UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO CONFORMACIONAL DE PROTEINAS POR
ESPECTROSCOPIA RAMAN LASER E DE ABSORÇÃO
NO INFRAVERMELHO: TOXINA γ DE *Citrus serrulatus* E
FOSFOLIPASES A₂ DE *Crotalus durissus terrificus* E DE
PÂNCREAS DE PORCO E SEU ZIMOGENIO

ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÉAS

**Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor**

Area de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. YOSHIO KAWANO

SÃO PAULO
1990

A Deus todo o reconhecimento,
pela vida e por suas infinitas
possibilidades.

A memória de meu inesquecível pai, *Luiz*

A minha mãe, *Augusta*

Ao *José Alfredo* e a
nossos filhos *André*,
Joana, *Marta* e *Tomás*

Agradecimentos

Este trabalho, por modesto que seja, representa o resultado de um esforço de muitos anos de vida. Não somente dos anos de Doutorado, mas de algo que começou bem antes. Assim, sinto-me no dever de agradecer às muitas pessoas que me permitiram chegar até aqui.

A meus pais, que me transmitiram a vida e com ela a eterna dúvida e me incentivaram a buscar as respostas.

Aos meus primeiros mestres, que souberam despertar em mim o encanto pelas maravilhas do Universo em suas tão diversificadas manifestações: em particular, ao meu primeiro orientador de pesquisa, Dr. F. Galembeck, por cuja influência na formação do meu pensamento científico serei sempre grata.

Ao Prof. Yoshio Kawano, em reconhecimento pela orientação deste trabalho, e pela confiança e amizade dedicadas.

Aos amigos - colegas, professores e funcionários - do Grupo de Espectroscopia Molecular do IQUSP, pelo companheirismo e colaboração durante todos esses anos e por haverem tornado agradável e estimulante a convivência e o trabalho a seu lado. Ao Prof. D. Sala, em particular, por manter sempre presente sua benéfica influência no espírito de seriedade de trabalho, dedicação e estudo que tão bem caracterizam seu grupo de pesquisa.

A Sandra e ao Amadeu, que mais proximamente nos acompanharam no dia a dia de trabalho, pela força, amizade e companheirismo.

Aos muitos amigos do IQUSP, pela amizade e colaboração ao longo desses anos.

A Beth Cheng, pela inestimável ajuda na edição do texto; à Dalva, sempre prestativa e eficiente na solução dos problemas com o micro.

Aos Profs. C.L. Laure, J.R. Giglio, P.S. Araujo e J.A.G. Arêas, pela concessão de amostras utilizadas no trabalho.

A Profa. Iolanda Cuccovia, pelo auxílio na preparação das vesículas de lecitina.

As entidades de apoio à pesquisa - FAPESP e CNPq, - pelas bolsas de estudo concedidas.

Aquelas pessoas que ajudaram a tornar viável meu trabalho fora de casa ao longo desses anos, sobretudo à Celeste, pelo apoio doméstico e dedicação a meus filhos.

A meus familiares e amigos - sempre presentes, sempre interessados, sempre me brindando com bons augúrios; e dentre eles, também aos que já se foram, como o querido Vô Alfredo, cuja lembrança permanece viva.

Finalmente e com especial carinho ao José Alfredo, pelo incentivo, apoio e colaboração constantes, bem como por seu interesse neste trabalho; e a André, Joana, Marta e Tomás, pela inspiração que representam para mim e por seus muitos e intermináveis por quês, a certeza de que sempre haverá perguntas a se fazer e muito com que se sonhar.

Conteúdo

Resumo.....	v
Summary.....	vii
Abreviaturas.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Aplicação de técnicas vibracionais ao estudo estrutural de biomoléculas.....	7
2.1. Histórico.....	7
2.2. O fenómeno vibracional e técnicas empregadas - considerações gerais.....	9
2.3. Conformação de proteínas e análise vibracional.....	18
2.3.1. N-metilacetamida: o modelo da ligação peptídica.....	18
2.3.2. Frequências vibracionais características de conformações secundárias em polipeptídeos e proteínas: aspectos teóricos.....	23
2.3.3. Conformações de cadeias laterais.....	42
2.3.4. Vibrações de baixa frequência.....	44
3. Sistemas em estudo.....	50

3.1. Toxina γ de escorpião brasileiro <i>Tityus serrulatus</i>	50
3.2. Fosfolipases A_2	58
3.2.1. Fosfolipase A_2 de veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e o complexo crotóxina.....	61
3.2.2. Fosfolipase e profosfolipase A_2 de pâncreas de porco.....	71
4. Materiais e métodos experimentais e de análise.....	76
4.1. Isolamento e purificação de proteínas.....	76
4.1.1. Toxina γ de escorpião brasileiro <i>Tityus serrulatus</i>	76
4.1.2. Fosfolipase A_2 (fosfatidilcolina 2- acilhidrolase, E.C. 3.1.1.4.) de pâncreas de porco e seu zimogênio (profosfolipase A_2).....	77
4.1.3. Fosfolipase A_2 de <i>Crotalus durissus</i> <i>terrificus</i>	80
4.2. Sistemas lípide-proteína.....	81
4.3. Métodos espectroscópicos.....	83
4.3.1. Espectroscopia de espalhamento Raman laser.....	83

