM1, PM3 e PM6 para o estudo do complexo BTCI-tripsina no vácuo;
- c. Avaliar a eficácia dos métodos semi-empíricos AM1, PM3 e PM6 para o estudo da *interface* entre o BTCI e a tripsina no vácuo e
- d. Determinar a força de cada ligação dissulfeto do BTCI.

Parte III

Metodologia

1 Software

Para se lograr êxito no cumprimento dos objetivos outrora descritos, a abordagem computacional utilizada foi baseada em métodos semi-empíricos. A escolha desta abordagem se deu pelo fato de ser a mais robusta que pode ser utilizada em um sistema com as dimensões de uma proteína. Em todos os casos estudados foram realizados cálculos de energia.

Dentro do *hall* dos métodos semi-empíricos, escolheu-se as rotinas *Austin Model 1* (AM1), *Parameterized Model 3* (PM3) e *Parameterized Model 6* (PM6) pelo fato de serem as mais comumente implementadas nos *softwares* de modelagem molecular.

Todos os cálculos foram realizados por meio do programa *Gaussian09*. As imagens aqui apresentadas foram geradas com os programas *GaussView 5.0* e *Visual Molecular Dynamics 1.9.2* (VMD). A metodologia adotada para cada objetivo específico é detalhada a seguir.

2 Preparação da estrutura

Para o estudo do BTCI no vácuo, extraiu-se do *Protein Data Bank* a estrutura 2G81. A partir dela, gerou-se uma estrutura sem moléculas de água e demais solventes originalmente contidos. Por fim, excluiu-se a enzima tripsina. O mesmo procedimento foi adotado quando do estudo do complexo BTCI-tripsina no vácuo, com exceção da etapa de exclusão da tripsina.

Já para o estudo da *interface* entre o inibidor e a enzima a ser inibida, foram mantidos os resíduos do BTCI que estavam a 5 Å de distância da tripsina e da tripsina que estavam a 5 Å de distância do BTCI.

Com o intuito de se determinar a força de cada ligação dissulfeto do BTCI, foram

realizados sete cálculos. Em cada um deles dada ligação dissulfeto era excluída de maneira que o átomo de enxofre da cisteína era substituído por um grupo CH₃. A energia de ligação foi calculada por meio da seguinte expressão:

$$E_L = E_C - E_{corr}$$

Onde E_L é a energia de ligação, E_C a energia do sistema completo (com todas as ligações dissulfeto) e E_{corr} a energia corrigida do sistema sem a ligação dissulfeto em questão. A energia corrigida foi obtida da seguinte maneira:

$$E_{corr} = E - (2 * E_{CH_3}) + (2 * E_S)$$

Onde E é a energia do sistema sem a ligação dissulfeto, E_{CH₃} a energia da molécula CH₃ fornecida pelo método semi-empírico utilizado e E_S a energia de um átomo de enxofre, também fornecida pelo mesmo método semi-empírico.

É importante ressaltar que os valores obtidos para a energia de ligação são estimativas simplificadas em relação ao seu real valor.

Parte IV

Resultados e Discussões

1 Propriedades de estrutura eletrônica do BTCl no vácuo

O BTCl em sua forma livre foi avaliado por meio de três métodos semi-empíricos - AM1, PM3 e PM6 – a fim de se averiguar qual deles melhor se adequa para a obtenção de propriedades eletrônicas e estruturais. O uso de tais metodologias torna possível a elucidação de características que, em princípio, poderão ser um forte suporte para estudos experimentais; tais como a energia dos orbitais de fronteira e a obtenção da carga eletrostática de cada átomo. O intuito de utilizar esses métodos deve-se ao tamanho dos sistemas estudados, que comprometeriam o tempo computacional com metodologias mais rigorosas, em muitos casos inviabilizando completamente o uso de tais métodos. Portanto, os orbitais de fronteira poderiam ser de ajuda para a avaliação entre o tempo computacional e o método usado.

1.1 AM1

O método AM1 representa um avanço em relação às primeiras abordagens semi-empíricas criadas, tal como a MNDO. Esse tipo de abordagem melhor avalia as repulsões atômicas e, conseqüentemente, a representação das energias de ativação também é superior. Outrossim, a força das ligações de hidrogênio predita por essa metodologia é igualmente razoável com o que se é esperado. Sendo assim, o método AM1 é um bom ponto de partida para obtenção das propriedades de estrutura eletrônica do BTCl. A Tabela 1, abaixo, sumariza os resultados para os orbitais de fronteira e seus vizinhos, bem como os respectivos valores de seus conteúdos energéticos, obtidos por meio de um cálculo de energia.

Tabela 1. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método AM1

Orbital	Energia (eV)	Resíduo
HOMO -4	-6,702	Lys ⁷⁰
HOMO -3	-6,540	Cys ³⁴
HOMO -2	-6,347	Asp ⁶⁶
HOMO -1	-6,196	Cys ⁴²
HOMO	-5,929	Cys ⁴⁶
LUMO	-4,752	Cys ⁶⁸
LUMO +1	-4,188	Cys ³²
LUMO +2	-4,088	Cys ⁷²
LUMO +3	-4,045	Cys ⁵⁹
LUMO +4	-3,910	Cys ⁴⁹

Este método localiza os orbitais de fronteira, bem como os mais próximos destes, principalmente em resíduos cujas cadeias laterais são neutras e não polares. Além disso, ainda que pequena, há uma contribuição de fragmentos polares carregados tanto positivamente quanto negativamente, caracterizados como terminais básicos e ácidos na molécula (Lys⁷⁰ e Asp⁶⁶, respectivamente).

Ambos orbitais HOMO e LUMO foram ocupados por fragmentos de cisteína e a diferença de energia entre eles foi de 1,177 eV. É importante notar que tanto a Cys⁴⁶ quanto a Cys⁶⁸ estão associadas com duas ligações dissulfeto interligando duas fitas β para formar o motivo *β -hairpin* em dois subdomínios distintos. A Cys⁶⁸ faz parte do subdomínio 1, ligando uma fita a um loop terminal juntamente com a Cys²²; enquanto a Cys⁴⁶ faz parte do subdomínio 2, formando uma ligação dissulfeto com a Cys⁶¹. Ambos resíduos estão localizados entre os dois sítios reativos do inibidor (Lys26 e Phe53).

Ao localizar majoritariamente os orbitais de fronteira e seus vizinhos em resíduos contendo enxofre, o método aponta claramente as cisteínas como fatores cruciais de contribuição energética. De fato, como exposto na introdução, este é um importante agente de estabilização conformacional, e o método AM1, para este sistema, o explicita de maneira satisfatória. Em uma análise preliminar, este resultado sugere que as ligações dissulfeto entre fitas não são as mais energeticamente favoráveis, tampouco entre loops terminais.

Entretanto, a eficácia do método pode ser questionada, visto que os orbitais HOMO e LUMO se dispuseram distantes entre si em 11,90 Å (distância aferida entre os carbonos

alfa dos aminoácidos que mais contribuem para a formação do orbital), como pode ser visto na Figura 9. Este resultado tanto pode sugerir que os orbitais não foram adequadamente representados quanto que existem duas regiões energeticamente propensas a realizarem ligações químicas - como é o caso do BTCl.

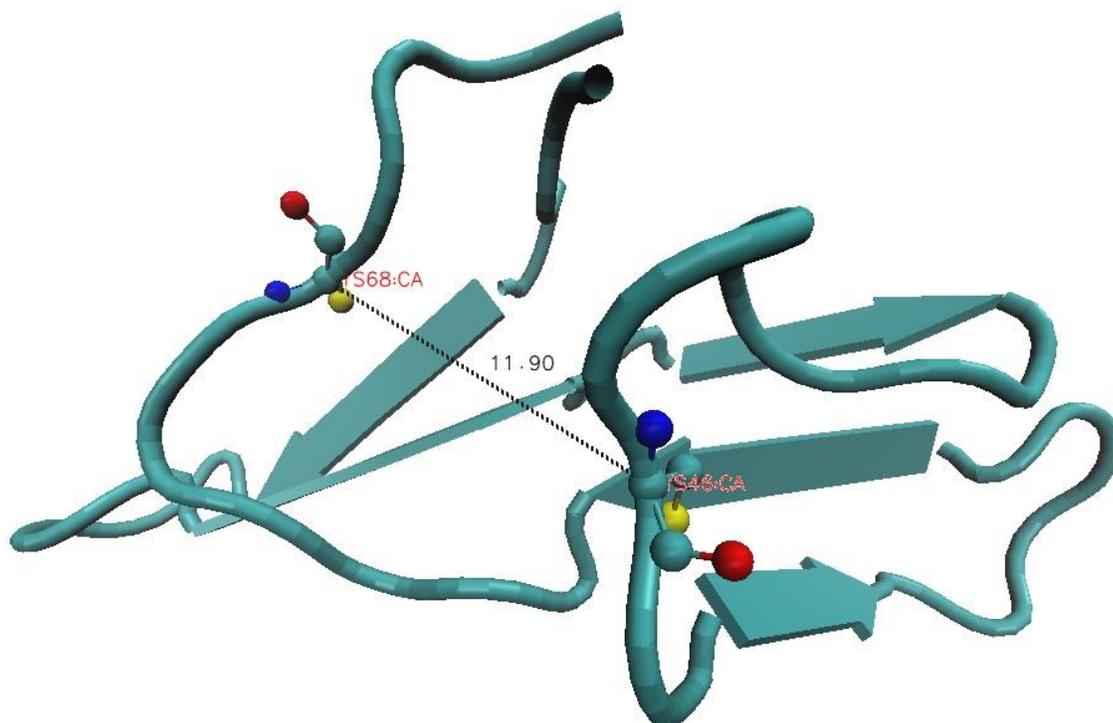


Figura 10. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCl no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1

Também é interessante perceber que todos os orbitais de fronteira não ocupados são formados por espécies neutras, enquanto que o caráter polar dos resíduos pertencentes aos orbitais de fronteira ocupados começa a ser mais pronunciado. É relevante perceber que a Cys⁶⁸ integra o orbital LUMO do BTCl, visto que este resíduo se encontra dentro do subdomínio responsável por se ligar à tripsina e a sua presença é essencial para o estabelecimento de uma ligação dissulfeto que colabore para a manutenção da configuração da β -hairpin, além de direcionar o sítio reativo para a ligação com a enzima.

