

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS VIBRACIONAIS  
AO ESTUDO CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS

Elizabeth P. G. Arêas e Yoshio Kawano

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química da Universidade de São Paulo (C. Postal 20780, CEP 14098, São Paulo – SP – Brasil).

Recebido em 30/09/90

This work describes the basic applications of vibrational (Raman and infrared) techniques to structural studies on proteins. The main polypeptide amide modes, sidechain vibrations and low frequency features are presented, together with some of the most usually employed methods for the estimation of protein secondary structures. Experimental results on protein systems obtained by the authors illustrate the kind of information that can be gained through the use of such techniques.

## 1. INTRODUÇÃO

A elucidação de funções biológicas, em termos de estrutura molecular, constitui uma questão de grande relevância na pesquisa contemporânea em Bioquímica. Nesse contexto, o conhecimento relativo da estrutura de biomacromoléculas reveste-se de particular interesse, visto que esses compostos em geral estão envolvidos em diversos aspectos ligados à funcionalidade de sistemas vivos.

Na categoria dos biopolímeros, as proteínas constituem um dos grupos mais estudados, devido à sua reconhecida importância quer do ponto de vista estrutural, quer funcional em bio-sistemas. Proteínas constituem elementos-chave em muitos fenômenos biologicamente críticos, tais como transporte, conversão de energia, catálise enzimática, especificidade imunológica, para muitos dos quais um conhecimento ainda insuficiente é disponível.

No contexto químico, as moléculas protéicas caracterizam-se por apresentar estrutura polimérica resultante da combinação entre vinte diferentes monômeros (aminoácidos) a qual gera dessa forma moléculas muito diversificadas estruturalmente quando comparadas aos polímeros sintéticos e, mesmo, aos demais polímeros biológicos. Aspectos da estrutura tridimensional são desse modo muito peculiares, assumindo muitas vezes papel crítico no que se refere à função biológica dessas moléculas.

Apesar da evidente complexidade de tais compostos, no entanto, é possível racionalizar muitas de suas propriedades biológicas a partir da compreensão dos princípios que sustentam sua organização estrutural. Nesse aspecto, a utilização de técnicas espectroscópicas, desenvolvidas ao longo das últimas décadas, tem se mostrado de grande valia. A potencialidade de tais recursos permite que se busquem caminhos para o conhecimento das interrelações estrutura-função em proteínas, o que constitui na verdade a finalidade última da pesquisa estrutural nesses biopolímeros.

Este trabalho mostra a utilização de métodos espectroscópicos vibracionais (Raman e infravermelho) no estudo conformacional de proteínas. Informações obtidas por técnicas vibracionais permitem que se conheçam aspectos relativos à estrutura secundária do esqueleto polipeptídico e que se investiguem os microambientes das cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos como tirosina, triptofano, metionina, bem como características geométricas de algumas ligações de

interesse, como pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína<sup>1-3</sup>. Informações obtidas por técnicas vibracionais podem, desse modo, concorrer com dados obtidos por outros métodos de investigação estrutural na elucidação de questões conformacionais de interesse nesses compostos.

## 2. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS VIBRACIONAIS

A espectroscopia vibracional relaciona-se com a investigação dos níveis energéticos ligados aos movimentos vibracionais dos núcleos dos átomos constituintes da molécula. Constituem técnicas vibracionais a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectroscopia de espalhamento Raman<sup>3</sup>.

A primeira constitui-se em um processo de ressonância que ocorre quando um componente da radiação eletromagnética incidente tem frequência idêntica àquela relativa a uma transição entre dois níveis vibracionais. Nessa situação, resulta absorção de energia, cuja frequência se situa na região infravermelha do espectro eletromagnético.

Na segunda, o fenômeno físico envolvido é o de espalhamento de luz. Colisões inelásticas entre fótons de luz incidente e moléculas da substância irradiada fazem com que as energias dos fótons espalhados sejam aumentadas ou diminuídas em relação aos fótons incidentes por valores quantizados que correspondem a diferenças de energia nos níveis vibracionais e rotacionais da molécula. Esse efeito foi experimentalmente demonstrado pela primeira vez em 1928 por Raman e Krishan<sup>5</sup>, embora já fosse previsto teoricamente desde 1923, por Smekal<sup>6</sup>.

Ambos os tipos de espectroscopia – de absorção no infravermelho e de espalhamento Raman – fornecem, portanto, informações sobre transições entre os níveis de energia vibracionais da molécula, embora os fenômenos físicos envolvidos em cada uma delas sejam distintos, conforme exposto.

Para que um modo vibracional apresente atividade no infravermelho é necessário que da interação entre a radiação eletromagnética e a molécula resulte uma mudança no momento de dipolo elétrico ( $\mu$ ) da mesma durante a vibração. No Raman, a condição é que da interação resulte mudança na polarizabilidade da molécula ( $\alpha$ ); isto permite que ligações homopolares, inativas no infravermelho, possam ser aqui detectáveis.

O fenômeno vibracional é descrito, sob o ponto de vista clássico, através do modelo do oscilador harmônico<sup>4</sup>. Esse tratamento conduz à seguinte solução para o valor de frequência para uma molécula diatômica:

$$\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{k/\mu}$$

onde  $\mu$  = massa reduzida =  $m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$ ;  $k$  = cte. de força

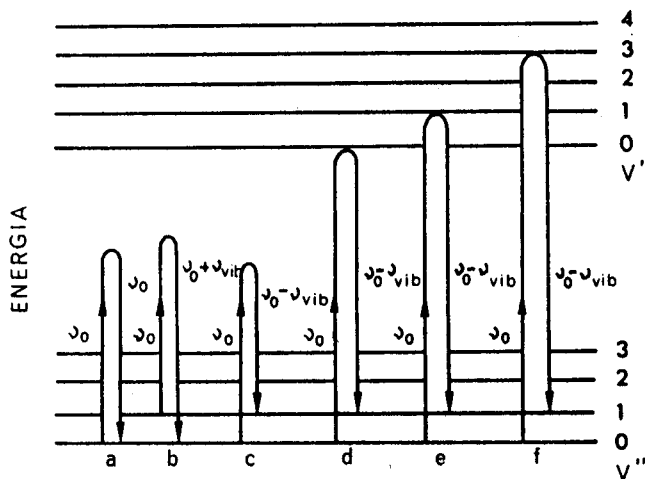


Figura 1. Algumas das possíveis conseqüências da interação fóton-molécula: a) espalhamento Rayleigh; b) espalhamento Raman anti-Stokes; c) espalhamento Raman Stokes; d) espalhamento Raman pré-ressonante; e, f) espalhamento Raman ressonante.

Sob o ponto de vista mecânico-quântico (figura 1), o espalhamento de luz, tal qual ocorre no efeito Raman, é um processo de dois fótons<sup>3</sup>. O primeiro estágio desse processo consiste na combinação de um fóton e uma molécula de tal modo que esta última é levada a um estado de energia mais alta, de duração extremamente curta. O estado de alta energia pode ou não corresponder a um estado de energia quantizada da molécula. Neste último caso, o estado é dito virtual ou intermediário. O segundo estágio envolve a liberação de um fóton após um intervalo de tempo muito curto ( $< 10^{-11}$ s). Observa-se que o espalhamento Rayleigh as transições para o estado de maior energia e aquela de retorno ao estado fundamental envolvem energias de mesma magnitude e portanto neste caso a frequência do fóton é a mesma. O efeito Raman, por outro lado, consiste num espalhamento da radiação com frequência que difere daquela da radiação incidente. Tal diferença corresponde à energia quantizada entre dois níveis vibracionais. A transição no Raman normal envolve estados virtuais conforme se vê na figura 1. Quando a frequência da luz espalhada é menor que a incidente ( $\nu_0 - \nu_{\text{vibr}}$ ), tem-se o processo Stokes, no qual a transição termina em um nível vibracional mais alto que aquele de partida. A transição poderá no entanto originar-se de um nível vibracional mais alto e encerrar-se em nível de energia mais baixa; neste caso tem-se o chamado processo anti-Stokes em que a frequência do segundo fóton, o fóton espalhado, é igual a  $\nu_0 + \nu_{\text{vibr}}$ . Como em ambos os processos há conservação de energia total, tem-se que no processo Stokes a molécula ganha um quantum de energia vibracional enquanto que no processo anti-Stokes um quantum é liberado com o espalhamento. As regras de seleção do tratamento quântico mostram que as transições vibracionais permitidas envolvem  $\Delta V = \pm 1$ . O fato de que a população dos vá-

rios níveis é governada pela distribuição de Boltzmann implica que as linhas anti-Stokes resultarão em geral menos intensas, uma vez que níveis de mais alta energia estarão menos populados a temperaturas ordinárias.

Na figura 1 está indicado ainda o fenômeno chamado Raman ressonante, no qual a radiação excitante possui uma frequência muito próxima ou coincidente com o valor da frequência de uma transição eletrônica permitida da molécula. Nessa situação, grande intensificação é observada nas bandas Raman correspondentes ao grupo em que se dá a transição eletrônica. O tratamento teórico para as intensidades das linhas Raman em condições de ressonância foi desenvolvido por Albrecht<sup>7</sup> e é conhecido como teoria do acoplamento vibrônico<sup>8</sup>. Metaloproteínas em geral ou proteínas ligadas a grupos cromóforos constituem os principais exemplos de aplicação do efeito Raman ressonante a sistemas biológicos<sup>3</sup>.

Sob o ponto de vista clássico, a intensidade de uma linha Raman é proporcional a  $\nu^4$ , da frequência da luz espalhada<sup>3</sup>. Isto indica que há uma barreira natural à extensão dos estudos Raman em direção à região do infravermelho no espectro eletromagnético; dependência com o quadrado da variação da polarizabilidade durante a vibração é também indicada<sup>3</sup>. Do ponto de vista mecânico-quântico, o problema das intensidades Raman recebeu um tratamento rigoroso, através do trabalho fundamental de Placzek, em 1934<sup>9</sup>.

O número de vibrações de uma molécula, suas características e sua atividade no Raman e no infravermelho podem ser previstas a partir da simetria da molécula por aplicação da teoria de grupo. No caso de moléculas poliméricas, no entanto, tal análise se torna extremamente complexa. Alguns tratamentos teóricos que definem os principais modos vibracionais em proteínas e sua dependência de aspectos de conformação do esqueleto polipeptídico<sup>11-14</sup> são indicados no item que se segue a este. Abordagens semiempíricas têm sido também desenvolvidas, sobretudo relativas ao aprimoramento dos métodos de estimativa dos conteúdos de conformação secundária a partir dos espectros vibracionais<sup>15-19</sup>.