4.3.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	85
4.4. Análise espectral Raman.....	87
4.5. Preparação de amostras para estudos espectroscópicos.....	90
5. Resultados.....	92
5.1. Estudo vibracional da toxina γ de <i>Tityus serrulatus</i>	92
5.2. Estudo vibracional das fosfolipases A_2 : CdtPLA ₂ , ppPLA ₂ e pcProPLA ₂	97
5.3. Estudo espectroscópico Raman de lípidos e moléculas correlatas.....	119
5.4. Estudo espectroscópico Raman de sistemas do tipo lípido/proteína.....	126
6. Discussão.....	134
6.1. Frequências de modos vibracionais conformacionalmente sensíveis observados em espectros de polipeptídeos e proteínas: subsídios para discussão.....	134
6.2. Toxina γ de <i>Tityus serrulatus</i>	145
6.3. Fosfolipases A_2	151
6.3.1. Interações enzima/substrato e seus análogos: modelos para a interação lípido/proteína.....	166

6.3.2. Aspectos estruturais e sua ligação com a neurotoxicidade.....	172
7. Conclusões.....	174
8. Referências bibliográficas	177

Resumo

Técnicas espectroscópicas vibracionais Raman e infravermelho foram utilizadas no estudo conformacional de algumas proteínas de interesse biológico, no que se refere a aspectos estruturais de seus esqueletos polipeptídicos e microambientes de cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos.

O trabalho foi dividido em dois grupos, de acordo com os sistemas em estudo:

a) Toxina γ do veneno de escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*.

A análise vibracional revelou que o esqueleto polipeptídico dessa proteína consiste de diferentes estruturas secundárias, com predominância de folhas β , seguida por estruturas do tipo não regular e α -hélice, com alguma evidência de dobras β . Conformação gauche-gauche-gauche foi detectada para os segmentos C α S α S α C α das quatro pontes dissulfeto. A intensidade do dubleto Raman da Tyr a 853 e 828 cm^{-1} indicou que 4 dentre 5 resíduos de Tyr encontram-se expostos na superfície molecular. Também há indicações de que os 3 resíduos de Trp apresentem localização externa. Sob o ponto de vista qualitativo, as características conformacionais da toxina no estado sólido amorfo e em solução são virtualmente as mesmas.

b) Fosfolipases A_2 de pâncreas de porco e de *Crotalus durissus terrificus*.

Mudanças conformacionais foram detectadas para as moléculas de fosfolipase como consequência de diferentes condições experimentais tais como mudança de estado físico, presença de certas espécies iônicas e interação com um

análogo de substrato e com o próprio substrato. Características conformacionais discrepantes foram observadas para a forma sólida amorfa e forma cristalina da fosfolipase pancreática. Transições conformacionais foram detectadas para a transformação zimogênio $\rightarrow$ fosfolipase A₂ e diferentes conteúdos estruturais foram calculados para a forma tóxica e atóxica dessa enzima. Todas essas mudanças conformacionais envolveram basicamente a arquitetura do esqueleto polipeptídico, não afetando a conformação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. As pontes dissulfeto apresentaram consistentemente uma conformação ggg a qual não foi perturbada por nenhuma das condições experimentais empregadas. A ocorrência externa de resíduos de triptofano constituiu uma característica comum para os sistemas ensaiados, assim como a localização predominante de resíduos de tirosina em microambientes hidrofílicos, provavelmente na superfície molecular.

Summary

Raman and infrared spectroscopies were used to investigate conformational features of some proteins of biological interest, in what concerns structural aspects of their polypeptide backbones and microenvironments of certain amino acid residue side-chains.

The work has been divided in two groups as related to the systems studied:

a) Toxin γ from the venom of the Brazilian scorpion *Titivus serrulatus*.

The vibrational analysis has revealed that the protein polypeptide backbone consists of different secondary structures, with predominance of β -sheet, followed by unordered structure and α -helix, with some evidence of β -turns. A gauche-gauche-gauche (ggg) conformation for the CDSGCC fragments of the four disulfide bridges has been detected. The intensity of the Tyr Raman doublet at 853 and 828 cm^{-1} indicated that 4 out of the 5 Tyr residues are exposed at the molecular surface. External localization of the 3 Trp residues has also been indicated. Under a qualitative point of view, conformational features of the toxin in the amorphous solid state and in solution were virtually the same.

b) *Crotalus durissus terrificus* and porcine pancreatic phospholipases A_2 .