1.2 PM3

Contrastando com a abordagem anterior, a metodologia PM3 localiza os orbitais de fronteira e seus vizinhos quase que exclusivamente em resíduos cujas cadeias laterais são polares, conforme pode ser observado na Tabela 2 abaixo. A única exceção ocorreu no orbital LUMO +3 – localizado no resíduo Cys⁴⁹. Este fato em si pode vir a representar uma vantagem em relação ao modelo anterior, pois a interface entre o BTCl e a tripsina é formada basicamente por contatos polares.¹

Tabela 2. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3

Orbital	Energia (eV)	Resíduo
HOMO -4	-6,784	Lys ⁴⁷
HOMO -3	-6,583	Arg ³³
HOMO -2	-6,408	Asn ⁶⁵
HOMO -1	-6,162	Asn ⁴⁰
HOMO	-5,970	Ser ⁴⁴
LUMO	-4,795	Asp ⁶⁶
LUMO +1	-4,430	Glu ²³
LUMO +2	-4,238	Tyr ⁶⁹
LUMO +3	-4,080	Cys ⁴⁹
LUMO +4	-3,963	Lys ⁴⁷

Acerca das cargas eletrostáticas localizadas nesta macromolécula, o presente método não apontou uma tendência explícita. A quantidade de orbitais formados por resíduos eletricamente carregados e por resíduos neutros foi idêntica. Vale a pena ressaltar que, mesmo sem indicar uma clara propensão à manutenção ou não da eletroneutralidade nos resíduos que formam os orbitais de fronteira, a quantidade de fragmentos não neutros foi consideravelmente maior do que a resultante pelo método AM1. Sabendo que o BTCl possui um *cluster* composto por resíduos eletricamente carregados e que o equilíbrio entre sua forma monomérica e dimérica é também guiado por interações eletrostáticas, a utilização do método PM3 pode, em princípio, melhor descrever os fatores que conduzem a estas observações.²⁴

Um dos orbitais detectados é formado por um importante aminoácido polar que compõe o *cluster* dos anéis aromáticos ortogonais altamente conservados, incluindo a Tyr⁶⁹. Contido no orbital LUMO +2, este resíduo é um dos responsáveis por estabilizar a estrutura terciária do BTCI por meio do estabelecimento de interações intramoleculares fracas, e sua ocorrência enriquece ainda mais a gama das propriedades que podem ser extraídas pelo método PM3.

Os orbitais HOMO e LUMO foram igualmente ocupados por fragmentos polares, sendo neutro e negativo respectivamente. A diferença de energia entre eles foi de 1,175 eV, o que não divergiu do resultado obtido anteriormente. O HOMO foi localizado em uma região entre os dois sítios reativos; enquanto o LUMO foi encontrado em uma fita terminal, conforme mostra a Figura 10. A distribuição espacial dos orbitais de fronteira não fornece contribuição substancial para explicar a reatividade do BTCI, uma vez que estão distantes dos dois sítios reativos (Lys26 e Phe53). Além disso, a distância entre os dois orbitais de fronteira aumentou, estando a uma distância de 17,23 Å um do outro.

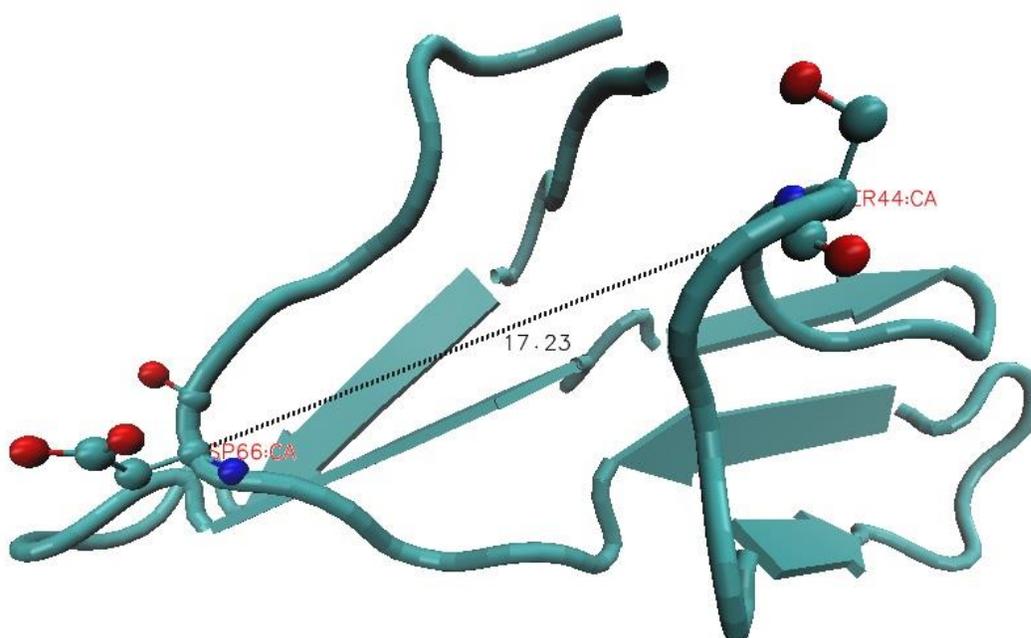


Figura 11. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCI no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3

1.3 PM6

O método PM6 avalia a tendência de localizar os orbitais de fronteira e seus vizinhos em resíduos não carregados eletricamente, como observada utilizando o método AM1. Todavia, ao contrário de todas as abordagens anteriores, a metodologia PM6 não os localiza em resíduos majoritariamente polares ou apolares. Há uma ligeira tendência em distribuí-los em fragmentos polares - haja vista que neles foram distribuídos 6 orbitais de fronteiras -, mas não a ponto de indicar uma propensão explícita, como pode ser visto na Tabela 3, logo abaixo. Este comportamento revela um equilíbrio não encontrado nas representações anteriores, o qual pode ser adequado para a condução de um estudo cujo foco não seja a obtenção de propriedades pontuais altamente atreladas a polaridade molecular.

Tabela 3. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do BTCl no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6

Orbital	Energia (eV)	Resíduo
HOMO -4	-7,265	Ser ³⁵
HOMO -3	-7,243	His ⁴³
HOMO -2	-7,137	Cys ⁶⁸
HOMO -1	-7,012	Cys ⁶⁸
HOMO	-6,807	Lys ⁴⁷
LUMO	-5,629	Tyr ⁶⁹
LUMO +1	-4,897	Thr ⁵²
LUMO +2	-4,768	Lys ²⁶
LUMO +3	-4,746	Cys ³²
LUMO +4	-4,731	Ala ⁵⁰

Os orbitais HOMO -3, HOMO e LUMO +2 foram ocupados pelos resíduos His⁴³, Lys⁴⁷ e Lys²⁶, respectivamente. É relevante pontuar que estes aminoácidos apresentam uma importante característica em comum: todos são básicos. Não obstante, estes foram os únicos fragmentos que apresentaram alguma tendência em a relação à acidez ou basicidade do sistema. Sendo eles singulares neste sentido, pode-se afirmar que o método PM6 para o BTCl no vácuo foi a única abordagem capaz de explicitar alguma tendência quanto ao comportamento ácido ou básico desta macromolécula, dado que em

todos métodos anteriores a quantidade de orbitais de fronteira localizados em resíduos ácidos foi semelhante à encontrada em resíduos básicos.

O orbital LUMO foi ocupado por um fragmento de grande valor energético, cuja importância já foi destacada na seção anterior. A Tyr⁶⁹, fazendo parte do cluster de anéis aromáticos que estabilizam a estrutura terciária do BTCI, não pode deixar de ser mencionada. É de extrema importância salientar que na abordagem anterior, pelo método PM3, a Tyr⁶⁹ ocupou o orbital LUMO +2, conforme pode ser visto na Tabela 2; enquanto a metodologia empregada nesta seção a localizou em um orbital de menor energia, o LUMO. Esta redução energética pode ser interpretada como uma corroboração da importância que este cluster formado por anéis aromáticos ortogonais altamente conservados exerce para as propriedades físico-químicas do BTCI.

A Lys⁴⁷ apresentou um comportamento ambíguo na metodologia anterior, ocupando ao mesmo tempo os orbitais HOMO -4 e LUMO +4. Aqui, sua participação é claramente acentuada ao ser localizada em um orbital de fronteira, conforme representado na Figura 11, abaixo; e sua reatividade inequivocamente revelada por fazer parte exclusivamente do orbital HOMO.

O método PM6 foi o único a identificar um dos quatro resíduos cujas cadeias laterais polares e carregadas formam um outro cluster cuja ocorrência torna possível a formação de ligações de hidrogênio mediadas por água. A His⁴³, disposta no orbital HOMO -3, é um dos aminoácidos que colaboram para a estabilização conformacional do BTCI.

Também é interessante notar que esta abordagem dispôs três vizinhos de orbitais de fronteira em cisteínas, o que representa um meio termo entre os 8 fragmentos localizados pelo método AM1 e a Cys⁴⁹, única encontrada pelo PM3. Não só isso, mas ambas Cis³² e Cys⁶⁸ também foram pontos comuns entre a metodologia AM1 e PM6. Essas, por sua vez, fazem parte do subdomínio 1, local onde ocorre a ligação com a tripsina. A Cis³² é responsável pelo estabelecimento de uma ligação dissulfeto entre as duas fitas do motivo *β -hairpin* deste subdomínio, enquanto a Cis⁶⁸ liga uma destas fitas a um *loop* terminal. Em uma análise preliminar, a ocorrência destes fragmentos específicos do subdomínio 1 nos vizinhos imediatos dos orbitais de fronteira pode apontar para uma maior relevância, em termos mecanísticos, deste subdomínio em relação àquele.

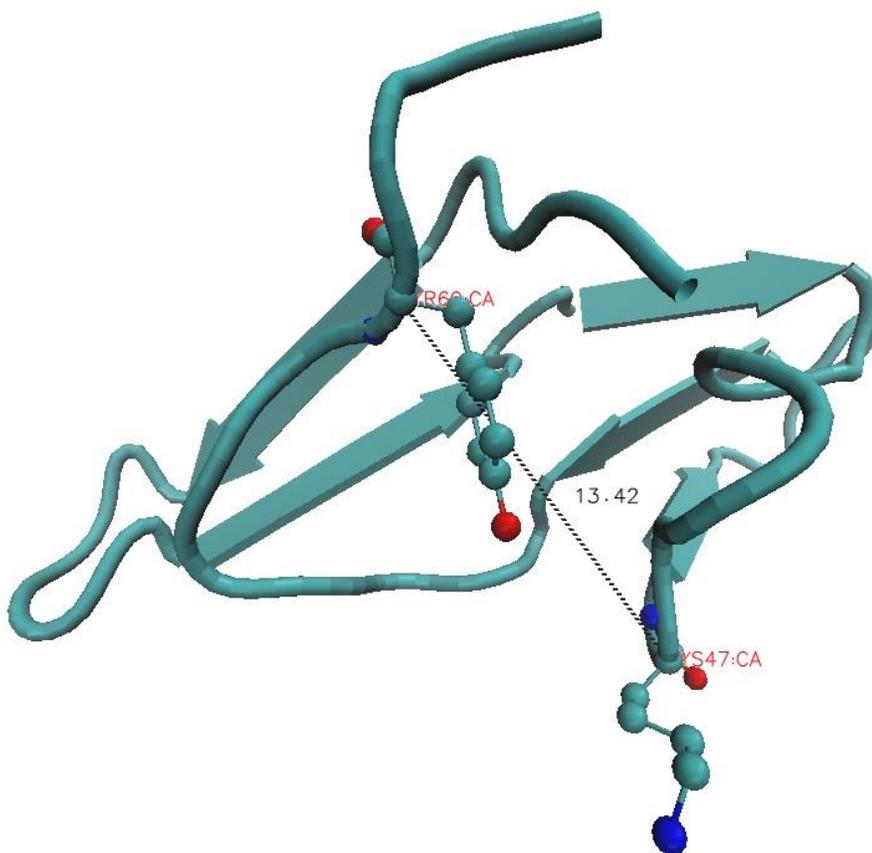


Figura 12. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO no BTCL no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM6

Assim como o método anterior, os orbitais HOMO e LUMO foram igualmente ocupados por resíduos polares. Todavia, o HOMO é ocupado por um resíduo cuja cadeia lateral é carregada positivamente; enquanto a cadeia lateral do resíduo que ocupa o LUMO é neutra. A diferença energética entre eles foi de 1,178 eV e um respectivo distanciamento de 13,42 Å, compatível com os resultados obtidos anteriormente. A localização espacial destes orbitais de fronteira ainda não contribui significativamente para explicar a reatividade do BTCL. A Lys⁴⁷, ainda que pertencente ao subdomínio 2, está distante da interface entre o BTCL e a quimotripsina. A Tyr⁶⁹, contudo, mesmo fazendo parte de uma cadeia terminal e distante de ambos sítios catalíticos, é importante para a cavidade hidrofílica do BTCL, dado que esta região é limitada por resíduos hidrofóbicos. Sua ocorrência formando o orbital LUMO é um resultado que pode e revelar o quão crucial

são estes limites hidrofóbicos para a manutenção de uma cavidade que confina moléculas de água, importantes do processo de interação desse inibidor com as proteases.