### 3. ANÁLISE VIBRACIONAL DE PROTEÍNAS

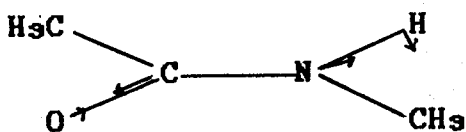
#### 3.1. N-metilacetamida: o modelo da ligação peptídica

N-metilacetamida,  $\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}_3$ , é um composto que apresenta estrutura molecular e espectros vibracionais muito semelhantes àqueles apresentados por polipeptídeos e proteínas. Miyazawa et alii<sup>11</sup> relatam que dados espectroscópicos Raman, infravermelho, ultravioleta, bem como resultados de difração de elétrons e medidas de momento dipolar desse composto indicam que sua estrutura é planar trans, em conformidade com aquela observada para polipeptídeos e proteínas. O tratamento de coordenadas normais desse composto levou ao conhecimento da natureza das vibrações de diversos modos amida e outras vibrações normais<sup>11</sup>. No cálculo foram empregados valores de constantes de força obtidos de um tratamento de coordenadas normais da molécula de diformilhidrazina, a qual tem uma estrutura semelhante à da N-metilacetamida, porém com características de alta simetria<sup>11</sup>.

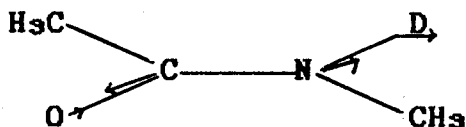
As vibrações amida no plano manifestam-se no espectro vibracional como 4 bandas características observadas na região  $600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ . São chamadas de amida I, II, III e IV. Dentre elas, as bandas amidas I e III contribuem com informações estruturais de relevância ao estudo de proteínas. Três

outras bandas, amida V, VI e VII, referem-se a movimentos vibracionais fora do plano da ligação peptídica. Ocorrem ainda 2 bandas vibracionais resultantes de uma ressonância de Fermi – bandas amida A e B. Focalizar-se-á, a seguir, cada uma delas mais particularmente.

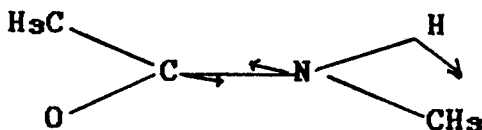
**Amida I** – Esta banda é observada a cerca de  $1650\text{ cm}^{-1}$  e corresponde, predominantemente, ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  (80%). Menos significativas são as contribuições do estiramento  $\text{C-N}$  (10%) e da deformação angular  $\text{NH}$  no plano (10%). Observando-se o pequeno percentual de deslocamento de frequência por deuteração da molécula (0.5%) é possível confirmar-se a pequena contribuição dessa última vibração. A relação de amplitudes entre a contração da ligação  $\text{C-N}$  e o estiramento  $\text{C=O}$  é de  $-0,4:1,0$ . A amplitude de deformação angular  $\text{N-H}$  é da mesma ordem que o estiramento  $\text{C=O}$ .



**Amida I'** – Corresponde à banda amida I de espécies deuteras. O deslocamento de frequência é pequeno, devido, como se viu, à pequena contribuição da deformação angular  $\text{ND}$  para esse modo.



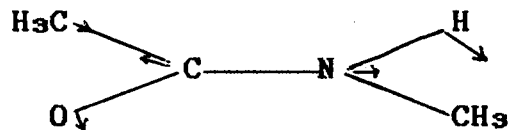
**Amida II** – Esse modo é representado pela deformação angular no plano do grupo  $\text{N-H}$  (60%) e pelo estiramento  $\text{C-N}$  (40%). A banda aparece a cerca de  $1550\text{ cm}^{-1}$  e sua natureza tem dado margem a controvérsias. Segundo Miyazawa<sup>12</sup>, os vetores de deslocamento atômico para esse modo são os mostrados na figura abaixo. A deformação angular  $\text{N-H}$  é bastante proeminente enquanto os dois grupos metila e o oxigênio da carbonila permanecem parados. O momento de transição para o modo amida II é aproximadamente perpendicular à ligação  $\text{N-H}$ , o que é consistente com os vetores de deslocamento atômico da figura abaixo. Outras atribuições anteriores ao trabalho de Miyazawa<sup>12</sup> foram descartadas, tais como a atribuição única ao estiramento  $\text{C-N}$ , a interação da deformação angular  $\text{N-H}$  com o estiramento simétrico do grupo  $\text{O=C-N}$ , ou a existência do grupo peptídico em outra forma tautomérica.



**Amida II'** – Ocorre a  $1450\text{ cm}^{-1}$  para espécies  $\text{N}$ -deuteras de  $\text{N}$ -metilacetamida, devido naturalmente ao efeito de substituição isotópica expresso pela proeminente deformação angular do grupo  $\text{N-D}$ .

**Amida III** – Banda observada na região de  $1230$  a  $1300\text{ cm}^{-1}$ , para a qual contribuem o estiramento  $\text{C-N}$  (40%), a de-

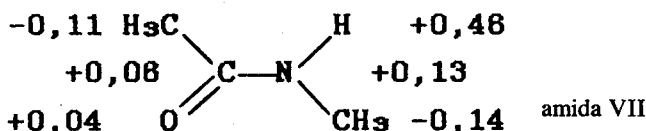
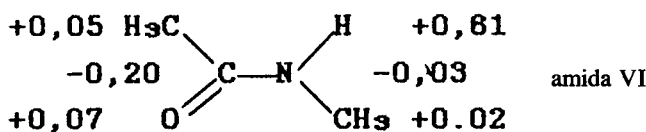
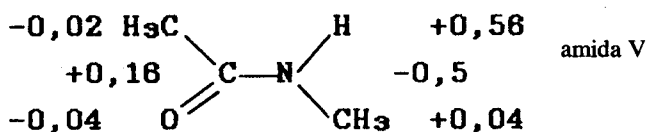
formação angular no plano  $\text{N-H}$  (30%) e o estiramento  $\text{CH}_3\text{-CH}$  (20%). As ligações  $\text{C-N}$  e  $\text{C=O}$  estiram-se e se contraem em fase, com uma relação de amplitudes de  $1,0:0,4$ . Também aqui, como no modo amida II, a deformação angular  $\text{N-H}$  é predominante. Não podem ser desprezadas as contribuições do estiramento  $\text{C-CH}_3$  e da deformação angular  $\text{O=C-N}$ , no caso da  $\text{N}$ -metilacetamida. O momento de transição desse modo tem sua direção aproximadamente perpendicular à ligação  $\text{N-H}$ .



**Amida III'** – Ocorre na região a cerca de  $950\text{ cm}^{-1}$ , devido ao efeito de substituição isotópica que se reflete sobretudo na deformação  $\text{N-D}$ .

**Amida IV** – Banda observada a cerca de  $630\text{ cm}^{-1}$  para amidas do tipo  $\text{R-CH}_2\text{-CO-NH-R}$  e a cerca de  $780\text{ cm}^{-1}$  para amidas do tipo  $\text{H-CO-NH-R}$ . É devida à deformação  $\text{O=C-N}$  na diformilhidrazina. Na  $\text{N}$ -metilacetamida, a contribuição do estiramento  $\text{C-CH}_3$  é também importante e o resultado da interação dessas vibrações resulta num deslocamento da frequência de deformação  $\text{O=C-N}$  para  $627\text{ cm}^{-1}$  nesse composto. Esse modo não se restringe ao grupo peptídico, sendo raramente observável nos espectros Raman ou infravermelho<sup>1</sup>.

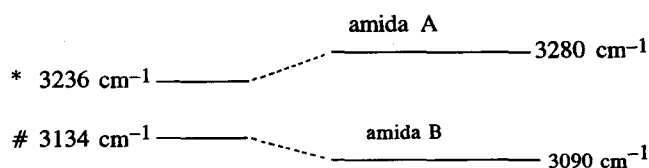
**Amida V, VI e VII** – Constituem bandas vibracionais associadas a vibrações fora do plano, antissimétricas em relação ao plano  $\text{CONH}$ . Ocorrem tanto no infravermelho como no Raman, porém suas intensidades Raman são muito fracas.



Os sinais  $+$  e  $-$  indicam que os átomos assinalados vibram perpendicularmente ao plano da página em direção ao observador e no sentido oposto, respectivamente. A magnitude dessas vibrações é dada pelos valores numéricos dos vetores.

**Amida A e B** – Essas bandas resultam de uma ressonância de Fermi entre o primeiro estado fundamental da vibração de estiramento  $\text{N-H}$  e a primeira harmônica da vibração amida

II. Esse efeito de ressonância expressa-se pelo aparecimento de duas bandas relativamente fortes, ligeiramente deslocadas (uma para valores mais altos e outra para valores mais baixos de frequência) em relação às posições esperadas numa situação de não-perturbação.



\* frequência da vibração fundamental de estiramento N-H  
# 1ª harmônica do modo amida II

Desdobramentos nos modos amida podem ocorrer como resultado de interações intra e intermoleculares. A sustentação teórica para esse efeito foi desenvolvida por Miyazawa<sup>12</sup> através de sua teoria de perturbação. Os trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Krimm<sup>13</sup> acrescentaram contribuições significativas ao tratamento teórico do problema, incorporando o desenvolvimento de campos de força para a cadeia polipeptídica.

### 3.2. Cadeias laterais

Aspectos referentes aos microambientes e geometria de algumas ligações em cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos, são acessíveis à investigação pela técnica Raman<sup>1-3</sup>. É bem estabelecido que características conformacionais de cadeias laterais em proteínas são muitas vezes decisivas no desenvolvimento da estrutura terciária das mesmas. Além desse aspecto, vale lembrar que em enzimas a conformação das cadeias laterais, sobretudo daquelas presentes em sítios catalíticos ou de reconhecimento de substrato, é crítica no que se refere à especificidade da ação enzimática.

São passíveis de estudo pela técnica Raman:

a) microambiente da cadeia lateral de resíduos de tirosina, bem como estado de ionização de seus grupos fenólicos, através da análise do duplete a 850/830  $\text{cm}^{-1}$ .

b) microambiente da cadeia lateral de resíduos de triptofano, através de modos vibracionais a 1360  $\text{cm}^{-1}$  e a 880  $\text{cm}^{-1}$ .

c) formas tautoméricas do anel imidazólico de resíduos de histidina, através de bandas características na região de 1260 a 1282  $\text{cm}^{-1}$ .

d) aspectos geométricos da ligação C-S da metionina e cisteína e dos segmentos CCSSCC em pontes dissulfeto.