Conformational changes were detected for the phospholipase molecules as a consequence of different conditions such as change of physical state, presence of certain ionic species and interaction with a model substrate analog and with the substrate itself. Amorphous and

crystalline solid pancreatic phospholipases presented discrepant conformational features. Conformational transitions were detected for the pancreatic zymogen $\rightarrow$ phospholipase A₂ transformation and different secondary structures contents were observed for the toxic and the non toxic phospholipase molecules. All those structural changes have been shown to involve primarily the architecture of the polypeptide backbone rather than the conformation of amino acid residue side-chains. Disulfide bridges have shown consistently a ggg conformation which has not been disturbed by any of the experimental conditions employed. The external occurrence of tryptophan residues has been a common feature for the systems assayed, as well as the predominant localization of tyrosine residues in hydrophylic environments, probably at the molecular surface.

Abreviaturas

PLA₂ - fosfolipase A₂
ppPLA₂ - fosfolipase A₂ de pâncreas de porco
ppProPLA₂ - profosfolipase A₂ de pâncreas de porco
CdtPLA₂ - fosfolipase A₂ de *Crotalus durissus terrificus*
SDS - dodecilsulfato de sódio
DFP - diisopropilfluorofosfato
prot - proteína
 ν_s - estiramento simétrico
 ν_{as} - estiramento antissimétrico
 δ - deformação angular no plano
t - twist
r - rocking
I - intensidade espectral relativa na frequência assinalada
 f_α - fração de resíduos em α -hélice
 f_β - fração de resíduos em folhas β
 f_R - fração de resíduos em conformação aperiódica
C - constante escalar para a intensidade da banda a 1448 cm⁻¹

• 1. Introdução

A elucidação de funções biológicas em termos de estrutura molecular constitui uma questão de grande relevância na Bioquímica moderna. As investigações científicas ao longo das últimas décadas tem permitido um considerável avanço no conhecimento relativo a estrutura e conformação de macromoléculas biológicas, graças sobretudo ao desenvolvimento de técnicas espectroscópicas adequadas a esse tipo de abordagem. No entanto, apesar de todo o esforço que tem sido empreendido, relativamente poucos são até hoje os biopolímeros cuja estrutura tridimensional esteja completamente elucidada. Tal fato se deve, de um lado, à complexidade de tais moléculas e de outro à limitação imposta pelas técnicas adotadas.

Proteínas constituem, sem dúvida, uma das categorias de macromoléculas mais estudadas, cuja investigação se reveste de particular interesse dada a importância que assumem do ponto de vista quer estrutural quer funcional, em sistemas biológicos.

Proteínas destacam-se como elementos chave para a compreensão de muitos fenômenos biologicamente críticos tais como transporte, conversão de energia, catálise enzimática, especificidade imunológica, para muitos dos quais um conhecimento ainda insuficiente é disponível. Em vários casos, a falta de um detalhamento estrutural mais preciso das moléculas envolvidas representa o agravamento de dificuldades inerentes aos sistemas, decorrentes de sua própria complexidade.

No contexto químico, as moléculas proteicas 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 de estrutura tridimensional são desse modo muito peculiares, assumindo papel crítico no que se refere à função biológica dessas moléculas. No entanto, apesar da evidente complexidade de tais compostos, para a qual contribuem ainda o enorme número de átomos envolvidos em sua estrutura e os diversos níveis de estruturação assumidos por seu esqueleto polipeptídico, é possível racionalizarem-se muitas de suas propriedades biológicas a partir da compreensão dos princípios que sustentam sua organização estrutural.

Nesse aspecto, a utilização de técnicas físico-químicas e 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.

Métodos espectroscópicos vibracionais (Raman e infravermelho) inserem-se nesse contexto como recurso valioso na abordagem de aspectos ligados à conformação de proteínas. Informações obtidas por técnicas vibracionais permitem que se conheçam aspectos relativos à estrutura secundária do esqueleto polipeptídico através da análise dos modos vibracionais amida; a técnica Raman em particular permite ainda que se investiguem os microambientes das cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos, tais como tirosina, triptofano, metionina, entre outros, bem como características geométricas de algumas ligações de interesse como no caso das pontes dissulfeto.

Apesar do crescente aprimoramento de recursos instrumentais, características inerentes a cada técnica

limitam sua aplicabilidade e definem a abrangência das informações que delas podem advir. Dentro da pesquisa estrutural torna-se então necessário, em grande parte das vezes, concorrer-se com informações geradas por técnicas diversas de modo a se construir uma imagem mais completa da macromolécula em estudo.

Neste trabalho, apresentamos o estudo vibracional Raman/infravermelho das proteínas: toxina γ de veneno de escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* e fosfolipases A_2 de veneno de cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e de pâncreas de porco bem como o zimogênio desta última.