2 Propriedades de estrutura eletrônica do complexo BTCl-Tripsina no vácuo

Para escolher uma metodologia semi-empírica capaz de retratar a interação entre o BTCl e a tripsina, a mesma metodologia aplicada anteriormente para o BTCl isolado no vácuo foi aplicada para o complexo. Com isso, a seguir são apresentados os resultados e a posterior análise dos mesmos.

2.1 AM1

A metodologia AM1 localizou os orbitais de fronteira e seus vizinhos mais próximos majoritariamente na tripsina, conforme pode ser observado na Tabela 4 a seguir. Este resultado em si não é adequado para se avaliar a eficácia do método quanto a percepção de características físico-químicas. Todavia, caso fosse adotado para um estudo posterior visando a obtenção de propriedades moleculares mais detalhadas, poderia dificultar a observação de dados referentes ao inibidor, haja vista que somente 20% dos orbitais de fronteira foram localizados no BTCl.

Dos poucos orbitais de fronteira notados para o BTCl, a Cys⁴² chama atenção, haja vista de nela é contido um átomo de enxofre que realiza uma das importantes ligações dissulfeto responsáveis pela estabilidade conformacional do BTCl. Esta ligação dissulfeto é estabelecida entre a própria Cys⁴² e a Cys⁴⁹, as quais ligam uma folha beta a um loop. Este fato pode indicar a possível prevalência desta ligação em relação às outras.

Se for comparada com os resultados do BTCl no vácuo, a amplitude das energias dos orbitais foi menor para o complexo BTCl-tripsina. De fato, lá, a amplitude foi de 2,792 eV; enquanto aqui encontrou-se 1,466 eV. Pode-se então afirmar que, de acordo com metodologia AM1, a complexação torna os orbitais de fronteira, de um ponto de vista energético, mais homogêneos. Outro dado que corrobora esta afirmação é o desvio

Tabela 4. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCI-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-4.960	Cys ⁴²	BTCI
HOMO -3	-4.944	Pro ¹⁵²	Tripsina
HOMO -2	-4.886	Phe ¹⁸¹	Tripsina
HOMO -1	-4.724	Trp ²¹⁵	Tripsina
HOMO	-4.614	Lys ¹⁵⁶	Tripsina
LUMO	-4.306	Lys ¹⁰⁹	Tripsina
LUMO +1	-3.846	Ile ⁶⁴	BTCI
LUMO +2	-3.767	Trp ²¹⁵	Tripsina
LUMO +3	-3.745	Phe ¹⁸¹	Tripsina
LUMO +4	-3.494	Lys ¹⁵⁶	Tripsina

padrão do conjunto das energias. Para o BTCI isolado no vácuo, o desvio padrão das energias dos orbitais de fronteira e de seus vizinhos mais próximos foi de 1,192. Já para o BTCI complexado com a tripsina, 0,569.

Quanto a polaridade, o método AM1 localizou os orbitais de fronteira e seus vizinhos majoritariamente em resíduos apolares, dado este que foi de encontro ao percebido para o BTCI isolado. Este conjunto representou 70% dos orbitais computados. Somente 30% residiram em aminoácidos polares. Nestes, a carga eletrostática da cadeia lateral foi, em sua totalidade, positiva. Por fim, observou-se que estas mesmas cadeias laterais apresentavam um caráter básico.

Outro fator relevante a ser notado diz respeito a aromaticidade dos resíduos. Como se pode inferir pela Tabela 4, 40% dos orbitais de fronteira foram localizados em aminoácidos aromáticos. Este é um contraponto muito importante em relação ao BTCI isolado analisado pelo método AM1, visto que lá nenhum orbital de fronteira, tampouco seus vizinhos, foram observados em resíduos aromáticos.

Um dado que chama atenção é o fato de que ambos os orbitais HOMO e LUMO se dispuseram na tripsina. Também vale a pena ressaltar que os orbitais HOMO e LUMO se dispuseram em resíduos polares básicos carregados positivamente (Lys¹⁵⁶ e Lys¹⁰⁹ respectivamente), mesmo os aminoácidos não polares neutros representado 70% dos aminoácidos observados. A diferença energética entre eles foi de 0,308 eV, consideravelmente menor que o BTCI isolado calculado pelo método AM1, o que mais

uma vez confirma a hipótese de que a complexação torna os orbitais de fronteira mais homogêneos em relação à energia. Todavia, a distância entre os orbitais HOMO e LUMO mais que dobrou, como pode ser notado pela Figura 12 abaixo: 27,02 Å. De certo modo, este resultado não é por todo estranho tendo em conta que o sistema como um todo aumentou consideravelmente.

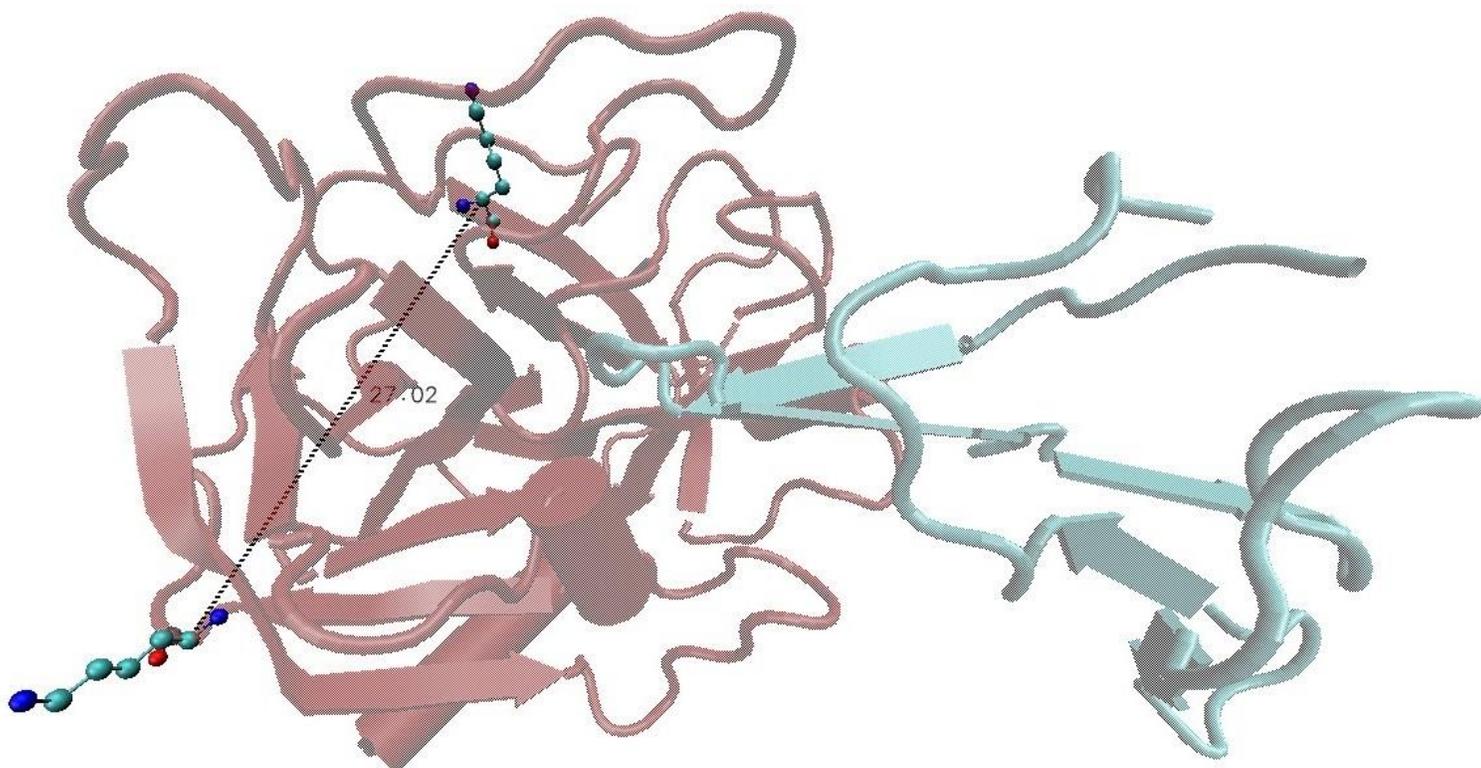


Figura 13. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCI-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1

2.2 PM3

Quando o sistema é analisado por uma perspectiva originada da metodologia PM3, tem-se uma situação que não muito se difere da abordagem anterior. Conquanto, aqui os orbitais de fronteira e seus vizinhos se dispuseram mais preponderantemente em resíduos pertencentes à tripsina, como pode-se notar pela Tabela 5.

Estatisticamente, a proporção foi ainda mais discrepante: somente 10% dos orbitais computados se localizaram em aminoácidos do BTCI. Deste modo, de uma maneira preliminar pode-se afirmar que a metodologia PM3 tende a acentuar o comportamento observado pela rotina AM1.

O orbital de fronteira detectado que pertence ao BTCI foi localizado somente no resíduo Ile⁶⁴. Contudo, há de se fazer uma ressalva: o fator energético não foi o mesmo. Mesmo ocupando um orbital idêntico (LUMO +1), houve um decréscimo de 0,168 eV em energia.