Além desses, é possível ainda detectar-se:

a) a presença de grupamentos S-H livres, pela monitoração de banda característica na região em torno de 2600  $\text{cm}^{-1}$ .

b) a presença de fenilalanina, a qual exhibe uma banda forte muito característica a 1005  $\text{cm}^{-1}$ , numa região espectral em geral livre de sobreposições importantes. Por ser conformacionalmente insensível, ela é às vezes utilizada como banda de referência.

c) ionização de grupos carboxílicos dos aminoácidos ácidos (aspártico e glutâmico), através de banda a 1417  $\text{cm}^{-1}$ , aspecto que tem sido usado na monitoração da funcionalidade de proteína de músculo, conforme dados da literatura<sup>20</sup>.

### 3.3. Vibrações de baixa frequência

A região de baixa frequência responde por modos vibracionais que afetam a dinâmica da molécula de proteína como um todo<sup>3</sup>. Essa região pode ser, a grosso modo, considerada como aquela abaixo de 400  $\text{cm}^{-1}$ . O estudo dessa faixa de frequências, sobretudo abaixo de 100  $\text{cm}^{-1}$  é, entretanto, grandemente dificultado pela presença de forte espalhamento Rayleigh que se intensifica à medida que se aproxima da frequência da radiação incidente. Em Peticolas<sup>21</sup>, encontra-se uma boa revisão sobre esse interessante e controvertido tópico.

Os modos observados na região de baixa frequência englobam:

a) Vibrações internas da molécula: consistem de vibrações de libração e vibrações de torção.

– vibrações de libração: correspondem em geral à vibração de estiramento simétrico da molécula como um todo. Podem também se referir ao estiramento de certas estruturas secundárias da molécula, tais como, a “respiração” de  $\alpha$ -hélices. De acordo com Fanconi e Peticolas<sup>22</sup>, as frequências vibracionais associadas aos modos acústicos longitudinais apresentam uma relação inversa com o comprimento da cadeia polipeptídica. Desse modo, quanto menor a frequência, maior a região da molécula envolvida na vibração. Vibrações da molécula de proteína como um todo ou, de parte considerável da mesma, podem situar-se em faixa tão baixa quanto 20-30  $\text{cm}^{-1}$ , na dependência, é claro, do tamanho e forma moleculares. Vibrações de estruturas helicoidais situam-se em regiões mais altas, em torno de 265  $\text{cm}^{-1}$ . Nessa região de frequências situam-se certas vibrações coerentes descritas em proteínas por Davydov<sup>23</sup>, conhecidas por sólitons.

– vibrações de torção: referem-se ao modo de torção do grupo  $\text{CH}_3$  e aparecem na região de 260-410  $\text{cm}^{-1}$ .

b) vibrações intermoleculares: encontram-se aquelas vibrações decorrentes da interação com moléculas vizinhas, sejam moléculas de solvente, sejam outras moléculas da proteína, as quais embora façam parte de uma mesma “molécula”, no seu sentido biológico-funcional, podem ser no entanto entendidas nesse caso como entidades distintas. Incluem-se também nesse grupo as vibrações de rede de amstras cristalinas.

### 4. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CONFORMAÇÕES SECUNDÁRIAS EM CADEIAS POLIPEPTÍDICAS E PROTEÍNAS A PARTIR DE SEUS ESPECTOS VIBRACIONAIS

O processo de atribuição de frequências vibracionais em proteínas encontra-se sujeito a limitações decorrentes de: sobreposições espectrais, grau de resolução insuficiente para atribuições confiáveis e variações devidas a efeitos de cadeias laterais. De modo geral, observa-se na literatura que diferentes proteínas apresentam amplas oscilações nos seus valores de frequência dos modos amida<sup>1, 24-26</sup>. Desse modo, a determinação dos conteúdos de estrutura secundária a partir dessas regiões vibracionais exige procedimentos criteriosos.

Métodos para a avaliação quantitativa de conteúdos de estrutura secundária em proteínas, a partir de seus espectros vibracionais, têm sido desenvolvidos em anos recentes. O método de Pézolet et alii<sup>15</sup> baseia-se na intensidade relativa dos picos a 1240 e 1450  $\text{cm}^{-1}$ , os quais são atribuídos ao modo amida III e deformação angular dos grupos  $\text{CH}_2$ , respectivamente.

te. Esse método só é aplicável quando existe uma banda amida III bem definida a  $1240 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$ . A utilização da banda a  $1450 \text{ cm}^{-1}$  como padrão interno é comum ao método de Lippert et alii<sup>16</sup>, a ser descrito adiante. O método de Pézolet et alii<sup>15</sup> produz unicamente resultados referentes ao conteúdo em folhas  $\beta$ . O cálculo baseia-se na medida da intensidade relativa da banda a  $1240 \text{ cm}^{-1}$  multiplicada pelo número médio de grupos  $\text{CH}_2$  por resíduo. Este valor é confrontado numa curva-padrão construída a partir dessa mesma relação espectral obtida para proteínas com conteúdos em folhas  $\beta$  conhecidos por métodos cristalográficos de raios-X. A relação observada entre intensidade do modo amida III e conteúdo de folhas  $\beta$  mostra-se linear e, permite portanto, a determinação do conteúdo dessa conformação secundária por simples interpolação.

O método de Lippert et alii<sup>16</sup> já apresenta um avanço, uma vez que permite a estimativa do conteúdo estrutural secundário de proteínas em termos de suas frações  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$  e conformação não regular. Para tanto, procede-se a uma análise dos modos amida III e amida I' dos espectros Raman da proteína em solução aquosa e deuterada. O procedimento emprega como modelo as intensidades espectrais relativas das vibrações amida do esqueleto de poli(L-lisina) em suas conformações  $\alpha$  helicoidais, folhas  $\beta$  antiparalelas e conformação não regular, estimadas a  $1240 \text{ cm}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (amida III) e a  $1632 \text{ cm}^{-1}$  e  $1660 \text{ cm}^{-1}$  em  $\text{D}_2\text{O}$  (amida I') bem como as intensidades amida I' calculadas para lisozima e ribonuclease A a partir de parâmetros estruturais bem estabelecidos, obtidos de dados cristalográficos de raios X. O método baseia-se na hipótese de que as intensidades espectrais das proteínas estimadas nas mesmas frequências acima referidas em  $\text{H}_2\text{O}$  e em  $\text{D}_2\text{O}$ , relativas à intensidade de alguma banda conformacionalmente insensível tal como a banda da deformação angular dos grupos metileno, sejam combinações lineares das intensidades atribuídas aos resíduos peptídicos nas três conformações. O método não inclui um termo referente ao conteúdo em dobras  $\beta$ , em razão da inadequação da molécula-modelo escolhida. Pode-se criticar tal método pelo fato de que as frequências em que são medidas as intensidades não correspondem necessariamente a máximos de banda, encontrando-se muitas vezes em regiões de inclinação das mesmas. No entanto, a boa adequação dos resultados obtidos por este método quando confrontados com resultados de raios X<sup>1</sup>, aliada à sua praticidade de emprego, recomendam sua aplicação.

O método de Williams<sup>27,28</sup>, basicamente uma extensão dos métodos anteriores, é bastante referido, na literatura recente, em trabalhos de determinação conformacional de proteínas. Caracteriza-se por derivar uma intensidade-padrão para cada uma das várias estruturas secundárias a uma dada frequência Raman e, a seguir, proceder a uma tentativa de ajuste das regiões amida I e III' do espectro Raman da proteína por uma combinação linear dos padrões. Aprimoramento do método foi publicado em 1983<sup>29</sup> pelo mesmo autor, o qual apresenta em 1986 uma extensão<sup>19</sup> de modo a incluir a região amida III.

O método proposto por Thomas e Agard<sup>17</sup> consiste de um procedimento de deconvolução de espectros Raman. Parte do pressuposto de que deva existir um espectro verdadeiro, o qual, sujeito ao alargamento por uma função única relacionada à forma de linha, produz o espectro observado. O procedimento de deconvolução visa justamente reverter esse processo e conduzir ao espectro original através da aplicação de uma função apropriada ao espectro observado. A função utilizada

nesse método para a deconvolução das bandas Raman é do tipo lorentziano-gaussiana.

Deve-se ainda mencionar o mais recente método de estimativa de estruturas secundárias em proteínas, a partir de espectros Raman, que é aquele desenvolvido por Berjot et alii<sup>18</sup>. Nele se utilizam como modelo as intensidades espectrais das vibrações amida I do esqueleto polipeptídico correspondentes a categorias puras de conformação secundária, a saber,  $\alpha$ -hélice, folhas  $\beta$  e estrutura indefinida. Por estrutura indefinida os autores definem o conteúdo conformacional não regular e as dobras  $\beta$ , tomados em conjunto. Estas últimas não são, portanto, estimadas independentemente por este método, à semelhança do método de Lippert et alii<sup>16</sup>. O método de Berjot et alii<sup>18</sup> emprega um conjunto de perfis de intensidades de referência obtidos a partir de dados experimentais de um grande número de proteínas com estruturas secundárias bem definidas por difração de raios-X.

Métodos como os de Williams et alii<sup>27,28</sup>, Williams<sup>29,19</sup>, Berjot et alii<sup>18</sup> e Thomas e Agard<sup>17</sup> pressupõem a obtenção de dados espectrais em espectrômetros interfaciados a computador de modo a permitir que os processos de cálculos necessários em cada caso sejam efetuados. Tal requisito deve-se ao fato de que nesses métodos a manipulação de dados é extensiva ao longo de grandes regiões espectrais. O método de Lippert et alii<sup>16</sup>, ao contrário, utiliza dados de intensidade a frequências determinadas, totalizando não mais que quatro valores para cada par de espectros (em condições deuteradas e não deuteradas), incluindo-se aqui a intensidade da banda de referência. Esses valores podem portanto ser medidos no espectro e a seguir transferidos para um computador para a resolução do sistema de equações simultâneas ou mesmo calculados manualmente, uma vez que o procedimento matemático nesse método é de grande simplicidade.

## 5. VANTAGENS E DESVANTAGENS DO USO DA TÉCNICA RAMAN EM INVESTIGAÇÕES BIOQUÍMICAS

O uso da técnica Raman em investigações bioquímicas oferece de modo geral algumas vantagens como a possibilidade de estudo nos diferentes estados físicos e o uso de amostras em diversas formas físicas<sup>3</sup> tais como filmes, géis, cristais, pós amorfos, soluções, superfícies, etc. Uma enorme vantagem da espectroscopia Raman no estudo de materiais biológicos é a pequena contribuição do espalhamento da água, permitindo que estudos em solução sejam realizados sem maiores dificuldades. Além disso, pequenos volumes de material são necessários, uma vez que o tamanho do feixe laser focalizado é o que define o limite mínimo de amostra. Trata-se de técnica não destrutiva, o que pode representar uma condição desejável nos casos em que se trabalha com quantidades mínimas de amostra. A relativa facilidade com que o feixe laser pode ser manobrado permite também uma grande flexibilidade nos arranjos experimentais. As escalas de tempo para os efeitos Raman e Raman ressonante são essencialmente instantâneas, eliminando os efeitos de relaxamento sobre as formas de linha, tais como se encontram em RMN, por exemplo.