A primeira delas (toxina γ) consiste numa proteína de peso molecular 6000, sequenciada (BECHIS et alii, 1984 e POSSANI et alii, 1985), com ponto isoelétrico na faixa básica, classificada dentro do tipo β das neurotoxinas e sobre a qual não se tem ainda disponível informação cristalográfica. Dados estruturais são disponíveis somente para a toxina de espécies assemelhadas (FONTECILLA-CAMPS et alii, 1982). É possivelmente uma das frações de maior toxicidade do veneno de *Tityus serrulatus*. Com notável afinidade por canais de sódio de membranas excitáveis, os quais se constituem em seus sítios de ligação na ação tóxica, a toxina γ constitui-se numa ferramenta de grande utilidade para o estudo dessas estruturas, constituindo-se assim em importante instrumento da pesquisa neuroquímica e neurofisiológica. Informações estruturais mais precisas acerca dessa proteína tornam-se desse modo desejáveis não só em razão da compreensão de seu mecanismo de ação como também em vista de seu emprego como sonda no estudo da estrutura de canais de membrana, uma área de investigação de crescente importância em Biofísica.

Outro objeto de estudo desta tese são as fosfolipases A_2 (fosfatidilcolina 2-acilhidrolase, E.C. 3.1.1.4.). Com

peso molecular na faixa de 14000 e ponto isoelétrico na região neutro-básica (dependendo da origem), essas enzimas clivam especificamente a ligação acila do carbono 2 de 3-sn-fosfoglicerídeos, constituindo-se assim em importante instrumento para o estudo das interações lípide-proteína, tão relevantes no contexto bioquímico.

A fosfolipase A_2 e sua proenzima obtidas de pâncreas de porco tem suas sequências de aminoácidos determinadas (DE HAAS et alii., 1970 a,b) e estrutura cristalográfica de raios X conhecida (DIJKSTRA et alii., 1983). No entanto, o estudo conformacional em solução envolvendo interações e condições de meio biologicamente relevantes constitui campo aberto de trabalho. A enzima em mamíferos ocorre como resultado da cisão do heptapeptídeo N-terminal de uma proenzima pancreática, a qual desse modo transforma-se na enzima ativa, num processo que possivelmente envolve transição conformacional.

Atividade fosfolipásica A_2 é também encontrada em muitos venenos de cobras, abelhas, etc. e nesse caso a atividade tóxica da enzima sobre mamíferos define o enorme interesse dedicado a seu estudo. Em veneno de cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*, a fosfolipase A_2 apresenta uma ocorrência singular como componente do complexo crototoxina o qual constitui a mais tóxica e preponderante fração do veneno dessa espécie. Apesar de bastante estudado desde seu isolamento em 1938 por SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, somente em 1956 foi evidenciada por FRANKEL-CONRAT e SINGER a não homogeneidade desse complexo, com o subsequente isolamento (RUBSAMEN et alii., 1971 e HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971) de seus dois componentes proteicos: crotapotina ou crototoxina A, componente atóxico e fosfolipase A_2 ou crototoxina B, com atividade tóxica. Verificou-se que a associação entre esses componentes intensifica em várias ordens de grandeza a toxicidade da

fosfolipase isolada (RUBSAMEN et alii, 1971). Demonstrou-se ainda que esses componentes estão associados não covalentemente no complexo numa estequiometria molar 1:1 (BREITHAUPT et alii, 1975). Supõe-se que a função do componente atóxico no complexo seja a de resguardar a fosfolipase de interações espúrias com sítios inespecíficos, dirigindo-a para as superfícies específicas onde se dará a ação tóxica (JENG et alii, 1978 e BON et alii, 1979). Esses efeitos tem sido muito estudados e acredita-se que transições conformacionais desempenhem neles papel de crítica importância. A fosfolipase do complexo crotoxina teve seu sequenciamento de aminoácidos completado recentemente (AIRD et alii, 1986) e não há informações cristalográficas disponíveis até o presente.

A parte o interesse inerente a cada uma das fosfolipases estudadas neste trabalho, conforme exposto nos parágrafos anteriores, deve-se acrescentar a possibilidade de se estabelecerem parâmetros comparativos entre as conformações de duas enzimas homólogas com mesma ação catalítica e comportamento tóxico discrepante, quais sejam as fosfolipases A₂ de pâncreas de porco e de cascavel. Recentemente, RENETSEDER et alii (1985) confrontaram as estruturas cristalográficas de raios X da fosfolipase A₂ monomérica bovina com os protômeros da fosfolipase A₂ dimérica de *Crotalus atrox*, tomados individualmente; eles apresentaram evidências de uma similaridade tridimensional entre eles, junto com evidentes discrepâncias em alguns detalhes estruturais da arquitetura molecular, possivelmente relacionados com a ação tóxica. A perspectiva de um estudo conformacional comparado em solução, teoricamente viável através da técnica Raman, abre ao trabalho um campo de grande interesse especulativo a respeito das prováveis interrelações estrutura/função nessas moléculas, em situações experimentais bioquimicamente relevantes.