Tabela 5. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCI-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-5.162	Ser ¹²⁷	Tripsina
HOMO -3	-5.099	Phe ¹⁸¹	Tripsina
HOMO -2	-5.088	Asp ¹⁵³	Tripsina
HOMO -1	-4.875	Trp ²¹⁵	Tripsina
HOMO	-4.754	Lys ¹⁵⁶	Tripsina
LUMO	-4.194	Lys ¹⁰⁹	Tripsina
LUMO +1	-4.014	Ile ⁶⁴	BTCI
LUMO +2	-3.996	Trp ²³⁷	Tripsina
LUMO +3	-3.948	Phe ¹⁸¹	Tripsina
LUMO +4	-3.941	Trp ²¹⁵	Tripsina

Ao comparar estes resultados com os advindos da metodologia anterior, nota-se de um decréscimo sistemático nas energias dos orbitais de fronteira e seus vizinhos. Com efeito, lá, a média das energias era de -4,329 eV; enquanto aqui, -4,507 eV. É bem verdade que este decréscimo não é de elevada magnitude. Todavia, o fator energético ainda assim é relevante, pois se for analisada a amplitude dos valores, constata-se que também aqui há certa diminuição: 1,221 eV face dos 1,466 eV do método anterior. Ou seja, também pode-se observar uma tendência de homogeneização energética, ainda que em menor escala, dos orbitais de fronteira e seus vizinhos ao se avaliar o sistema BTCI-tripsina no vácuo pelas rotinas AM1 e PM3. Esta afirmação também encontra respaldo nos desvios padrões: 0,532 em face dos 0,569 estimados a partir da metodologia utilizada anteriormente.

Visando uma comparação entre os diferentes sistemas, a amplitude das energias do BTCI no vácuo foi de 2,885 eV. Já para o complexo BTCI-tripsina, no vácuo, obteve-se 1,221 eV. Mais uma vez vê-se que a complexação do BTCI com a tripsina torna os orbitais de fronteira e seus vizinhos mais homogêneos. O outro fator que secunda esta afirmação é o desvio padrão. Este, para o BTCI no vácuo, foi valorado em 1,172. Já para o complexo BTCI-tripsina este valor foi de 0,532.

A polaridade das cadeias laterais dos resíduos, nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram localizados, variou consideravelmente em relação ao BTCI no vácuo analisado pelo método PM3. Lá, 80% desses orbitais residiram em aminoácidos polares; enquanto aqui, apenas 40% mantiveram tal tendência. Nestes, nem o caráter ácido nem básico apresentou uma prevalência de elevada magnitude. A cadeia lateral de dois deles era básica; de um outro, ácida; e do último, neutra.

Em relação à quantidade de resíduos contendo anéis aromáticos, houve um avanço notório mediante complexação. Pela Tabela 2, percebe-se que o BTCI no vácuo possui somente um orbital localizado em resíduo cuja cadeia lateral é aromática. Para o BTCI complexado com a tripsina, esta quantidade quintuplicou-se. Tendo em vista que a presença de grupos aromáticos na estrutura protéica pode apontar para um possível aumento da rigidez conformacional, este é um fato relevante e a sua ocorrência pode reforçar a importância da presença desses grupamentos.⁸

Tanto o orbital HOMO quanto o orbital LUMO foram dispostos nos mesmos resíduos polares básicos encontrados pela metodologia AM1 (Lys¹⁵⁶ e Lys¹⁰⁹ respectivamente). A diferença de energia entre eles foi de 0,560 eV, maior que o *gap* encontrado pela rotina AM1 (0,308 eV) e extensamente menor que a diferença tendo em vista o cálculo do BTCI no vácuo com o mesmo método PM3 (1,175 eV). Este último paralelo serve para evidenciar o que outrora fora dito: complexação do inibidor com a enzima a ser inibida evidencia uma tendência de homogeneização dos orbitais de fronteira. Conforme se nota pela Figura 13, a distância entre esses orbitais de fronteira foi de 27,02 Å, representando uma mudança significativa em relação ao BTCI no vácuo (17,23 Å); contudo, essencialmente igual à distância do complexo BTCI-tripsina aferida pelo método AM1, sendo este um elemento que pode indicar certa compatibilidade entre os métodos.

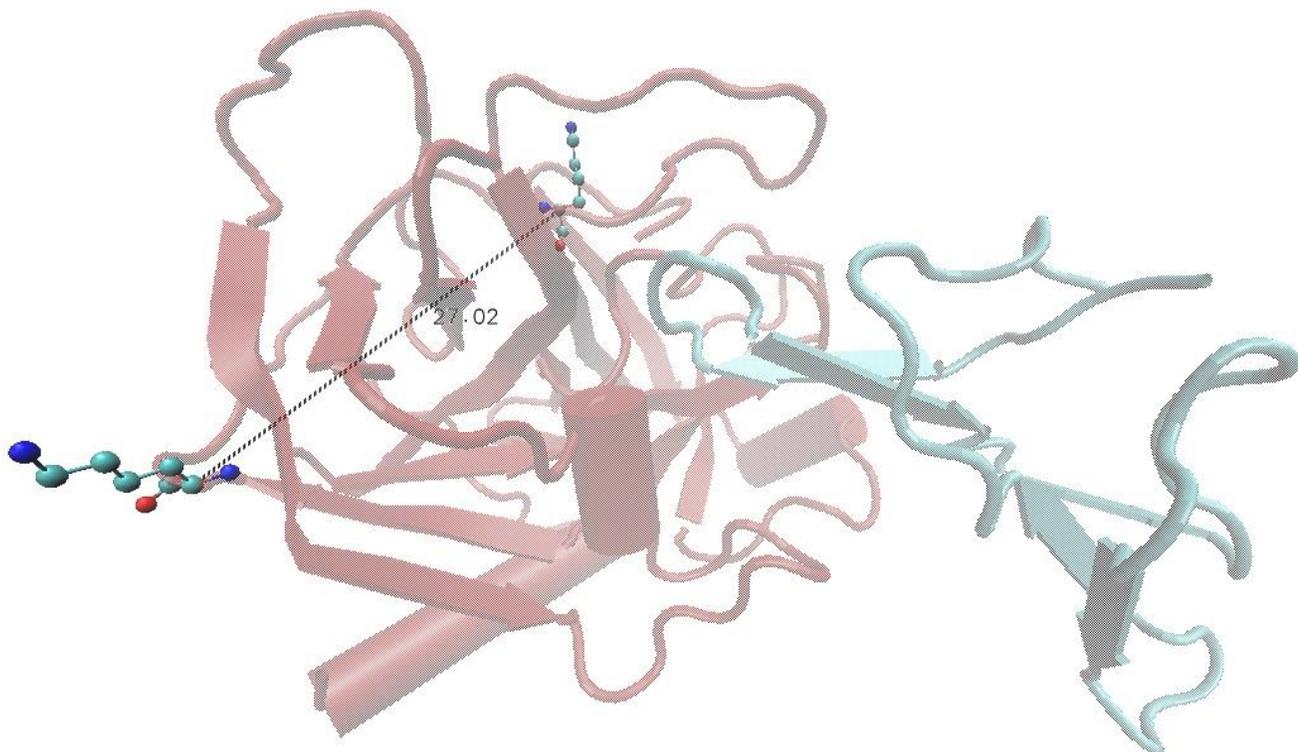


Figura 14. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCI-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3

2.3 PM6

O produto da análise feita pela abordagem PM6 serve para ratificar os outros resultados obtidos anteriormente e respaldar algumas tendências observáveis quando do processo de complexação. No que diz respeito a questão dos orbitais localizados em fragmentos do inibidor, pela Tabela 6 nota-se que, de maneira análoga à metodologia AM1, foram encontrados somente 20% no BTCI. Juntamente com as outras duas conclusões obtidas neste sentido, há necessidade de se buscar um outro tratamento que permita uma melhor distribuição dos orbitais de fronteira e seus vizinhos para propiciar uma distribuição mais igualitária do mesmo.

Tabela 6. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos do complexo BTCI-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-5.972	Cys ⁴²	Tripsina
HOMO -3	-5.844	Cys ¹⁸²	Tripsina
HOMO -2	-5.82	Cys ⁴⁶	BTCI
HOMO -1	-5.667	Cys ²²⁰	Tripsina
HOMO	-5.557	Cys ⁵⁸	Tripsina
LUMO	-4.791	Cys ⁵⁸	Tripsina
LUMO +1	-4.705	Cys ¹⁸²	Tripsina
LUMO +2	-4.674	Cys ⁶⁸	BTCI
LUMO +3	-4.585	Cys ¹⁵⁷	Tripsina
LUMO +4	-4.517	Lys ¹⁰⁹	Tripsina

Os resultados gerados pela rotina PM6 apresentaram uma certa semelhança com os fornecidos pela técnica AM1 para o BTCI no vácuo. Tal como eles, percebe-se uma tendência acentuada para a localização dos orbitais de fronteira e seus vizinhos em cisteínas. Ora, bem se sabe que a formação de ligações dissulfeto a partir destes grupos é um fator crucial para a estabilidade conformacional de uma proteína. Posicionar os orbitais de fronteira nesses fragmentos é ressaltar esta importância.

Dentre todas as metodologias utilizadas para se avaliar o BTCI complexado com a tripsina no vácuo, a PM6 foi a que menor quantificou a energia do sistema. A média das energias para esta abordagem foi -5,213 eV - menor que os -4,329 eV e -4,507 eV referentes ao AM1 e PM3 respectivamente. Este não é um decréscimo magnânimo; todavia, é o maior percebido nesta perspectiva. A amplitude dos valores energéticos representa um meio termo entre as duas outras rotinas. Aferida em 1,455 eV, está à frente do menor valor encontrado – 1,211 eV pelo PM3 – e atrás do maior valor contabilizado – 1,466 eV pelo AM1. O desvio padrão do conjunto de dados referentes à energia de cada orbital apresentou um comportamento singular: foi o maior dentre os três desta série. Avaliado em 0,603, se destacou rente os 0,569 do AM1 e os 0,532 do PM3.

Se for considerada uma comparação entre as amplitudes do conjunto das energias dos orbitais de fronteira em relação ao BTCI no vácuo e ao BTCI complexado com a tripsina, constata-se uma clara diminuição: 1,455 eV frente 2,534 eV. Logo, pode-se concluir que as três metodologias semi-empíricas utilizadas apontam para uma tendência

de homogeneização dos orbitais de fronteira mediante o processo de complexação do inibidor com a enzima a ser inibida.

Observa-se também que em 90% dos casos, eram apolares as cadeias laterais dos fragmentos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram localizados. Nessa lógica, essa foi a maior porcentagem de cadeias laterais já encontrada. Juntamente com os outros três conjuntos de dados, este resultado mostra que há uma preferência por localizar os orbitais de fronteira e seus vizinhos em resíduos apolares. Assim como o conjunto de dados anterior, este resultado representou um forte contraponto ao que foi avaliado para o BTCl no vácuo, onde 40% estiveram sob aminoácidos apolares.

A respeito da presença de anéis aromáticos na cadeia lateral dos fragmentos avaliados, houve aqui um resultado adverso em relação ao que já vinha sendo observado. Nenhum grupamento deste tipo foi detectado, o que leva a crer que outra metodologia deverá ser tida como preferencial se o intuito do cálculo for avaliar as consequências decorrentes de um π -stacking.