Entre os aspectos desfavoráveis tem-se a possibilidade de ocorrência de efeitos fotoquímicos indesejáveis decorrentes de exposição da amostra ao alto fluxo de fótons do feixe laser; a inerente baixa ocorrência do efeito Raman (cerca de  $10^{-6}$  em relação ao espalhamento Rayleigh)<sup>3</sup> é também um fator desfavorável, uma vez que o espectro pode ser obscurecido por processos competitivos tais como fluorescência, por exemplo.

Em decorrência, altas concentrações de amostra são em geral necessárias, o que pode ser um fator limitante no caso de estudos bioquímicos. Outra condição que parece ser igualmente crítica para o estudo em solução é a homogeneidade óptica das amostras.

## 6. APLICAÇÃO DO MÉTODO VIBRACIONAL AO ESTUDO CONFORMACIONAL DE PROTEÍNAS – ALGUNS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

### 6.1. Considerações gerais

Os primórdios da utilização da espectroscopia Raman em moléculas de interesse biológico tiveram lugar com os estudos pioneiros de Edsall em 1936<sup>30</sup> sobre os efeitos da ionização e substituição isotópica nos espectros de aminoácidos e compostos correlatos. Aspectos conformacionais de macromoléculas biológicas constituíram a seguir tema de interesse e os esforços que culminaram na obtenção e análise do primeiro espectro Raman de proteína, o espectro da lisozima, publicado em 1958 por Garfinkel e Edsall<sup>31</sup>, utilizando-se de lâmpada de mercúrio como fonte de excitação. Entretanto, esses estudos foram limitados devido a problemas experimentais relativos à grande quantidade de amostra requerida, fraca intensidade de radiação monocromática, aliada à forte intensidade de fundo produzida pela lâmpada de mercúrio.

A descoberta do laser por volta de 1960 e a sua utilização como fonte de radiação com características peculiares de alta potência, alta coerência, monocromaticidade, colimação e luz polarizada, contribuíram para o grande renascimento da espectroscopia Raman a partir de 1962.

Em torno de 1970 teve início a utilização da espectroscopia Raman laser em biomoléculas. O trabalho de Lord e Yu, publicado em 1970<sup>32</sup> foi o marco dessa nova fase. A partir daí, a técnica tem sido extensivamente usada no estudo dos mais diversos sistemas de interesse biológico, tais como membranas<sup>33,34</sup>, lípides<sup>35</sup>, carboidratos<sup>36</sup>, ácidos nucleicos<sup>37</sup>. Em particular, o emprego da técnica no estudo de proteínas tem se constituído em uma das áreas de maior expansão, em razão da reconhecida importância dessas moléculas e da necessidade de se encontrarem vias complementares de investigação estrutural desses compostos em situações bioquimicamente relevantes, tal como viável pela técnica Raman. Assim, proteínas das mais diversas origens têm sido estudadas, tanto em suas formas isoladas como em seus complexos enzima-substrato, anti-corpo-hapteno, droga-receptor, entre outros<sup>3</sup>. Proteínas virais<sup>38,39</sup> e proteínas com ação tóxica<sup>40</sup> constituem outros exemplos de sistemas que têm sido investigados pela técnica vibracional.

### 6.2. Aspectos instrumentais

#### Raman

Para estudos Raman de proteínas em condição de não ressonância, usualmente é utilizada excitação no visível, mais freqüentemente as linhas 488.0 e 514.5 nm de um laser de íon argônio ou a linha 647.1 nm de um laser de íon criptônio. Amostras que exibem muita fluorescência podem ser excitadas com radiação no infravermelho próximo, como por exemplo a linha 1064.0 nm de um laser de Nd:YAG<sup>41,42</sup>, que vem sendo utilizada em espectrômetros com transformada de Fourier. Excitação no ultravioleta tem tido emprego mais recente

no estudo Raman ressonante de grupamentos cromóforos em proteínas, representados pelas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos aromáticos<sup>43</sup>.

O espectrômetro Raman convencional é constituído de um duplo ou triplo monocromador, uma fotomultiplicadora que pode ou não ser resfriada e uma unidade de detecção com eletrônica de contagem de fótons.

Até recentemente, os espectrômetros Raman laser convencionais usavam monocromadores de varredura. O advento de sistemas de detecção multicanal permitiu um enorme aumento na velocidade de aquisição de dados, além de envolver um reduzido tempo de exposição da amostra<sup>44,45</sup>. Diversos tipos de detectores multicanal são aplicáveis à espectroscopia Raman. Atualmente os mais empregados são os do tipo fotodiodos intensificados. Ainda se encontra em estágio preliminar a aplicação de recursos de detecção mais recentes, como aqueles representados por detectores sensíveis a posição e detectores de cargas acopladas<sup>46</sup>.

As amostras de proteínas são estudadas mais usualmente como pós liofilizados ou em solução. Amostras sólidas são compactadas na cavidade frontal de um cilindro apropriado de latão, enquanto amostras em solução (tipicamente 5 µl a 20 µl) são seladas em tubos capilares de 1 a 3 mm de diâmetro interno. A faixa usual de concentração de proteína varia de 15 mg/ml a 200 mg/ml.

Os valores de potência do laser podem ser ajustados na faixa de 20 a 300 mW, sendo utilizados para amostras sólidas valores mais baixos do que para as soluções. Filtros de interferência ou um monocromador podem ser colocados diante da amostra para a remoção de linhas de plasma.

A radiação espalhada é usualmente coletada em ângulo de 90° em relação à direção da luz incidente. A fenda espectral, para um espectrômetro convencional, pode variar entre 3 a 12 cm<sup>-1</sup>, e velocidades de varredura de 5 a 50 cm<sup>-1</sup>/min são em geral usadas. Particularmente para o caso de espectros de proteínas, as faixas de 400 a 1800 cm<sup>-1</sup>, 2500 a 2700 cm<sup>-1</sup> e 2800 a 3200 cm<sup>-1</sup> são em geral registradas.

#### Infravermelho

O estudo de sistemas biológicos em meio aquoso pela técnica vibracional no infravermelho foi por muito tempo fortemente desestimulado pela intensa absorção da H<sub>2</sub>O e de D<sub>2</sub>O. Além disso, aspectos relativos à natureza da instrumentação, como os longos tempos de varredura e baixos índices de desempenho dos equipamentos dispersivos tradicionais, concorreram para o modesto uso da técnica no estudo estrutural de proteínas.

O advento de técnicas de transformada de Fourier modificou este cenário, ampliando significativamente a utilização da técnica a sistemas biológicos e materiais aquosos. A velocidade de varredura em IV-TF é medida em segundos ou frações de segundo e isto é uma grande diferença se comparado aos vários minutos necessários para o registro de um espectro em equipamento dispersivo convencional. Espectros resultantes de diversas acumulações sucessivas e coerentes com consequente diminuição do nível de ruído podem ser obtidos em intervalos de 1 minuto ou menos. A natureza computadorizada digital dos instrumentos permite extensivo tratamento dos dados; nesse particular, os procedimentos de subtração constituem sem dúvida os recursos de maior interesse<sup>47</sup>. Dessa forma, espectros IV-TF de rotina podem ser registrados em H<sub>2</sub>O via subtração digital das bandas da água.

A grande maioria dos espectrômetros IV-TF são instrumentos de feixe único que apresentam boa adequação para estudos em sistemas biológicos. Alta resolução não é necessária para tais sistemas: valores de 2 a 4  $\text{cm}^{-1}$ , são em geral, suficientes.

Usualmente utilizam-se métodos de transmissão, embora ópticas de reflectância difusa ou de reflexão interna sejam também usadas para minimizar a absorção da água.

Amostras sólidas podem ser preparadas na forma de filmes, através de secagem de soluções de proteína sobre janelas de Irtran 2, ou na forma de pastilhas de KBr contendo cerca de 2%(p/p) de proteína. Amostras em solução podem ser preparadas suspendendo-se a proteína em  $\text{H}_2\text{O}$  ou em  $\text{D}_2\text{O}$ , numa concentração de 30 a 40 mg/ml, empregando-se celas de  $\text{CaF}_2$  ou Irtran 2.

Pastilhas de KCl contendo proteína na concentração de 5 a 10% (p/p) são usadas para a obtenção de espectros de reflectância difusa. Celas cilíndricas de reflectância interna podem ser usadas com amostras líquidas.

### 6.3. Alguns resultados ilustrativos

O estudo estrutural de toxinas protéicas tem permitido que se avance na compreensão de seus mecanismos de ação<sup>48</sup>. Além desse aspecto, há outro que cumpre destacar, que se refere ao estudo evolutivo dessas espécies moleculares, sob o ponto de vista da Bioquímica Comparada<sup>49</sup>.

Neste laboratório, desenvolvemos nos últimos anos um trabalho de investigação de aspectos conformacionais de algumas proteínas tóxicas de espécies peçonhentas do Brasil, pela técnica Raman e infravermelho. O trabalho envolveu uma

das frações tóxicas do veneno do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* (toxina) e duas toxinas da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, a saber, a crotamina e a fosfolipase  $\text{A}_2$  do complexo crotoxina. Foi também estudada uma fosfolipase homóloga, de pâncreas de porco, bem como sua proenzima, considerando-se a possibilidade de se estabelecerem parâmetros comparativos entre as conformações de enzimas homólogas com mesma ação catalítica e comportamento tóxico discrepante.

Dentre os modos vibracionais amida expostos no item 3.1, é bem estabelecido que características espectrais das bandas amida I, II e III correlacionam-se com a estrutura secundária da cadeia polipeptídica. As posições dos máximos de frequência indicam a predominância de uma particular conformação; assimetria ou alargamento de forma de banda apontam para a coexistência de mais de um tipo de conformação secundária.

No trabalho desenvolvido em nosso laboratório, utilizamos correlações semi-empíricas na análise qualitativa dos espectros vibracionais<sup>1, 24-26</sup>. Na análise quantitativa dos conteúdos de conformação secundária, fizemos uso do método de Lippert<sup>16</sup>, o qual foi exposto no item<sup>4</sup>.

#### 6.3.1. Crotamina

A neurotoxina crotamina é uma proteína básica (PI 10,3), de baixo peso molecular (4880 Da), isolada do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*<sup>50</sup>. Consiste de uma única cadeia polipeptídica contendo 42 resíduos de aminoácidos com estrutura primária determinada<sup>51</sup>, interligada por três pontes dissulfeto.