Em vista do exposto, propomos como objetivos específicos deste trabalho investigar:

a) alguns aspectos da estrutura secundária dos esqueletos polipeptídicos de "toxina" de veneno de *Tityus serrulatus* e de fosfolipases A_2 de *Crotalus durissus terrificus* e de porco e seu zimogênio, bem como algumas características de geometria e microambientes de cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos.

b) discrepâncias e/ou semelhanças conformacionais entre fosfolipases A_2 pancreática e crotálica.

c) possíveis transições conformacionais relacionadas à transformação zimogênio→enzima ativa na fosfolipase pancreática.

d) dependência de aspectos conformacionais da molécula de fosfolipase A_2 quanto a estado físico, condições de meio tais como pH, composição iônica e interação com o substrato ou seus análogos, possíveis modelos para posteriores estudos sobre a interação lípide-proteína.

E ainda objetivo geral deste trabalho enfocar a utilidade de técnicas espectroscópicas vibracionais ao estudo de proteínas e sua potencialidade como recurso na elucidação de características estruturais nesses biopolímeros.

2. Aplicação de técnicas vibracionais ao estudo estrutural de biomoléculas.

2.1. Histórico.

Os métodos espectroscópicos vibracionais Raman e infravermelho são hoje amplamente utilizados no estudo estrutural de proteínas. No entanto, até que se chegasse ao estágio atual, um longo caminho precisou ser percorrido, no qual o aprimoramento instrumental representou papel crítico. Os aspectos referentes à utilização da técnica Raman, em particular, constituem um bom exemplo de como esse desenvolvimento tecnológico vem contribuindo decisivamente para o avanço da aplicabilidade do método vibracional a sistemas biológicos.

Os primórdios da utilização da espectroscopia Raman em moléculas de interesse biológico tiveram lugar com os estudos pioneiros de EDSALL (1936) 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 culminaram na obtenção e análise do primeiro espectro Raman de proteína, o espectro da lisozima, publicado em 1958 por GARFINKEL e EDSALL, 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 foi o marco dessa nova fase. A partir daí a técnica tem sido extensivamente usada e a literatura registra expressivo número de trabalhos de revisão e livros recentes sobre o tema (KRIMM e BANDEKAR, 1986; CAREY, 1982; PARKER, 1983; SPIRO, 1988) enfocando aspectos teóricos e aplicações diversas do método vibracional a moléculas e sistemas de interesse biológico. A técnica vibracional Raman e Raman ressonante vem sendo utilizada no estudo de sistemas de interesse biológico os mais diversos, tais como membranas (SNYDER et alii, 1980, CARRIER e PEZOLET, 1986), lípides (MENDELSON e KOCH, 1980), carboidratos (BARRET e PETICOLAS, 1979), proteínas virais (THOMAS et alii, 1986 a), THOMAS, 1987), ácidos nucleicos (INCARDONA et alii, 1987), complexos enzima-substrato, anticorpo-hapteno, droga-receptor (CAREY, 1982), venenos de serpentes (THOMAS et alii, 1986 b). Particularmente no caso de biopolímeros, a disponibilidade de lasers de alta potência, a variedade de radiações excitantes aliadas à existência de melhores espectrômetros tornaram mais abrangente o emprego da técnica. A constante implementação de novos recursos tecnológicos tais como aqueles referentes à utilização de espectrômetros interfaciados a computadores ou a novos sistemas de detecção, por exemplo, tem contribuído decisivamente nos dias de hoje para o contínuo aprimoramento da qualidade de investigação na área de biomacromoléculas e mesmo de sistemas biológicos "in vivo" (WEBB, 1980, KOYAMA et alii, 1979).

2.2. O fenômeno vibracional e técnicas empregadas — considerações gerais

Dentro de uma aproximação razoável, pode-se considerar que a energia de uma molécula é o resultado de contribuições das energias eletrônica, vibracional, rotacional e translacional. Transições de energia geralmente envolvem fenômenos de absorção ou emissão de radiação em regiões específicas do espectro eletromagnético. No caso das vibrações moleculares, que constituem o fenômeno abordado nesta tese, tais transições dão origem a bandas de absorção na região infravermelha do espectro.

Além dos fenômenos de absorção e emissão de luz, outro evento pode resultar da interação da radiação eletromagnética com a matéria — o espalhamento. Fenômenos de espalhamento entre luz e partícula (efeito Tyndall) e luz e moléculas (efeito Rayleigh) resultam em luz espalhada de mesma frequência em relação à radiação incidente. Em 1928, no entanto, C.V. RAMAN e K.S. KRISHNAN demonstraram experimentalmente a ocorrência de um tênue efeito de espalhamento em que a frequência da luz espalhada difere da frequência da luz incidente. A origem física do fenômeno reside na ocorrência de colisões inelásticas entre as moléculas da substância irradiada e os fótons da luz incidente, de tal modo que as energias dos fótons espalhados são aumentadas ou diminuídas em relação aos fótons excitantes por incrementos quantizados que correspondem a diferenças de energia nos níveis vibracionais e rotacionais da molécula. Este efeito, que passou a ser conhecido como efeito Raman, havia sido previsto teoricamente por SMEKAL, alguns anos antes (1923).