Diferentemente das outras duas abordagens anteriores, o método PM6 revelou um mesmo aminoácido preferencial para a localização de ambos orbitais HOMO e LUMO, a Cys⁵⁸, confirmando a tendência deste método de alocar os orbitais de fronteira e seus vizinhos em resíduos preponderantemente apolares. A diferença energética entre eles foi de 0,766 eV, a maior dentre os cálculos do complexo BTCl-tripsina. Todavia, é consideravelmente menor que todos os *gaps* encontrados tendo em vista o BTCl no vácuo. Juntamente com os resultados referentes às metodologias AM1 e PM3, observa-se uma tendência clara à homogeneização dos orbitais de fronteira mediante complexação. Pela Figura 14 a seguir, vê-se o resíduo no qual os orbitais HOMO e LUMO se dispuseram. Como ambos se dispuseram no mesmo fragmento, não foi mensurada nenhuma distância entre eles.

De uma maneira geral, o uso destas três metodologias semi-empíricas forneceu resultados diversos entre si, tanto para o BTCl no vácuo quanto para o complexo BTCl tripsina no vácuo. De fato, há sim alguns pontos que convergem entre si. Não obstante, os resíduos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram localizados divergiram para as três metodologias e para os dois sistemas. Com o intuito de se estabelecer um protocolo capaz de detectar as transformações químicas que ocorrem

durante o processo inibitório, há de se estabelecer uma abordagem que não proporcione resultados tão adversos.

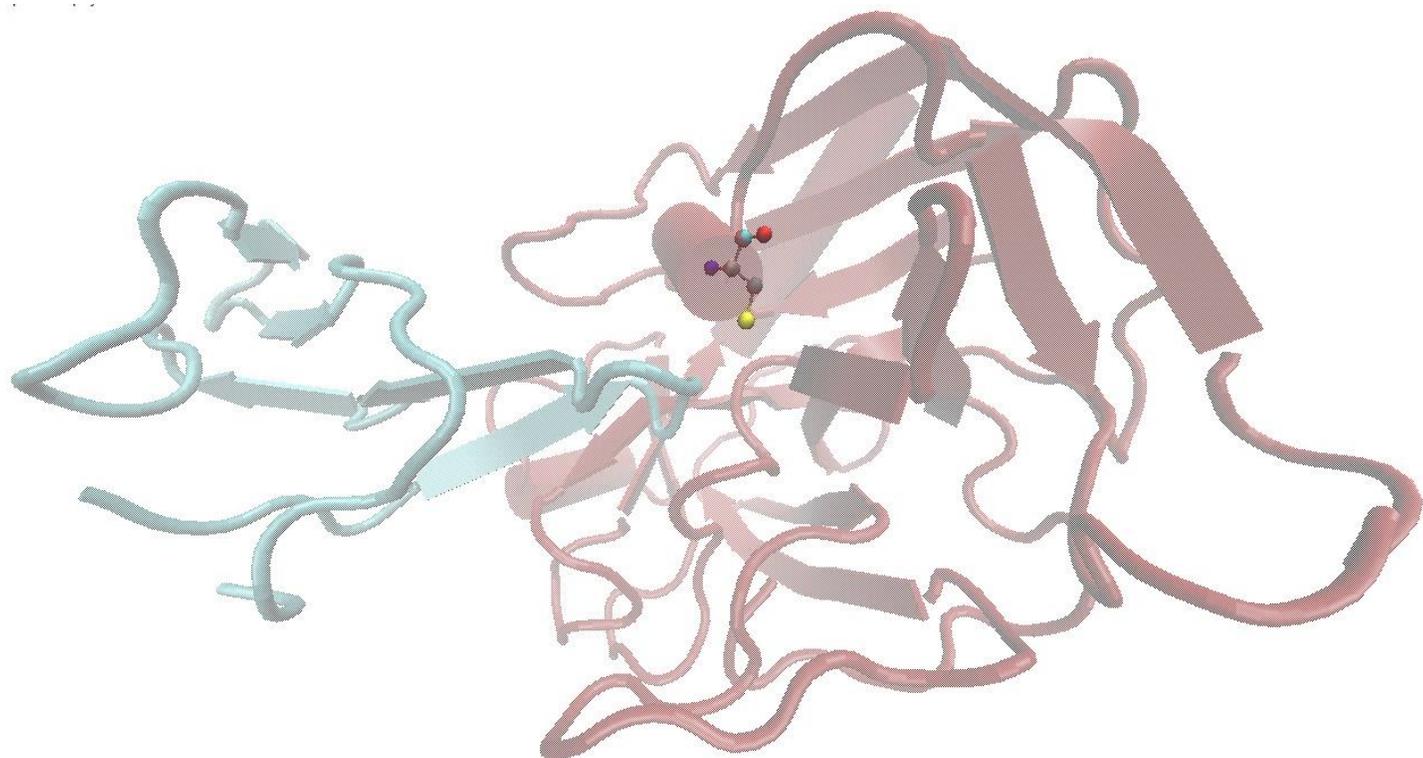


Figura 15. Resíduo contido nos orbitais HOMO e LUMO do complexo BTCl-tripsina no vácuo, pelo método PM6

3 Propriedades de estrutura eletrônica da interface BTCl-Tripsina no vácuo

Na busca de um modelo a ser utilizado pelos diversos métodos semi-empíricos até aqui abordados, se almeja obter resultados compatíveis e não tão discrepantes entre si. Esta seção traz consigo alguns produtos deste esforço. Como se poderá perceber, o cálculo realizado na interface foi o que melhor alcançou os objetivos supracitados.

3.1 AM1

O uso do protocolo AM1 representou um avanço no que diz respeito à distribuição dos orbitais de fronteira e seus vizinhos ao longo do inibidor e da enzima a ser inibida. Ao se comparar com o que foi observado anteriormente, esta alocação foi realizada de maneira mais equânime. Como se nota pela Tabela 7, abaixo, no BTCl foram localizados 40% dos orbitais detectados. Face os 20, 10 e 20% referentes ao complexo BTCl-tripsina computados pelos métodos AM1, PM3 e PM6, respectivamente, é notório o melhoramento dessa alocação. Este resultado é interessante pelo fato de representar um sistema que, acoplado à uma metodologia adequada, permite um estudo representativo de ambas proteínas.

Tabela 7. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCl-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método AM1

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-4,910	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO -3	-4,638	Cys ⁴²	Tripsina
HOMO -2	-4,293	Cys ²²⁰	Tripsina
HOMO -1	-4,142	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO	-3,742	Cys ⁴²	Tripsina
LUMO	-2,877	Cys ²²	BTCl
LUMO +1	-2,237	Cys ¹⁹¹	Tripsina
LUMO +2	-1,770	Arg ²¹	BTCl
LUMO +3	-1,413	Arg ²¹	BTCl
LUMO +4	-0.615	Arg ³³	BTCl

Como se pode perceber pela tabela acima, há uma preferência de ocupação por parte da tripsina pelos orbitais de energia mais baixa. Por sua vez, o BTCl expressa uma clara propensão aos orbitais mais energéticos, haja vista que nenhum dos orbitais do grupo HOMO foi alocado em resíduos pertencentes a este inibidor.

No caso de uma análise referente à amplitude do conjunto de energias dos orbitais de fronteira e seus vizinhos, constata-se uma discrepância em relação a todos os resultados já observados. O encontrado valor para o cálculo em questão foi 4,295 eV, o

qual é consideravelmente maior que o valor mais elevado já computado por todas as metodologias e sistemas até aqui utilizados – 2,885 eV referente ao BTCI no vácuo avaliado pelo método PM3. Entretanto, este resultado não pode ser interpretado isoladamente. Há de se notar que a média das energias dos orbitais de fronteira e seus vizinhos foi a maior já detectada: -3,004 eV. Percebe-se que a rotina AM1 superestima os valores referentes às energias, fato este corroborado pelo elevadíssimo desvio padrão deste conjunto de dados: 2,486. Este também é o maior valor já detectado para esta propriedade.

Quanto a questão da polaridade das cadeias laterais, em 70% dos fragmentos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram alocados, as cadeias laterais são apolares. Não obstante, interessante foi o fato destes 70% corresponderem à cisteínas. Este resultado vai de encontro ao que foi obtido pelo método AM1 para o BTCI no vácuo. Também lá, 70% dos orbitais de fronteira e seus vizinhos foram alocados em cisteínas, fortalecendo mais uma vez a importância destes aminoácidos para as proteínas em questão.

Se pela rotina AM1 as cisteínas tiveram sua importância realçada, os fragmentos aromáticos foram completamente ignorados: nenhum deles foi detectado. Em contrapartida, resíduos derivados de arginina foram realçados, a julgar pelos outros fragmentos ocupados pelos orbitais de fronteira e seus vizinhos, os quais são, em sua totalidade, oriundos de tal aminoácido. Esses resíduos foram os responsáveis pela elevação do fator polar em relação ao que foi visto para o cálculo do BTCI no vácuo avaliado pelo método AM1. Lá, 20% dos fragmentos eram polares; aqui, 30%.

Se forem comparados os orbitais de fronteira da *interface* com os referentes ao complexo BTCI-tripsina, emerge aí uma importante diferença: o HOMO e o LUMO não foram dispostos na mesma proteína. O orbital de fronteira de menor energia foi a Cys⁴², pertencente à tripsina; enquanto o de maior energia foi a Cys²², presente no BTCI. Este resultado evidencia ainda mais a tendência que foi exposta anteriormente: há uma nítida preferência, por parte do BTCI, pelos orbitais mais energéticos; enquanto a tripsina exhibe propensão por orbitais de energia inferior. A dissemelhança energética entre os orbitais HOMO e LUMO foi da ordem de 0,865 eV. Mesmo as energias do conjunto dos orbitais avaliados serem superestimadas, esse *gap* energético é um valor intermediário entre o

que foi observado para o BTCI no vácuo – onde os valores foram de 1,175 a 1,178 – e para o complexo BTCI-tripsina – onde os valores foram de 0,308 a 0,766. A distância entre os orbitais de fronteira foi de 20,17 Å, como pode ser constatado pela Figura 15. É importante salientar que a Cys⁴² se encontra literalmente na *interface* formada pelo inibidor e pela enzima a ser inibida, o que pode indicar uma propensão a realização de interações covalentes.