Os espectros Raman da crotamina nativa no estado liofilizado

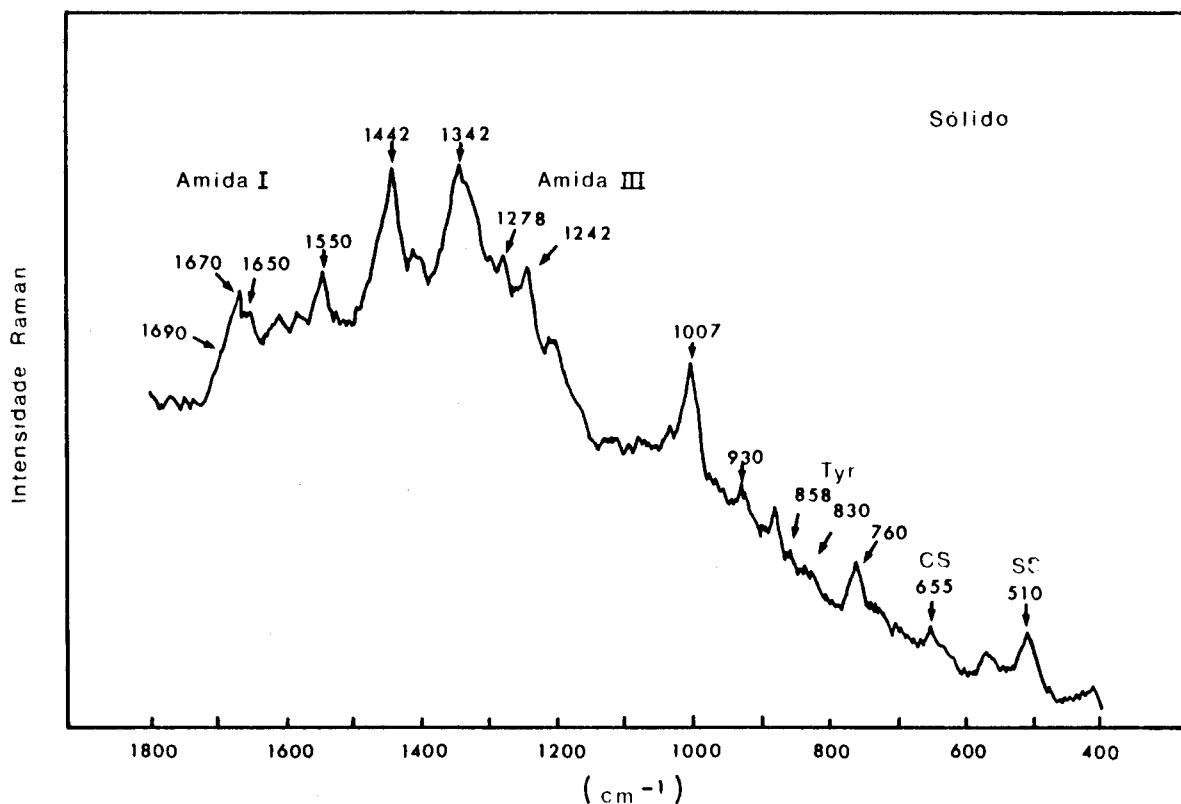


Figura 2. Espectro Raman da crotamina nativa no estado liofilizado, a 20°C.

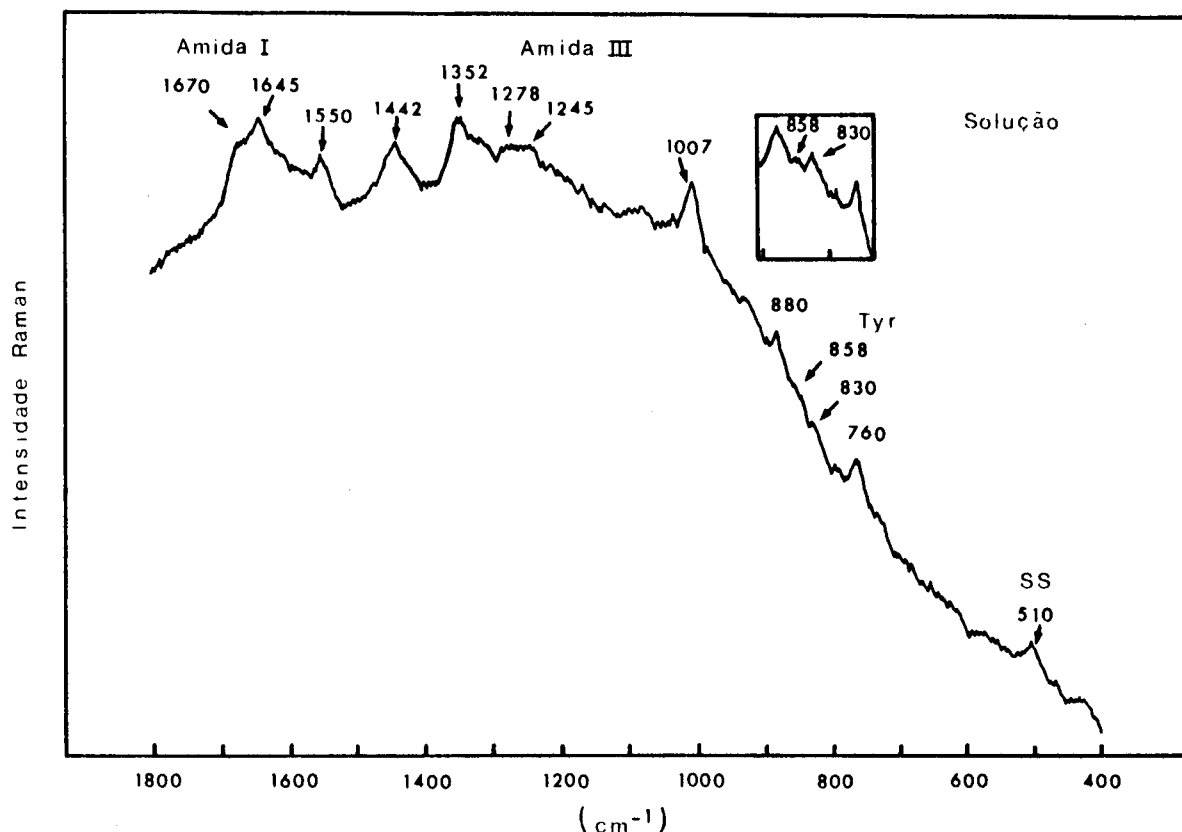


Figura 3. Espectro Raman da crotamina nativa em solução aquosa, a pH 5,6 e a 20°C.

zado e em solução aquosa foram investigados na região 400-1800  $\text{cm}^{-1}$  <sup>52,53,54</sup> (figuras 2 e 3); espectros de absorvância e de derivada segunda no infravermelho (FT), na região 1400-1800  $\text{cm}^{-1}$ , foram também registrados (figura 4).

Nos espectros Raman, a região amida I apresentou duas bandas a 1670 e 1650  $\text{cm}^{-1}$  no espectro do sólido e a 1670 e 1645  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros em solução aquosa, sugerindo que a crotamina deve conter estruturas em folhas  $\beta$  e em  $\alpha$ -hélice, com ligeira predominância da primeira. Esta conclusão é confirmada pela presença de duas bandas a 1240  $\text{cm}^{-1}$  e 1278  $\text{cm}^{-1}$  na região amida III, as quais são características de conformações em folhas  $\beta$  e  $\alpha$ -hélices, respectivamente. Há

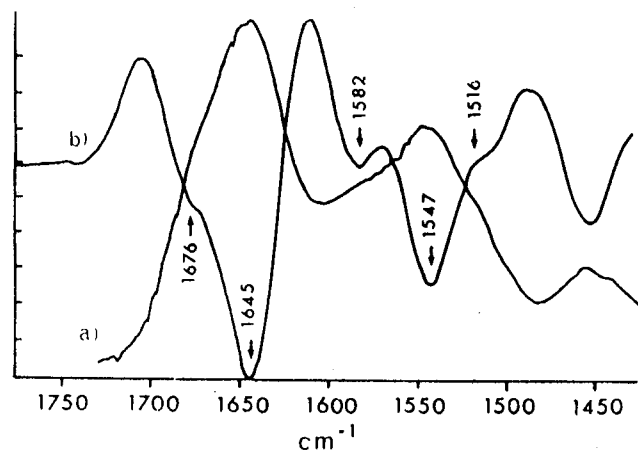


Figura 4. Espectro infravermelho de película sólida de crotamina: a) espectro de absorção; b) espectro de derivada segunda.

também evidência de estrutura não regular na região amida III. As três pontes dissulfeto adotam a conformação gauche-gauche-gauche (ggg) em relação às ligações CCSSCC, como mostrado pela banda Raman a 510  $\text{cm}^{-1}$ . A partir das relações de intensidades a 850 e 830  $\text{cm}^{-1}$  (dubleto da tirosina), conclui-se que o resíduo único de tirosina está "enterrado". A ausência da banda característica a 1361  $\text{cm}^{-1}$  indica que os resíduos de triptofano estão expostos na superfície molecular.

Os espectros no infravermelho apresentaram bandas resolvidas em 1645  $\text{cm}^{-1}$ , com ombro a 1676  $\text{cm}^{-1}$ , no modo amida I, indicativos de conformações em  $\alpha$ -hélice e folhas  $\beta$ , respectivamente e em 1582, 1547 e 1516  $\text{cm}^{-1}$ , no modo amida II; as atribuições conformacionais para esse último modo ainda não se encontram perfeitamente estabelecidas, havendo indicações de que o máximo a cerca de 1515  $\text{cm}^{-1}$  possa estar relacionado com a cadeia lateral de resíduos de tirosina.

### 6.3.2. Toxina $\gamma$

A toxina  $\gamma$  é uma proteína neurotóxica, com ponto isoelétrico na faixa básica, contendo 61 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de cerca de 7000 Da<sup>55,56</sup>. Apresenta um alto conteúdo de resíduos de triptofano, um resíduo de metionina (raramente encontrado nesse tipo de toxina) e uma lisina N-terminal. Fazem parte de sua estrutura quatro pontes dissulfeto<sup>56</sup>. É provavelmente a mais ativa toxina isolada do veneno do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e a primeira a ser completamente seqüenciada<sup>55</sup>.

Foram obtidos e analisados os espectros Raman nas regiões de 400 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  e de 2500 a 2700  $\text{cm}^{-1}$  da toxina nativa no estado liofilizado e em solução tampão de acetato



liofilizado e em solução tampão de acetato 0,1 M, pH 4,5 (Figuras 5 e 6), assim como o espectro infravermelho na região de 700 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  de uma película sólida da proteína<sup>57,58</sup>.