As técnicas espectroscópicas vibracionais de absorção no infravermelho e de espalhamento Raman fornecem portanto

informações sobre transições entre níveis de energia vibracional da molécula, embora os fenômenos físicos envolvidos em cada uma delas sejam distintos, conforme exposto. Monitorando-se assim quer os fótons espalhados inelasticamente (na espectroscopia Raman), quer aqueles transmitidos pelas amostras (na espectroscopia de absorção no infravermelho) obtem-se informações sobre as vibrações moleculares, as quais por sua vez são sensíveis a características de simetria molecular bem como a peculiaridades do ambiente químico circundante do grupo molecular em questão.

Tratamento extensivo da teoria vibracional em seus vários desdobramentos pode ser encontrada em HERZBERG (1945) ou em WILSON et alii (1955). Enfoques mais condensados são disponíveis, nos quais aspectos de aplicação em Química são realçados, como em COLTHUP (1964). Em continuidade, faremos uma breve apresentação dos pontos mais fundamentais da teoria vibracional com vistas a subsidiar a discussão do item que se segue a este, no qual o fenômeno vibracional em proteínas é mais particularmente enfocado.

Considerando-se que no átomo a massa nuclear é imensamente maior que a dos elétrons, pode-se descrever a dinâmica de uma molécula, dentro de boa aproximação, em termos unicamente do movimento dos núcleos. É possível demonstrar-se que para moléculas não lineares contendo N átomos o número de graus internos de liberdade é igual a $3N-6$ e para moléculas lineares, $3N-5$. De acordo com isso, é possível ter-se uma idéia do enorme número de vibrações que podem ocorrer em moléculas poliméricas como no caso das proteínas.

Os complexos movimentos moleculares podem no entanto manifestar-se como modos normais de vibração ou vibrações normais. Em cada modo normal todos os átomos vibram na mesma

frequência e todos passam por suas posições de equilíbrio ao mesmo tempo. Os modos normais podem ter suas contribuições analisadas e tratadas separadamente, o que se constitui numa grande vantagem matemática.

O fenómeno vibracional é descrito, sob o ponto de vista da Mecânica Clássica, através do modelo do oscilador harmónico. Esse tratamento conduz à seguinte solução para o valor de frequência para uma molécula diatómica:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu} \quad \text{Equação 1}$$

onde: μ = massa reduzida = $m_1 m_2 / (m_1 + m_2)$

Esta expressão é de importância quando se quer, por exemplo, avaliar o deslocamento de frequência provocado por uma substituição isotópica no composto estudado.

É possível também demonstrar-se que as amplitudes de vibração das partículas num dado tempo t estão na razão inversa das massas. Isso significa que, considerando-se partículas de massas desiguais, a mais leve mover-se-á com maior amplitude que a mais pesada, embora ambas passem pela posição de equilíbrio no mesmo instante e oscilem a uma mesma frequência.

Para que um modo vibracional apresente atividade no infravermelho, isto é, para que se origine uma banda observável nessa região, é necessário que da interação entre a radiação eletromagnética e a molécula resulte uma mudança no momento de dipolo eléctrico (μ) da mesma durante a vibração.

O momento de dipolo eléctrico (μ) de um sistema é um vetor formado pelos componentes μ_x , μ_y e μ_z e definido por:

$$\begin{aligned}
 \mu_x &= \sum_n e_n x_n \\
 \mu_y &= \sum_n e_n y_n \\
 \mu_z &= \sum_n e_n z_n
 \end{aligned}
 \tag{Equação 2}$$

onde: e_n = carga da partícula de ordem n

x_n, y_n, z_n = coordenadas cartesianas da partícula de ordem n

$\sum_n$ = somatório sobre todas as partículas

Para que um modo vibracional seja ativo no Raman é necessário que da interação entre a radiação eletromagnética com a molécula resulte uma mudança no momento de dipolo induzido (π) da mesma. Isso permite que ligações homopolares, inativas no infravermelho, possam ser aqui detectáveis. O momento de dipolo induzido se relaciona com a força do campo elétrico E da radiação através do tensor de polarizabilidade elétrica (α) da molécula, de acordo com a expressão:

$$\begin{aligned}
 \pi_x &= \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \\
 \pi_y &= \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \\
 \pi_z &= \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z
 \end{aligned}
 \tag{Equação 3}$$

Considerando-se que a configuração da molécula se altera periodicamente durante a vibração, tem-se que a radiação espalhada, no caso Raman, será modulada pelas frequências de vibração de tal modo que será constituída de luz com frequências iguais à soma e à diferença entre a frequência incidente e as frequências dos movimentos moleculares, além da própria frequência incidente.