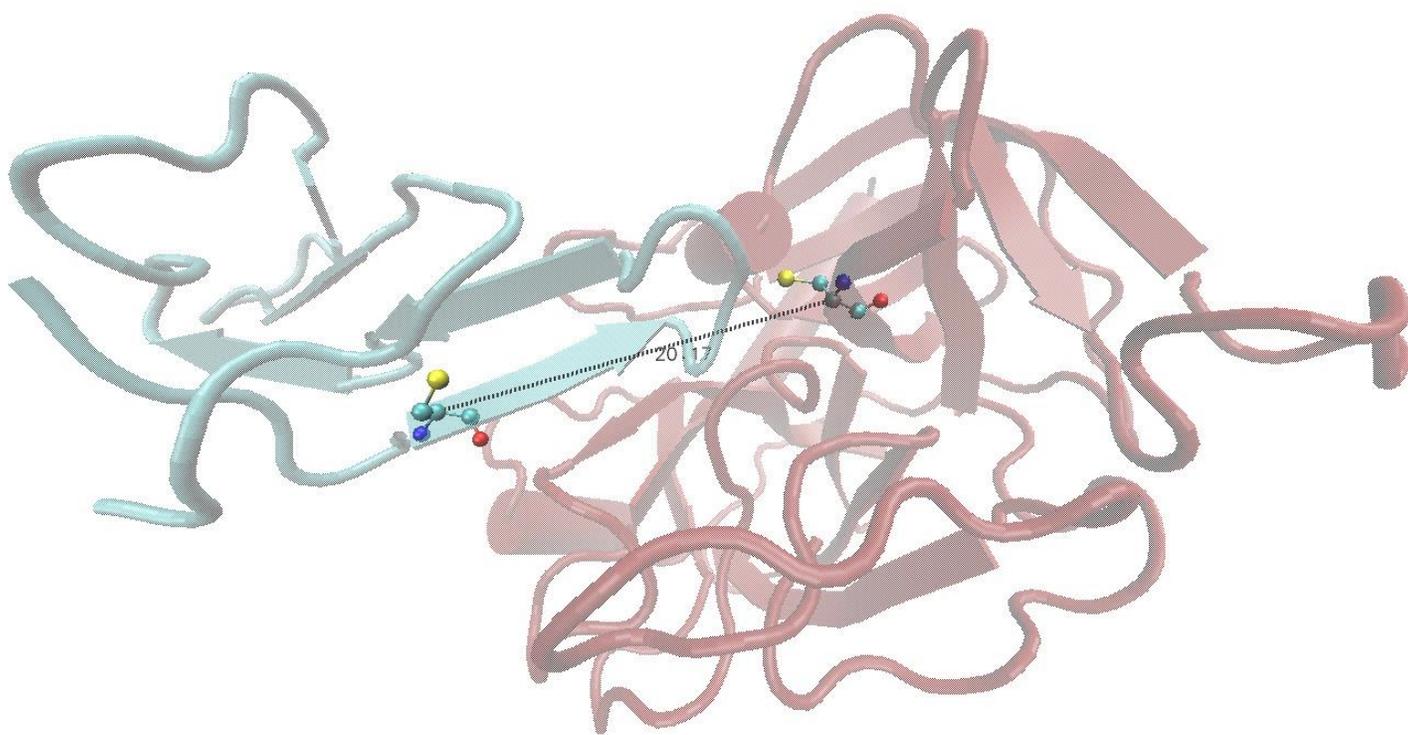


Figura 16. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface BTCI-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método AM1

3.2 PM3

No que diz respeito à distribuição dos orbitais de fronteira e seus vizinhos nos resíduos de ambas proteínas, percebe-se que a metodologia aqui utilizada adota a mesma tendência revelada na rotina anterior, como se pode perceber pela Tabela 8, logo abaixo. No inibidor, foram alocados 40% dos orbitais computados; enquanto na enzima a ser inibida, 60%. Estes dados corroboram a tendência já observada de, para um sistema mais reduzido, referente à *interface* na qual ocorre o processo inibitório, distribuir os orbitais de fronteira e seus vizinhos de maneira mais igualitária entre o BTCI e a tripsina.

Tabela 8. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCI-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM3

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-4,899	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO -3	-4,382	Cys ⁴²	Tripsina
HOMO -2	-4,306	Cys ²²⁰	Tripsina
HOMO -1	-4,174	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO	-3,752	Cys ⁴²	Tripsina
LUMO	-3,023	Cys ²²	BTCI
LUMO +1	-2,293	Cys ¹⁹¹	Tripsina
LUMO +2	-2,266	Arg ²¹	BTCI
LUMO +3	-2,117	Arg ²¹	BTCI
LUMO +4	-1,192	Arg ²¹	BTCI

A Tabela 8 revela um fato muito interessante. Se for comparada com a Tabela 7, analisando tão somente a alocação dos orbitais de fronteira e seus vizinhos, constata-se uma semelhança de 90%. Houve divergência apenas no orbital LUMO +4. Outra importante correspondência a ser notada é a igual tendência de ocupação dos orbitais mais energéticos pelo BTCI e dos menos energéticos pela tripsina. De certo modo, a metodologia PM3 consolida a inclinação dos orbitais LUMO se disporem no fragmento Arg²¹. De fato, para o protocolo AM1, 40% dos orbitais LUMO foram dispostos nesse fragmento. Em contrapartida, a rotina PM6 alocou 60% dos orbitais LUMO na mesma

Arg²¹. Tal aumento, juntamente com o fato desse fragmento ser adjacente ao resíduo no qual o orbital LUMO foi disposto, pode indicar uma propensão desta região a estabelecer interações covalentes.

O conjunto de dados referente às energias dos orbitais de fronteira e seus vizinhos confirma e acentua o que outrora fora evidenciado pela metodologia AM1, utilizada anteriormente. A média dos valores das energias foi ainda maior: 3,24 eV. Há então a mesma propensão a superestimar as energias destes orbitais, a julgar por não haver em nenhum dos sistemas e em nenhuma das metodologias até aqui utilizadas, média tão alta quanto. Contudo, a amplitude deste conjunto de dados foi menor do que a encontrada na seção anterior. Avaliada em 3,707 eV, indica uma maior coesão entre as energias dos vários orbitais computados. Esta interpretação é secundada pelo valor do desvio padrão deste grupo de dados. Mensurado em 1,233, aponta para uma melhor representação dos orbitais de fronteira e seus vizinhos em uma comparação direta com a metodologia anterior.

No que se refere à polaridade das cadeias laterais, também aqui houve identidade com os resultados da *interface* fornecidos pela rotina AM1. Resíduos apolares corresponderam a 70% de todos os detectados. Todavia, há uma diferença na análise. Se com o uso da técnica AM1 os resultados para o BTCl no vácuo e para o BTCl complexado se equivaleram, para a metodologia PM3 ocorreu o oposto. O cálculo com esta técnica para o inibidor no vácuo revelou que apenas 10% dos fragmentos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos se alocaram eram apolares. Houve então uma divergência na comparação direta entre os sistemas.

De maneira análoga à seção anterior, igualmente foram ignorados fragmentos com grupos aromáticos. A sua total não detecção evidenciou ainda mais as cisteínas como fator essencial às propriedades físico-químicas das proteínas em questão por meio do estabelecimento de ligações dissulfeto. Mais especificamente para o BTCl, a Cys²² destaca-se em meio aos outros 13 resíduos derivados de cisteínas. Por estar localizada no domínio responsável pela ancoragem com a tripsina, sua simples detecção pela metodologia AM1 e PM3 pode indicar uma maior propensão desta região face a outra.

Na tentativa de se traçar um paralelo com a abordagem da seção anterior, percebe-se que a alocação dos orbitais HOMO e LUMO se deu nos mesmos resíduos. Este, na

Cys²²; enquanto aquele, na Cys⁴². De maneira idêntica, tal fato explicita a tendência de o BTCl ocupar os orbitais mais energéticos, enquanto a tripsina, os de energia inferior. Idêntica também não poderia deixar de ser a distância entre os orbitais de fronteira: 20,17 Å, como pode ser observado na Figura 16. A diferenciação energética foi da ordem de 0,729 eV, valor semelhante ao aferido para a metodologia anterior. Todos estes dados indicam uma elevada compatibilidade entre as rotinas AM1 e PM3 para o caso da *interface* entre o inibidor e a enzima a ser inibida. Esse é um aspecto muito relevante, pois mostra que o sistema adotado gera resultados não discrepantes quando analisado sob a ótica de metodologias semi-empíricas.

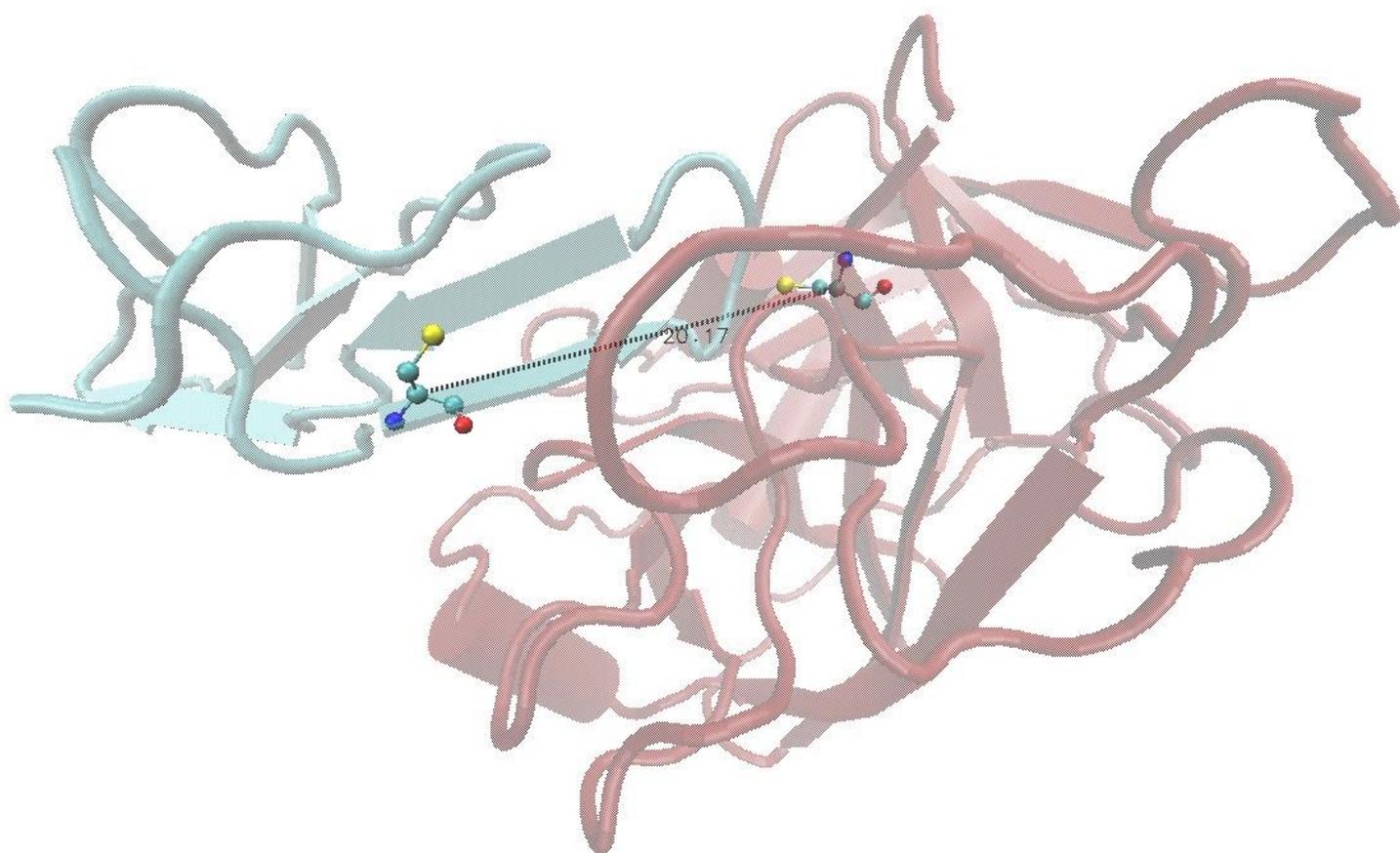


Figura 17. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface BTCl-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM3

3.3 PM6

A distribuição dos orbitais de fronteira e seus vizinhos acompanhou a tendência que já vinha sido observada anteriormente. De fato, o sistema formado pela *interface* entre o inibidor e a enzima a ser inibida aloca, nessas proteínas, os orbitais de maneira mais equânime. Contudo, se for comparado com modelo criado a partir do BTCI complexado com a tripsina, essa distribuição não foi tão destoante. Aqui, 30% dos orbitais computados foram localizados no BTCI como pode ser contatado pela Tabela 9, logo abaixo. O maior resultado para o complexo BTCI-tripsina foi 20%, referente às metodologias AM1 e PM6.