Tanto os resultados Raman como os do infravermelho são consistentes com a presença de uma mistura de estruturas secundárias. Qualitativamente, é possível indicar-se a predominância de conformação em folhas  $\beta$  (fortes bandas Raman amida I a 1670  $\text{cm}^{-1}$  e a 1667  $\text{cm}^{-1}$  para o sólido e solução, respectivamente). As demais estruturas deverão ser menos predominantes. O máximo da banda amida III a cerca de 1250  $\text{cm}^{-1}$  indica contudo que o teor de estruturas  $\alpha$ -helicoidais não é desprezível na molécula. A ocorrência de estruturas em  $\alpha$ -hélice é reforçada pela banda de vibração do esqueleto po-

lipeptídico ( $\nu\text{C-C}$ ) ao redor de 930  $\text{cm}^{-1}$ . Indicações da ocorrência de dobras são mais fracas, sendo somente observáveis em discretos ombros no modo Raman amida I.

A ocorrência de uma única banda simétrica a 511  $\text{cm}^{-1}$  nos aspectos Raman do sólido e da solução indicam geometria gauche-gauche-gauche para os segmentos CCSSCC das quatro pontes dissulfeto.

A região de 2500 a 2700  $\text{cm}^{-1}$ , onde seriam esperados modos de estiramento S-H<sup>1</sup>, revelou a não ocorrência de bandas, indicando a não existência de grupamentos sulfidríla livres na molécula.

Os estiramentos C-S da cadeia lateral do único resíduo de metionina respondem pela banda a 643  $\text{cm}^{-1}$  e por uma banda

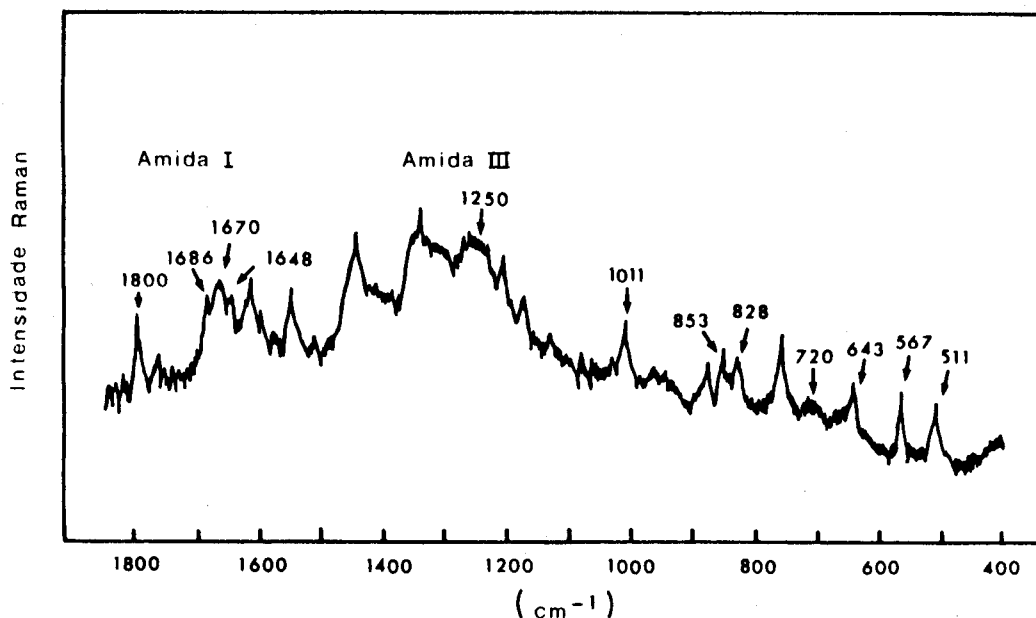


Figura 5. Espectro Raman da toxina nativa no estado liofilizado.

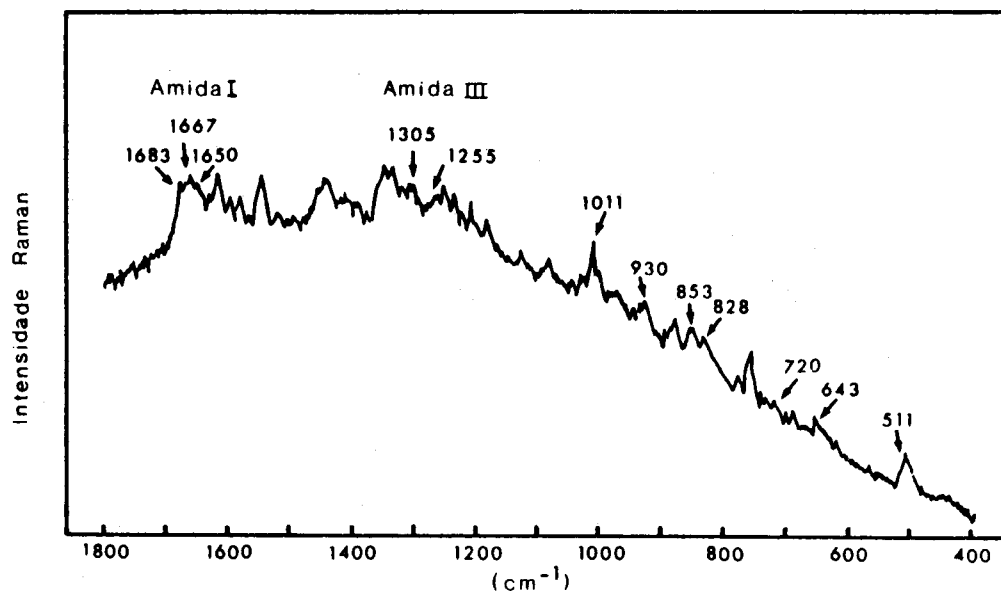


Figura 6. Espectro Raman da toxina em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5.

muito fraca a  $720\text{ cm}^{-1}$ , nos espectros Raman do sólido e da solução; tais máximos de frequência não permitem uma atribuição conformacional inequívoca, mas parecem indicar a ocorrência de mais de uma conformação para os grupamentos -C-C-S- na molécula.

Os microambientes dos resíduos de tirosina na molécula puderam ser investigados através da análise do dubleto da tirosina a  $853\text{ cm}^{-1}$  e a  $828\text{ cm}^{-1}$ . As intensidades das relações  $I_{853}/I_{828}$  apresentaram valores de 1,15. Utilizando-se a relação empírica de Craig e Gaber<sup>58</sup>, corrigida por Tu<sup>1</sup>, foi possível calcular-se que quatro desses resíduos encontram-se na superfície molecular e apenas um acha-se "enterrado" na molécula, possivelmente em regiões hidrofóbicas da mesma.

A ausência de banda definida a  $1360\text{ cm}^{-1}$  nos espectros Raman indica que os três resíduos de triptofano da toxina estão expostos ao solvente.

O confronto entre os espectros da toxina na forma liofilizada e em solução tampão acetato a pH 4,5 indicou uma aparente mudança na intensidade relativa dos modos amida conformacionalmente sensíveis, assim como de algumas outras bandas da proteína. Duas bandas, sem atribuição, foram observadas a  $567\text{ cm}^{-1}$  e  $1800\text{ cm}^{-1}$  no espectro do sólido e ausentes no espectro da solução. Por outro lado, não foram observadas mudanças nas frequências das linhas Raman dos modos amida I e III e do modo de estiramento S-S, indicando manutenção, sob o ponto de vista qualitativo, das mesmas estruturas secundárias para as formas liofilizadas e em solução

da proteína. As mudanças observadas nas intensidades relativas são tentativamente atribuídas a possíveis modificações nos conteúdos relativos dessas estruturas, bem como a eventuais mudanças de aspectos conformacionais em cadeias laterais.

### 6.3.3. Fosfolipases A<sub>2</sub>

A fosfolipase A<sub>2</sub> (fosfatidilcolina 2-acilhidrolase, EC 3.1.1.4) é uma enzima básica, termoestável, de cadeia única, com peso molecular de aproximadamente 14 KDa, que hidrolisa especificamente a ligação 2-acila de 3-sn-fosfoglicerídeos, numa reação dependente de íons cálcio. A enzima em mamíferos deriva de um zimogênio pancreático, o qual é ativado pela remoção de sete resíduos de aminoácidos da porção N-terminal pela tripsina<sup>60,61</sup>.

A fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) é também o componente básico da crotoxina, a mais predominante toxina do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*<sup>62,63</sup>. O complexo crotoxina engloba um segundo componente, um polipeptídeo atóxico, de caráter ácido, chamado crotapotina, ao qual a PLA<sub>2</sub> se liga através de ligações não covalentes em uma razão molar estequiométrica 1:1<sup>84</sup>.

Ambas as fosfolipases tem seu sequenciamento de aminoácidos determinado<sup>61,63</sup>. O grau observado de homologia entre elas, em condições otimizadas de alinhamento, é da ordem de 23%<sup>65</sup>. Apesar de sua ação catalítica semelhante "in vitro", seu comportamento tóxico é discrepante, constituindo-se por-