Para um tratamento mecânico-quântico do fenômeno vibracional, a dualidade onda-partícula da luz e a quantização dos níveis de energia da molécula devem ser considerados. Na figura 1 (curva de energia potencial)

pode-se observar que os espaçamentos entre os níveis vibracionais contidos em um dado estado eletrônico são pequenos se comparados à separação entre os níveis eletrônicos (figura 2). Esses espaçamentos tendem a aproximar-se à medida que o número quântico vibracional aumenta (figura 1).

Figura 1: Curva de energia potencial de um oscilador diatômico

O modelo mecânico-quântico para os diversos tipos de espalhamento da radiação decorrentes de sua interação com a matéria pode ser melhor acompanhado com a observação da figura 2, a qual reproduz um esquema elaborado por CAREY (1982). Nela também se encontram indicados os processos de fluorescência e de absorção no infravermelho, para melhor visualização.

O espalhamento de luz no modelo mecânico-quântico é basicamente um processo de dois fótons. 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

Figura 2: Algumas das possíveis consequências da interação fóton-molécula: a) absorção no infravermelho; b) espalhamento Rayleigh; c) espalhamento Raman anti-Stokes; d) espalhamento Raman Stokes; e) Espalhamento Raman pré-ressonante; f,g) espalhamento Raman ressonante h) fluorescência.

é dito virtual ou intermediário. O segundo estágio envolve a liberação de um fóton após um intervalo de tempo muito curto ($< 10^{-14}$ s). Observa-se que no 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 2. 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 vários 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 2 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. O tratamento teórico para as intensidades das linhas Raman em condições de ressonância foi desenvolvido por ALBRECHT em 1961 e conhecido como teoria do acoplamento vibrônico (TANG e ALBRECHT, 1970). Metaloproteínas em geral ou proteínas ligadas a grupos cromóforos constituem os principais exemplos de aplicação do efeito Raman ressonante a sistemas biológicos. Em razão das características peculiares a nossos sistemas, não incluímos este tipo de estudo em nosso trabalho.

Um outro aspecto de importância que cumpre destacar, sobretudo por sua participação como parâmetro utilizado neste trabalho, é a intensidade das linhas Raman em condições não ressonantes. Sob o ponto de vista clássico, a

intensidade I de uma linha Raman em condições não ressonantes é dada pela expressão:

$$I = k (\nu_0 - \nu_{\text{vib}})^4 I_0 (d\alpha_{xx}/dr)^2 \quad \text{Equação 4}$$

onde:

k = constante

I_0 = intensidade da luz incidente

r = distância que separa os núcleos m_1 e m_2

α_{xx} = componente do tensor de polarizabilidade

ν_0 = frequência da radiação incidente

ν_{vib} = frequência vibracional

Esta equação mostra que a intensidade Raman é proporcional à 4ª potência da frequência da luz espalhada. Isto indica que há uma barreira natural à extensão dos estudos Raman em direção à região do infravermelho no espectro eletromagnético, já que o fator ν^4 torna-se pequeno à medida que ν diminui. Também está indicada a dependência que a intensidade apresenta com a mudança da polarizabilidade em função de r (distância de ligação), causada pela vibração da molécula ao longo da ligação interatômica.

PLACZEK, em 1934, desenvolveu uma teoria mecânico-quântica para lidar com o problema das intensidades Raman. Essa teoria é conhecida como teoria da polarizabilidade. De acordo com ela, a intensidade total da luz espalhada para moléculas aleatoriamente orientadas é dada pela expressão:

$$I = K (\nu_0 \pm \nu_{mn})^4 I_0 \sum_{\sigma, \rho} |(\alpha_{\sigma\rho})_{mn}|^2 \quad \text{Equação 5}$$

em que:

$$(\alpha_{\sigma\rho})_{nm} = \frac{1}{h} \sum_r \frac{\langle n | \mu_\rho | r \rangle \langle r | \mu_\sigma | m \rangle}{\nu_{rm} - \nu_0 + i\Gamma_r} + \frac{\langle n | \mu_\sigma | r \rangle \langle r | \mu_\rho | m \rangle}{\nu_{rn} + \nu_0 + i\Gamma_r}$$

o

Equação 6

Considera-se nessas expressões que a molécula se encontra no estado molecular m . Ao ser perturbada por uma onda eletromagnética de frequência ν_0 e intensidade I_0 , ocorre a transição para o estado n e a luz é espalhada com uma frequência $\nu_0 \pm \nu_{mn}$. O somatório sobre r cobre todos os autoestados da molécula. O termo Γ_r é uma constante de amortecimento que leva em conta o tempo de vida finito de cada estado molecular e h é a constante de Planck. Os termos $\langle n | \mu_p | r \rangle$, etc. são as amplitudes dos momentos de transição de dipolo elétrico, em que μ é o operador do momento de dipolo elétrico na direção p .

Em espectros não ressonantes, tanto as intensidades como as posições (número de onda) das bandas Raman relacionam-se unicamente com propriedades do estado fundamental. Sob condições de ressonância, no entanto, somente a frequência das bandas relaciona-se com o estado fundamental; as intensidades nesse caso estão relacionadas com o estado eletrônico excitado da molécula, permitindo que informações únicas possam ser obtidas sobre esses estados, cujo estudo no contexto biológico é relevante no que se refere à compreensão de processos de grande interesse como fotossíntese, visão, entre outros.