Tabela 9. Principais contribuições dos resíduos de aminoácidos da interface BTCI-tripsina no vácuo e as respectivas energias dos orbitais de fronteira, avaliados pelo método PM6

Orbital	Energia (eV)	Resíduo	Proteína
HOMO -4	-5.283	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO -3	-5.084	Cys ²²⁰	Tripsina
HOMO -2	-5.022	Cys ⁵⁸	Tripsina
HOMO -1	-4.619	Cys ⁴²	Tripsina
HOMO	-4.488	Cys ⁴²	Tripsina
LUMO	-3.602	Cys ²²	BTCI
LUMO +1	-2.986	Cys ¹⁹¹	Tripsina
LUMO +2	-2.311	Cys ²²	BTCI
LUMO +3	-1.781	Cys ²²	BTCI
LUMO +4	-1.234	Asn ⁹⁷	Tripsina

Os dados apresentados nessa tabela revelaram um resultado de elevada importância. Os resíduos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram alocados coincidiram nas três metodologias utilizadas para a avaliação da *interface* formada pelo BTCI e pela tripsina - com exceção do Asn⁹⁷, detectado somente nos resultados desta seção. Concomitantemente, também é notória a ratificação da tendência de a tripsina hospedar os orbitais menos energéticos – muito embora dois orbitais do grupo LUMO foram nela localizados. O BTCI também não se desviou do comportamento exibido outrora e alocou nele os orbitais de energia superior.

Na análise do conjunto correspondente às energias dos orbitais de fronteira e seus vizinhos, a metodologia PM6 representou um meio termo entre o que foi observado nas rotinas AM1 e PM3. Bem é verdade que a média das energias, avaliada em -3,641 eV, foi a maior para esta série de dados, explicitando a predisposição que os métodos semi-empíricos apresentam de superestimar as energias dos orbitais em questão. No entanto, a amplitude deste conjunto, mensurada em 4,049 eV, ficou entre a encontrada por meio das abordagens AM1 e PM6 – valores estes, 4,295 eV e 3,707 eV respectivamente. Mesmo elevando a energia dos orbitais de fronteira e seus vizinhos, também aqui é observada certa semelhança nesses valores, haja vista que o desvio padrão desse conjunto não foi tão alto quanto o aferido para a metodologia AM1: 1,484 face os 2,486.

No que diz respeito à polaridade das cadeias laterais dos resíduos nos quais os orbitais de fronteira e seus vizinhos foram alocados, também aqui 90% delas foram apolares. A análise desta propriedade vai de encontro com as outras duas técnicas já utilizadas, corroborando a aptidão que os métodos semi-empíricos apresentam de alocar os orbitais em fragmentos preponderantemente apolares. Porém, se comparado com os resultados do BTCl no vácuo, a resposta fornecida pelo BTCl divergiu, pois lá, somente 40% dos fragmentos possuíam cadeia lateral apolar.

De modo análogo ao que já foi constatado nas duas outras seções anteriores, também aqui os resíduos contendo fragmentos aromáticos foram completamente ignorados. Não obstante, as cisteínas corresponderam a 90% de todos os fragmentos avaliados. Este é o maior índice já encontrado e acentua ainda mais a dimensão que esses aminoácidos têm para as propriedades físico-químicas do BTCl e da tripsina. Pode-se destacar mais uma novamente a Cys⁴², detectada 2 vezes; além da Cys²², detectada 3 vezes. Estas reiteraões podem ser indícios da elevada importância desses resíduos para ambas proteínas.

Por fim, a ocupação dos orbitais de fronteira expressou um resultado que muito acrescenta à regularidade dos métodos semi-empíricos para o estudo da *interface* formada pelo inibidor e pela enzima a ser inibida. Tal-qualmente às abordagens AM1 e PM3, a abordagem PM6 alocou os orbitais HOMO e LUMO nos resíduos Cys⁴² e Cys²², respectivamente. Também aqui é reafirmada a disposição de o BTCl ocupar o orbital LUMO, concomitantemente à ocupação do orbital LUMO por fragmentos provenientes da

tripsina. A diferença energética entre estes dois orbitais de fronteira foi de 0,886 eV. A distância entre eles obviamente não divergiu do resultado obtido nas duas seções anteriores: 20,17 Å, como se nota por meio da Figura 17.

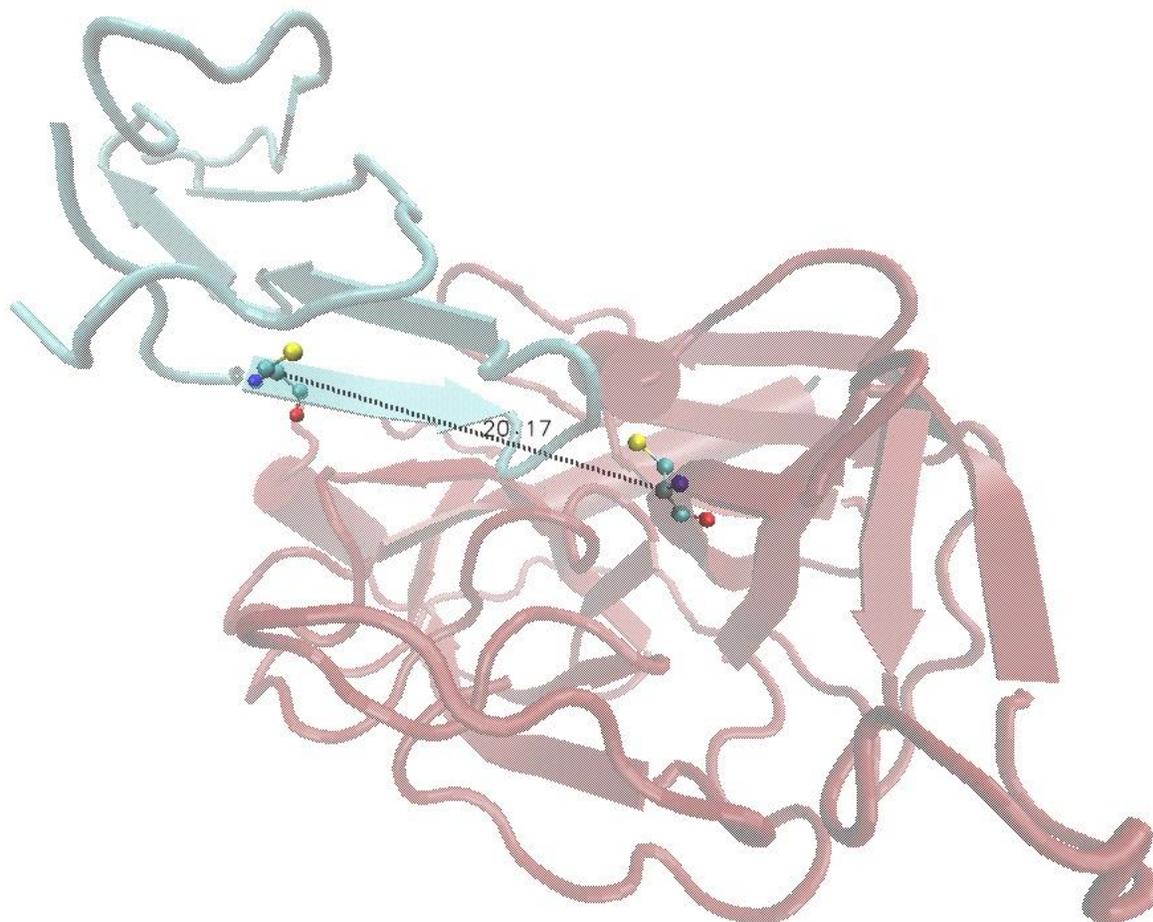


Figura 18. Resíduos contidos nos orbitais HOMO e LUMO da interface BTCl-tripsina no vácuo e sua respectiva distância, avaliada pelo método PM6

Conclui-se então que o emprego das três metodologias semi-empíricas escolhidas proporciona resultados compatíveis entre si. Há de se salientar que existem pontos de divergência dentro das três seções abordadas para a *interface* estabelecida entre o

inibidor e a enzima a ser inibida. Todavia, estes pontos são pormenores que não ofuscam o fato de as propriedades dos orbitais de fronteira e seus vizinhos convergirem. O sistema aqui investigado pode servir de base para estudos mais pormenorizados dos fenômenos que ocorrem quando da ancoragem do BTC1 com a tripsina.

4 Análise das ligações dissulfeto

Com o intuito de se avaliar a contribuição de cada ligação dissulfeto para a estabilidade conformacional do BTC1, nomeou-se cada uma de acordo com a Tabela 10, abaixo.

Tabela 10. Nomenclatura atribuída às ligações dissulfeto

Orbital	Resíduos
M1	Cys ²² e Cys ⁶⁸
M2	Cys ²⁴ e Cys ³²
M3	Cys ⁵¹ e Cys ⁵⁹
M4	Cys ³⁴ e Cys ¹⁹
M5	Cys ⁴⁹ e Cys ⁴²
M6	Cys ⁶¹ e Cys ⁴⁶
M7	Cys ¹⁸ e Cys ⁷²

Essas ligações são evidenciadas em seus respectivos subdomínios na Figura 17 a seguir, extraída de Barbosa *et al.*¹

As Tabelas 11, 12 e 13, logo a seguir, exibem os resultados encontrados por meio do uso das metodologias AM1, PM3 e PM6, respectivamente, em ordem crescente. Nelas, o domínio diz respeito à sua localização na estrutura do BTC1 no tocante à parte que pode ser ligar à tripsina ou à quimotripsina. A estrutura secundária indica quais formas são conectadas por meio do estabelecimento da ligação dissulfeto.