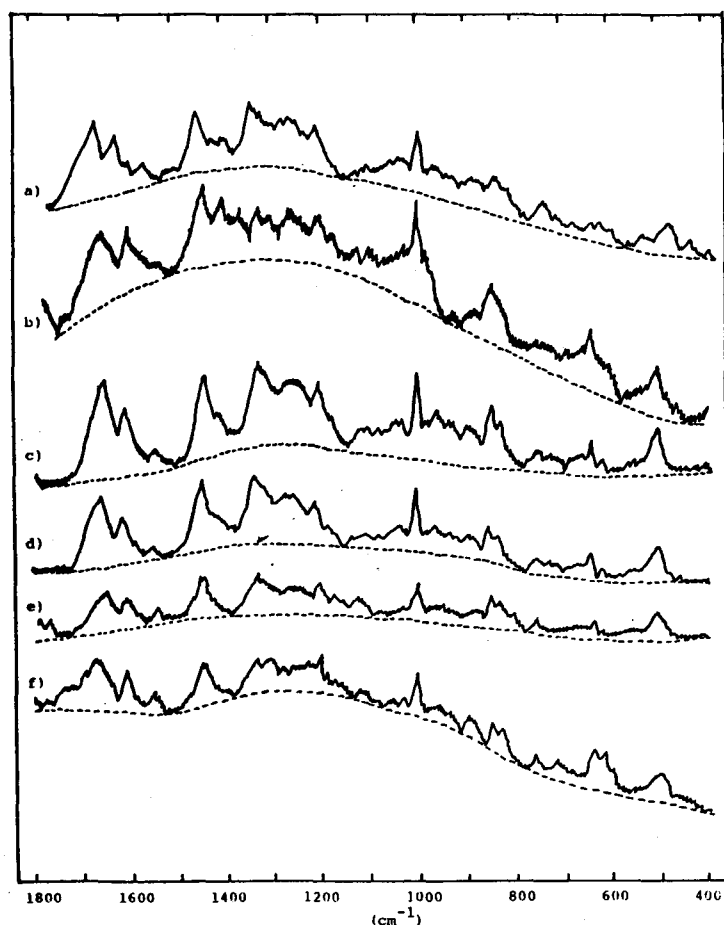
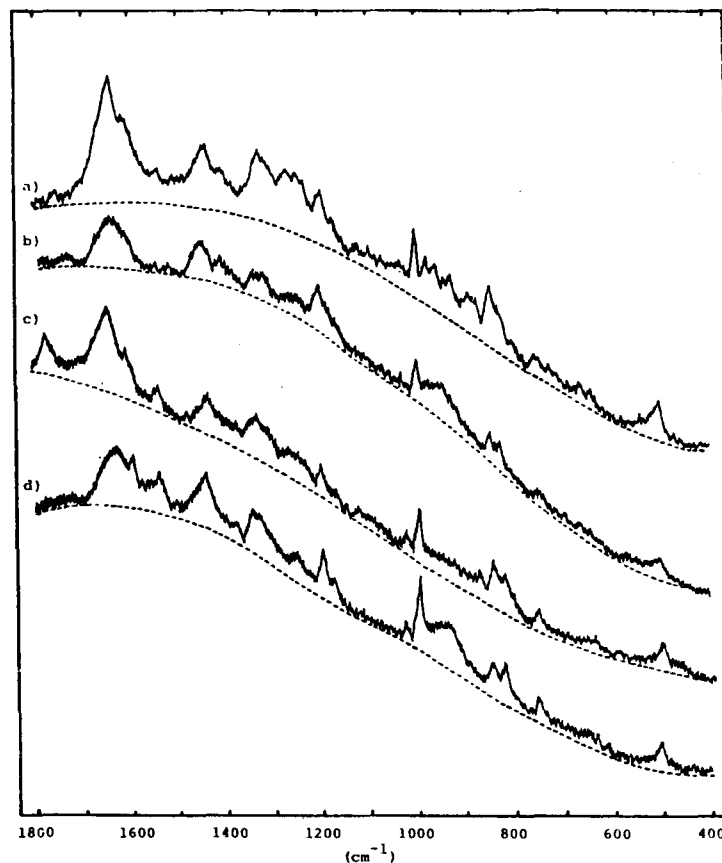


Figura 7. Espectros Raman de amostras liofilizadas de: a) fosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco; b) fosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco, deuterada; c) profosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco; d) profosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco, deuterada; e) fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*; f) fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus*, deuterada.



**Figura 8.** Espectros Raman de: a) fosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco 20% (p/v) em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M, pH 7,5; b) fosfolipase A<sub>2</sub> de pâncreas de porco 20% (p/v) em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M, pD 7,3; c) fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* 40% (p/v) em H<sub>2</sub>O; d) fosfolipase A<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* 40% (p/v) em d<sup>2</sup>O.

tanto em bons sistemas para estudo das interações estrutura-função em proteínas.

Em princípio, as contribuições relativas das conformações secundárias para a estrutura geral da molécula podem ser monitoradas pelas intensidades relativas Raman a frequências características, tomando-se usualmente como banda de referência o modo conformacionalmente insensível de deformação angular dos grupos metileno a 1448 cm<sup>-1</sup>. No entanto, o alargamento das bandas freqüentemente leva à superposição das mesmas, tornando a monitoração das mudanças conformacionais um procedimento sensível a erro.

Em razão do nosso interesse no estudo comparativo das fosfolipases homólogas, decidimos pela aplicação de um método quantitativo para estimativa mais precisa e confiável dos seus conteúdos conformacionais secundários.

Espectros Raman e de absorção no infravermelho foram obtidos e analisados<sup>58, 65-67</sup> (figuras 7, 8, 9 e 10). Mudanças nas intensidades relativas Raman de modos amida foram observadas para os diferentes sistemas ensaiados<sup>58, 65, 66</sup>. A análise espectral empregada<sup>16</sup> utilizou pares de amostras deuteradas e não deuteradas em condições experimentais semelhantes para estimativa de seus conteúdos de estrutura secundária<sup>58,65, 66</sup>.

O tratamento dos dados espectrais revelou que a estrutura secundária predominante no estado sólido para as fosfolipases estudadas é a espiral aleatória ou conformação aperiódica. Na verdade, esse conteúdo muito provavelmente inclui a fração

em dobras β, não revelada independentemente por esse método.

Observou-se ainda que os conteúdos conformacionais para a fosfolipase pancreática sólida, liofilizada, diferem dos padrões para a enzima cristalizada em suas frações helicoidais e aperiódicas<sup>58,68</sup>.

Diferentes conteúdos de estruturas secundárias foram encontrados para as formas tóxica e atóxica da molécula de fosfolipase no estado sólido, com um menor teor de estruturas em folhas β observadas na enzima crotálica.

Uma proeminente transição conformacional associada com a dissolução da proteína foi por nós observada para as três amostras (fosfolipase crotálica, pancreática e sua proenzima) e mostrou envolver um rearranjo do tipo espiral aleatória — folhas β. A literatura registra que este tipo de transição pode ser comum a proteínas globulares com alto teor de regiões aperiódicas<sup>69</sup>, as quais correspondem a 50-60% nas fosfolipases por nós estudadas.

Observamos também que uma mudança conformacional acompanha a transformação profosfolipase A<sub>2</sub> → fosfolipase A<sub>2</sub>, levando a níveis mais altos de estruturas α-helicoidais na enzima ativa. Ions cálcio e acetato mostraram evidente efeito estruturante para a proenzima em solução. Foi também observado que, apesar de flutuações conformacionais não desprezíveis em pH ácido e alcalino, a maior parte da arquitetura molecular do zimogênio pancreático é preservada sob essas condições.

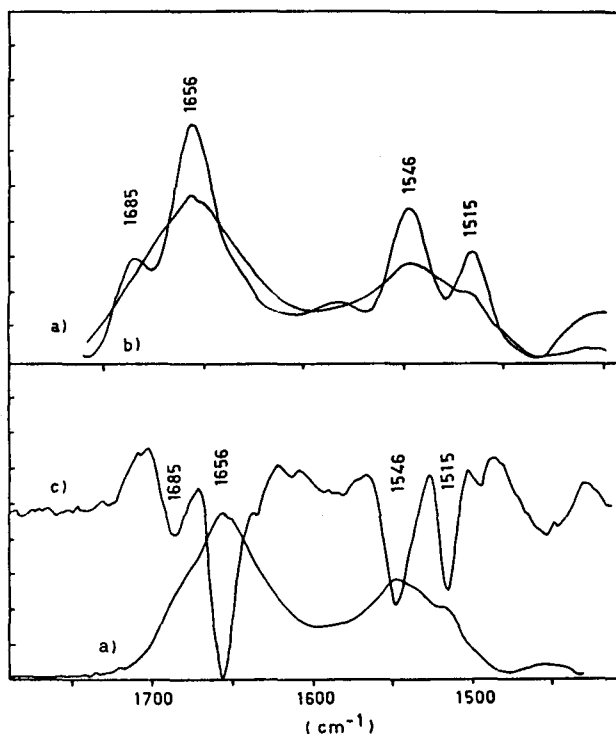


Figura 9. Espectros no infravermelho de película sólida de fosfolipase  $A_2$  de *Crotalus durissus terrificus*: a) espectro de absorção; b) espectro deconvoluido; c) espectro de derivada segunda.

O número de resíduos de tirosina "enterrados" e expostos foi determinado para cada proteína e os resultados indicaram que sua localização é predominantemente externa e, no caso da proenzima, não depende de modo apreciável do pH (faixa de 2,5 a 12,0) ou composição iônica do meio. Um comportamento similar foi observado para os resíduos de triptofano, os quais invariavelmente mostraram localização externa. As pontes dissulfeto apresentam-se consistentemente em conformação ggg, a qual se manteve inalterada nas diversas condições experimentais empregadas. Características espectrais na região de estiramento C-S indicaram a provável coexistência de geometrias distintas para as conformações dos segmentos C-C-S dos resíduos de metionina e cisteína. Não se registrou a presença de grupamentos SH livres.

#### 6.3.4. Interação lípide-proteína

Alguns estudos preliminares sobre este tipo de interação foram efetuados em nosso trabalho<sup>58, 65</sup> com sistemas envolvendo profosfolipase e um análogo de substrato, dodecilsulfato de sódio (SDS) e o próprio substrato, fosfatidilcolina.

O sistema profosfolipase/SDS numa relação molar 1/2,5 foi investigado<sup>58,65</sup>. A análise espectral indicou um rearranjo de regiões não regulares da proteína em padrões de estrutura  $\alpha$ -helicoidal e de folhas  $\beta$ ; essas mudanças foram acompanhadas por transições conformacionais terciárias nas quais interações hidrofóbicas entre grupos  $CH_2$  da proteína e do surfactante mostraram desempenhar papel relevante. Características conformacionais referentes às cadeias laterais de tirosina e triptofano bem como à geometria de pontes dissulfeto mostraram-se inalteradas pela presença do SDS<sup>58,65</sup>.

Os ensaios envolvendo profosfolipase e vesículas de lecitina

na<sup>58</sup> indicaram a indução de  $\alpha$ -hélices na molécula de proteína pela presença do fosfolípide. Alguma variação na intensidade relativa da banda de estiramento S-S a ca.  $510\text{ cm}^{-1}$  foi observada, embora não tenham sido registrados deslocamentos de frequência ou mudança na simetria da mesma. Aspectos conformacionais de cadeias laterais dos demais resíduos de aminoácidos, susceptíveis de análise pela técnica Raman, mantiveram-se inalterados.

Apesar de se mostrar útil no estudo da interação lípide/proteína, a técnica vibracional Raman defronta-se com dificuldades ligadas basicamente a dois pontos: problemas de espalhamento elástico decorrentes de inhomogeneidade óptica das amostras e complexidade da análise dos modos vibracionais para sistemas mistos, sobretudo de macromoléculas, os quais frequentemente aparecem sobrepostos nos espectros. A possibilidade de manipulação computacional, com recursos que permitam a obtenção de espectros diferenciais, por exemplo, torna mais promissor o futuro da investigação nesse campo.

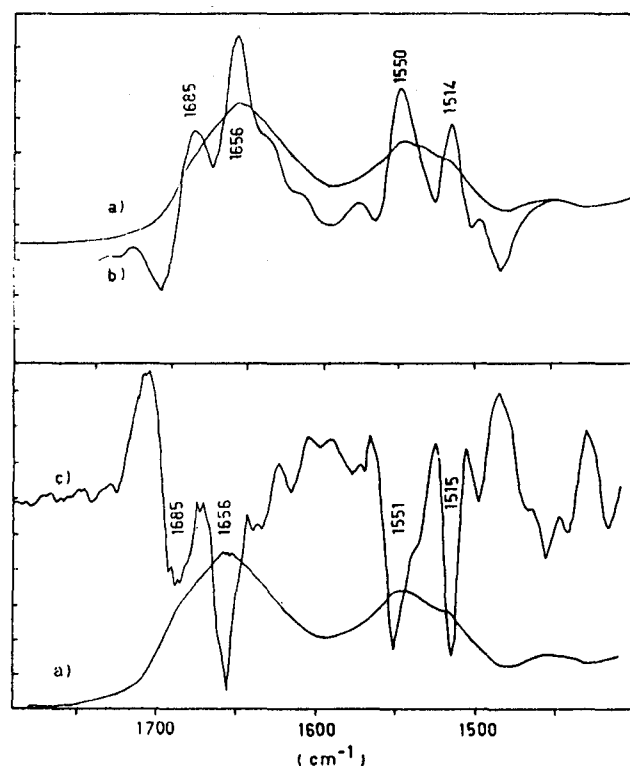


Figura 10. Espectros no infravermelho de película sólida de profosfolipase  $A_2$  de pâncreas de porco: a) espectro de absorção; b) espectro deconvoluido; c) espectro de derivada segunda.

#### AGRADECIMENTOS

E.P.G. Arêas agradece bolsas de Doutorado concedidas pela FAPESP e CNPq; Y. Kawano agradece a essas agências e à FINEP o apoio financeiro a este trabalho.

#### REFERÊNCIAS

1. Tu, A. T.; "Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications", p. 65, John Wiley & Sons, New York (1982).

2. Parker, F. S.; "Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry", 550 p., Plenum Press, New York (1983).
3. Carey, P. R.; "Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies", 262 p., Academic Press, New York (1982).
4. Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E.; "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy", 511 p., Academic Press, New York (1964).
5. Raman, C. V.; Krishnan, K. S.; *Nature* (1928) **121**, 501.
6. Smekal, A.; *Naturwiss* (1923) **11**, 873.
7. Albrecht, A. C.; *J. Chem. Phys.* (1961) **34**, 1476.
8. Tang, J.; Albrecht, A. C.; in "Raman Spectroscopy. Theory and Practice", V 2, p. 33, H. A. Szymanski, ed., Plenum Press, New York (1970).
9. Placzek, G.; "Handbuch der Radiologie VI (1934), 2, 209.
10. Wilson, Jr., E. B.; Decius, J. C.; Cross, P. C.; "Molecular Vibrations. The theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra", 388 p., McGraw-Hill Book Company, Inc., New York (1955).
11. Miyazawa, T.; Shimanouchi, T.; Mizushima, S. -I.; *J. Chem. Phys.* (1958) **29**, 611.
12. Miyazawa, T.; *J. Chem. Phys.* (1960) **32**, 1647.
13. Krimm, S.; Bandekar, J.; *Adv. Prot. Chem.* (1986) **38**, 181.
14. Krimm, S.; in "Biological Applications of Raman Spectroscopy", V 1, p. 1-45, T. G. Spiro, ed., John Wiley & Sons, New York (1987).
15. Pézolet, M.; Pigeon-Gosselin, M.; Coulombe, L.; *Biochim. Biophys. Acta* (1976) **453**, 502.
16. Lippert, J. L.; Tyminski, D.; Desmeules, P. J.; *J. Am. Chem. Soc.* (1976) **98**, 7075.
17. Thomas, G. J., Jr.; Agard, D. A.; *Biophys. J.* (1984) **46**, 763.
18. Berjot, M.; Max, J.; Alix, A.J.P.; *J. Raman Spectr.* (1987) **18**, 289.
19. Williams, R. W.; *Meth. Enzymol.* (1986) **130**, 311.
20. Pézolet, M.; Pigeon-Gosselin, M.; Nadeu, J.; Caille, J. -P.; *Biophys. J.* (1980) **31**, 1.
21. Peticolas, W. L.; *Meth. Enzymol.* (1979) **61**, 425.
22. Fanconi, B. e Peticolas, W. L.; *Biopolymers* (1971) **10**, 2223.
23. Davydov, A. S.; *Physica Scripta* (1979) **20**, 387.
24. Byler, D. M.; Susi, H.; *J. Ind. Microbiol.* (1988) **3**, 73.
25. Krimm, S.; Bandekar, J.; *Biopolymers* (1980) **19**, 1.
26. Susi, H.; Byler, M.; *Meth. Enzymol.* (1986) **130**, 290.
27. Williams, R. W.; Cutrerat, T.; Dunker, A. K.; Peticolas, W. L.; *FEBS Letters* (1980) **115**, 306.
28. Williams, R. W.; Dunker, A. K.; Peticolas, W. L.; *Biophys. J.* (1980) **32**, 232.
29. Williams, R. W.; *J. Mol. Biol.* (1983) **166**, 581.
30. Edsall, J. T.; *J. Chem. Phys.* (1936) **4**, 1.
31. Garfinkel, D.; Edsall, J. T.; *J. Am. Chem. Soc.* (1958) **80**, 3818.
32. Lord, R. C.; Yu, N. T.; *J. Mol. Biol.* (1970) **50**, 509.
33. Snyder, R. G.; Scherer, J. R.; Gaber, B. P.; *Biochim. Biophys. Acta* (1980) **601**, 47.
34. Carrier, D.; Pézolet, M.; *Biochemistry* (1986) **25**, 4167.
35. Mendelsohn, R.; Koch, C. C.; *Biochim. Biophys. Acta* (1980) **598**, 260.
36. Barret, T. W.; Peticolas, W. L.; *J. Raman Spectr.* (1979) **8**, 35.
37. Incardona, N. L.; Prescott, B.; Sargent, D.; Lamba, O. P.; Thomas Jr., G. J.; *Biochemistry* (1987) **26**, 1532.
38. Thomas, G. J. Jr.; Prescott, B.; Benevides, J. M.; Weiss, M. A.; *Biochemistry* (1986) **25**, 6768.
39. Thomas, G. J., Jr.; in "Biological Applications of Raman Spectroscopy", V 1, p. 135, T. G. Spiro, ed., John Wiley & Sons, New York (1987).
40. Thomas, G. J., Jr.; Prescott, B.; Love, R.; Stroud, R. M.; *Spectrochim. Acta* (1986) **42 A**, 215.
41. Fujiwara, M.; Hamaguchi, H.; Tasumi, M.; *Appl. Spectrosc.* (1986) **40**, 137.
42. Chase, B.; *Anal. Chem.* (1987) **59**, 881 A.
43. Asher, S. A.; *Ann. Rev. Phys. Chem.* (1988) **39**, 537.
44. Wharton, C. W.; *Biochem. J.* (1986) **233**, 25.
45. Ozaki, Y.; Iriyama, K.; Hamaguchi, H.; *Appl. Spectr.* (1987) **41**, 1245.
46. Hamaguchi, H. O.; *Appl. Spectr. Rev.* (1988) **24**, 137.
47. Dousseau, F.; Therrien, M.; Pézolet, M.; *Appl. Spectr.* (1989) **43**, 538.
48. Renetseder, R.; Brunie, S.; Dijkstra, B. W.; Drenth, J.; Sigler, P. B.; *J. Biol. Chem.* (1985) **260**, 11627.
49. Tsai, I. -H.; Lin, H. -C.; Chang, T.; *Biochim. Biophys. Acta* (1987) **916**, 94.
50. Gonçalves, J. M.; Vieira, L. G.; *Ann. Acad. Bras. Ciênc.* (1950) **22**, 141.
51. Laure, C. J.; *Hopp-Seyley's Z. Physiol. Chem.* (1975) **356**, 213.
52. Kawano, Y.; Laure, C. J.; Giglio, J. R.; *Biochim. Biophys. Acta* (1982) **705**, 20.
53. Kawano, Y.; Tese de Livre-Docência, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (1986).
54. Kawano, Y.; I Congresso Brasileiro de Proteínas, Campinas, SP (1990) (no prelo).
55. Bechis, G.; Sampieri, F.; Yuan, P. -M.; Brando, T.; Martin, M. -F.; Diniz, C. R.; Rochat, H.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) **122**, 1146.
56. Fontecilla-Camps, J. C.; Almasy, R. J.; Suddath, F. L.; Bugg, C. E.; *Toxicon* (1982) **20**, 1.
57. Arêas, E. P. G.; Giglio, J. R.; Arantes, E. C.; Kawano, Y.; *Biochim. Biophys. Acta* (1987) **915**, 292.
58. Arêas, E.P.G. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (1990).
59. Craig, W.S.; Gaber, B. P.; *J. Am. Chem. Soc.* (1977) **99**, 4130.
60. De Haas, G. H.; Postema, W.; Nieuwenhuizen, W.; Van Deenen, L. L. M.; *Biochim. Biophys. Acta* (1968) **159**, 118.
61. De Haas, G. H.; Slotboom, A. J.; Bonsel, P. P. M.; Nieuwenhuizen, W.; Van Deenen, L. L. M.; Maroux, S.; Dlouha, V.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta* (1970) **221**, 54.
62. Slotta, K. H.; Fraenkel-Conrat, H. L.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* (1938) **71**, 1076.
63. Aird, S. D.; Kaiser, I. I.; Lewis, R. V.; Kruggel, W. G.; *Arch. Biochem. Biochem. Biophys.* (1986) **249**, 296.
64. Breithaupt, H.; Omori-Satoh, T.; Lang, J.; *Biochim. Biophys. Acta* (1975) **403**, 355.
65. Arêas, E. P. G.; Laure, C. J.; Gabilan, N.; Araujo, P. S.; Kawano, Y.; *Biochim. Biophys. Acta* (1989) **997**, 15.
66. Arêas, E. P. G.; Araujo, P. S.; Gabilan, N.; Laure, C. J.; Kawano, Y.; Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Protéicas (1988) Vol I, 137.
67. Arêas, E. P. G.; Gabilan, N.; Laure, C. J.; Kawano, Y.; Proceedings of the XI International Conference on Raman Spectroscopy, p. 769, R. J. H. Clark e D. A. Long, eds., John Wiley & Sons, New York, 1988.
68. Dijkstra, B. W.; Renetseder, R.; Kalk, K. H.; Hol, W. G. J.; Drenth, J.; *J. Mol. Biol.* (1983) **168**, 163.
69. Frushour, B. G.; Koenig, J. L.; *Biopolymers* (1975) **14**, 649.