Tabela 12. Fator energético referente a cada ligação dissulfeto avaliado pelo método PM3

Ligação	Energia (kJ/mol)	Domínio	Estrutura Secundária
M1	-656.161	Tripsina	Fita a um <i>loop</i>
M7	-651.093	Terminal	<i>Loops</i> terminais
M2	-640.814	Tripsina	Fitas de uma β - <i>hairpin</i>
M3	-635.792	Quimotripsina	Fitas de uma β - <i>hairpin</i>
M5	-624.072	Quimotripsina	Fita a um <i>loop</i>
M4	-594.840	Tripsina	Fita a um <i>loop</i>
M6	-587.352	Quimotripsina	Fita a um <i>loop</i>

Tabela 13. Fator energético referente a cada ligação dissulfeto avaliado pelo método PM6

Ligação	Energia (kJ/mol)	Domínio	Estrutura Secundária
M2	-367.859	Tripsina	Fitas de uma β - <i>hairpin</i>
M7	-366.722	Terminal	<i>Loops</i> terminais
M3	-363.959	Quimotripsina	Fitas de uma β - <i>hairpin</i>
M1	-359.041	Tripsina	Fita a um <i>loop</i>
M4	-357.966	Tripsina	Fita a um <i>loop</i>
M5	-356.554	Quimotripsina	Fita a um <i>loop</i>
M6	-342.271	Quimotripsina	Fita a um <i>loop</i>

Os métodos semi-empíricos em questão não foram capazes de apontar um resultado consensual no que diz respeito ao domínio que mais se abala com a perda de uma ligação dissulfeto. Pela avaliação do domínio referente as três menores energias, a técnica AM1 indicou majoritariamente o domínio responsável pela ligação com a quimotripsina como sendo o mais afetado; enquanto a rotina PM3, a tripsina. A metodologia PM6 representa um meio termo entre estes dois extremos, tendo em vista que tanto a tripsina quanto a quimotripsina foram aí constatadas.

De maneira semelhante, também não foi possível encontrar consonância sobre os efeitos da ausência de ligações dissulfeto para as estruturas secundárias. As técnicas AM1 e PM3 mostraram que as ligações de maior impacto energético ligavam uma fita a um loop e fitas de uma mesma β -*hairpin*. Já a rotina PM6 indicou majoritariamente as fitas de uma mesma β -*hairpin*. Pode-se afirmar que as metodologias AM1 e PM3 expressaram certa concordância. Contudo, este fato tem sua importância atenuada tendo em vista que

estas metodologias foram as que mais superestimaram os valores de energia, a qual corresponde à energia de uma ligação dissulfeto, avaliada em aproximadamente 251 kJ/mol.

Houveram alguns pontos de convergência que merecem ser discutidos. As ligações M6 e M4 possuíram, nas três abordagens utilizadas, as menores energias de ligação. Não obstante, para todos os cálculos realizados, as três ligações de menor impacto energético ligavam uma fita a um *loop*. Por fim, há de se citar que a ligação dissulfeto existente nas proximidades dos terminais do BTCI foi, por todas as metodologias adotadas, tida como uma das mais fortes.

Parte V

Conclusões

O estudo do BTCl no vácuo revelou que os orbitais de fronteira e seus vizinhos, de acordo com a metodologia AM1, se localizam preferencialmente em resíduos cujas cadeias laterais são apolares. As técnicas PM3 e PM6 divergiram neste sentido, apontando que a posição preferencial é em fragmentos cujas cadeias laterais são polares. Já para o sistema formado pelo complexo BTCl-tripsina, os resultados foram unânimes e apontaram majoritariamente para os resíduos apolares, muito embora a porcentagem deles tenha variado consideravelmente em uma comparação entre os diferentes métodos. Os resultados referentes a *interface* formada pelo inibidor e pela enzima a ser inibida foram de encontro ao que foi observado para o complexo BTCl-tripsina. Todavia, a variação das porcentagens foi ligeiramente melhor.

Quanto à análise da distribuição dos orbitais de fronteira e seus vizinhos entre as duas proteínas, o sistema formado pelo BTCl e pela tripsina não gerou resultados satisfatórios. Dentro desse contexto, estes orbitais foram distribuídos quase que exclusivamente na tripsina. Este não é um fato desejável, pois acarretaria em dificuldade de se observar propriedades de estrutura eletrônica na parte referente ao BTCl. Contudo, observou-se uma distribuição mais igualitária para a *interface*. Por sinal, esse foi o único sistema no qual os orbitais de fronteira foram alocados nos mesmos fragmentos: Cys⁴² e Cys²² respectivamente. A Cys²² provavelmente mantém a conformação da *interface* durante o processo de ancoragem. Todos esses resultados mostram que a *interface* gerada pode ser um modelo adequado para um estudo futuro - a partir das metodologias AM1, PM3 e PM6 - dos fenômenos que aí ocorrem mediante o processo de complexação, e que a ligação entre a Cys²² e a Cys⁶⁸ é de elevada importância para uma futura síntese de peptídeos derivados do BTCl.

O estudo das energias das ligações dissulfeto não forneceu resultados expressivos. Os métodos não foram consensuais quanto à expressão da prevalência de um conjunto de ligações. No entanto, todas as técnicas apontaram as ligações entre a

Cys³⁴ e Cys¹⁹ e entre a Cys⁶¹ e Cys⁴⁶ como sendo as de menor energia; e a ligação entre a Cys¹⁸ e Cys⁷² como sendo uma de energia elevada.

Bibliografia

- 1) G Barbosa, J. A. R. G., Silva, L. P., Teles, R. C. L., Esteves, G. F., Azevedo, R. B., Ventura, M. M., & de Freitas, S. M. (2007). Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with β -Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. *Biophysical Journal* 92:1638–1650.
- 2) Silva, Luciano Paulino da ; Leite, José Roberto de Souza A. ; Bloch Junior, Carlos ; Freitas, S. M. (2001). Stability of a Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor (BTCI). *Protein and Peptide Letters* 8:33-38.
- 3) Freitas, S. M., H. Ikemoto, and M. M. Ventura. (1999). Thermodynamics of the binding of chymotrypsin with the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor (BTCI). *J. Protein Chem.* 18:307–313.
- 4) Gaier, J. R., A. Tulinsky, and I. E. Liener. (1981). Formation, crystallization, and preliminary crystallographic data of the ternary complex of a chymotrypsin, b-trypsin, and the Bowman-Birk inhibitor. *J. Biol. Chem.* 256:11417–11419.
- 5) Odani, S. & Ikenaka, T. (1973). Scission of soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor into two small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 74:857-860.
- 6) Catalano, M., L. Ragona, H. Molinari, A. Tava, and L. Zetta. (2003). Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): solution structure and analysis of selfassociation behavior. *Biochemistry* 42:2836–2846.
- 7) Silva, L. P., R. B. Azevedo, P. C. Morais, M. M. Ventura, and S. M. de Freitas. (2005). Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Prot. Struct. Funct. Bioinform.* 61:642–648.
- 8) Burley, S. K., and G. A. Petsko. (1985). Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* 229:23–28.
- 9) Ventura, M. M., C. O. Martin, and L. Morhy. (1975). A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vigna sinensis* L.). VI. Isolation and properties of complexes with trypsin and chymotrypsin. *An. Acad. Bras. Cienc.* 47:335–346.
- 10) Natalia D, Vidilaseris K, Ismaya WT, Puspasari F, Prawira I, Hasan K, Fibriansah G, Permentier HP, Nurachman Z, Subroto T, Dijkstra BW, Soemitro S. (2015). Effect of introducing a disulphide bond between the A and C domains on the activity and stability of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase. *J Biotechnol* 195:8-14.
- 11) Betz, S. F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science* 2:1551–1558.
- 12) Srinivasan N, Sowdhamini R, Ramakrishnan C, Balaram P. (1990). Conformations of disulfide bridges in proteins. *Int J Peptide Protein Res* 36:147–155.
- 13) Katz B, Kossiakoff AA. (1990). Crystal structures of subtilisin BPN' variants containing disulfide bonds and cavities: concerted structural rearrangements induced by mutagenesis. *Proteins* 7:343–357.
- 14) Richardson, J.S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167–339.

- 15)** William J. Wedemeyer, Ervin Welker, Mahesh Narayan, and, and Harold A. Scheraga. (2000). Disulfide Bonds and Protein Folding. *Biochemistry* 39:4207-4216.
- 16)** Vogt, G., Woell, S., and Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.* 269:631–643.
- 17)** Werner MH, Wemmer DE: (1992). Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. *Biochemistry* 31:999-1010.
- 18)** Stickle DF, Presta LG, Dill KA, Rose GD. (1992). Hydrogen bonding in globular proteins. *J Mol Biol.* 226:1143–59.
- 19)** C. Ceccarelli, G.A. Jeffrey, R. Taylor. (1980). A survey of O-H...O hydrogen bond geometries determined by neutron diffraction. *J. Mol. Struct.* 70:255-271.
- 20)** R. Taylor, O. Kennard, W. Versichel. (1983). Geometry of the imino-carbonyl (N-H...O:C) hydrogen bond. 1. Lone-pair directionality. *J. Am. Chem. Soc.* 105:5761-5766.
- 21)** Jeffrey, G. A. & Saenger, W. (1991). Hydrogen Bonding in Biological Structures, *Springer-Verlag*, New York.
- 22)** Li L. Duan, Ya Gao, Chang G. Ji, Ye Mei, Qing G. Zhang, Bo Tang, John Z. H. Zhang. (2014). Energetics of protein backbone hydrogen bonds and their local electrostatic environment. *Science China Chemistry* 57:1708-1715.
- 23)** Gao, J., Bosco, D. A., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2009). Localized Thermodynamic Coupling between Hydrogen Bonding and Microenvironment Polarity Substantially Stabilizes Proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:684–690.
- 24)** Ventura, M. M., K. Mizuta, and H. Ikemoto. (1984). Solvent perturbation and surface accessibility of the tryptophyl and tyrosyl groups in black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor. *An. Acad. Brasil. Ciênc.* 56:217–220.
- 25)** Souza L. C., Camargo, R., Demasi, M., SÁ, Cezar Martins de., Freitas, S.M. (2014). Effects of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Protease Inhibitor on Purified 20S Proteasome and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Plos One* 9:e86600.
- 26)** Alice da Cunha Morales Álvares, Elisabeth Schwartz, Nathalia Amaral, Neidiane Trindade, Gustavo Pedrino ; Luciano Silva, Sônia de Freitas. (2014). Bowman-Birk Protease Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds Enhances the Action of Bradykinin-Related Peptides. *Molecules* 19:17536-17558.
- 27)** Ho, VS; Ng, TB. (2008). A Bowman-Birk trypsin inhibitor with antiproliferative activity from Hokkaido large black soybeans. *J PeptSci* 14(3):278-82.
- 28)** Ventura, M.M., Xavier-Filho, J. (1966) A trypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (*Vignasinensis*). I. Purification and partial characterization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 38: 553-566.