Outras extensões da técnica Raman tem sido desenvolvidas nos últimos anos. Dentre elas destaca-se o SERS (surface enhanced Raman spectroscopy), o qual apresenta potencial interesse no estudo de sistemas biológicos sob dois principais aspectos: no estudo de sistemas em que fenômenos de superfície sejam de importância e na investigação de sistemas que produzam fraco sinal, como forma de intensificá-lo.

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 tais como filmes, géis, cristais, pós amorfos, soluções, superfícies, etc. Além disso pequenos volumes de material são necessários, uma vez que o tamanho do feixe laser focalizado (tipicamente $0,005 \times 0,2$ cm) é o que define o limite mínimo 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 NMR, por exemplo.

Entre os aspectos desfavoráveis tem-se a possibilidade de ocorrência de efeitos fotoquímicos indesejáveis decorrentes de exposição da amostra a alto fluxo de fótons do feixe laser; a inerente baixa ocorrência do efeito Raman (cerca de 10^{-6} em relação ao espalhamento Rayleigh) 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.

2.3. Conformação de proteínas e análise vibracional

2.3.1 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 (1958) refere 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 estudo das coordenadas normais desse composto levou ao conhecimento da natureza das vibrações de seus diversos modos amida e outras vibrações normais. 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.

As vibrações amida no plano manifestam-se no espectro vibracional como 4 bandas características observadas na região 600-1800 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 cm^{-1} e corresponde predominantemente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ (80%). Menos significativas são as contribuições do estiramento CN (10%) e da deformação angular 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 $\text{C}-\text{N}$ e o estiramento $\text{C}=\text{O}$ é de -0,4:1,0. A amplitude de deformação angular $\text{N}-\text{H}$ é da mesma ordem que o estiramento $\text{C}=\text{O}$.

Amida I' - Corresponde à banda amida I de espécies deuteradas. O deslocamento de frequência é pequeno, devido, como se viu, à pequena contribuição da deformação angular NH para esse modo.

Amida II - Esse modo é representado pela deformação angular no plano do grupo N-H (60%) e pelo estiramento C-N (40%). A banda aparece a cerca de 1550 cm^{-1} e sua natureza tem dado margem a controvérsias. Segundo MIYAZAWA (1960), os vetores de deslocamento atômico para esse modo são os mostrados na figura abaixo. A deformação angular 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 N-H, o que é consistente com os vetores de deslocamento atômico da figura abaixo. Outras atribuições anteriores ao trabalho de MIYAZAWA (1960) foram descartadas, tais como a atribuição única ao estiramento C-N, a interação da deformação angular N-H com o estiramento simétrico do grupo $\text{O}=\text{C}-\text{N}$, ou a existência do grupo peptídico em outra forma tautomérica.

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

Amida III - Banda observada na região de 1230 a 1300 cm^{-1} , para a qual contribuem o estiramento C-N (40%), a deformação angular no plano N-H (30%) e o estiramento CH_3 -CH (20%). As ligações C-N e 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 N-H é predominante. Não podem ser desprezadas as contribuições do estiramento C- CH_3 e da deformação angular O=C-N, no caso da N-metilacetamida. O momento de transição desse modo tem sua direção aproximadamente perpendicular à ligação N-H.

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

Amida IV - Banda observada a cerca de 630 cm^{-1} para amidas do tipo $\text{R-CH}_2\text{-CO-NH-R}$ e a cerca de 780 cm^{-1} para amidas do tipo H-CO-NH-R . É devida à deformação O=C-N na diformilhidrazina. Na N-metilacetamida, a contribuição do estiramento C- CH_3 é também importante e o resultado da interação dessas vibrações resulta num deslocamento da frequência de deformação O=C-N para 627 cm^{-1} nesse composto. Esse modo não se restringe ao grupo peptídico, sendo raramente observável nos espectros Raman ou infravermelho (TU, 1982).

Amidas V, VI e VII - Constituem bandas vibracionais associadas a vibrações fora do plano, antissimétricas em relação ao plano 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 do papel 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 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

2.3.2. Frequências vibracionais características de conformações secundárias em polipeptídeos e proteínas : aspectos teóricos

As frequências e formas das bandas espectrais referentes aos modos normais de vibração de uma molécula polipeptídica são dependentes, dentre outros fatores, de sua estrutura tridimensional e de interações intra/inter moleculares que se estabeleçam.

Para o caso de moléculas pequenas, é viável derivarem-se informações sobre estrutura molecular e forças envolvidas nas ligações diretamente a partir do espectro vibracional. No entanto, para macromoléculas, como no caso de proteínas, a abordagem de escolha tem sido a busca de correlações entre as bandas observadas e aspectos estruturais conhecidos de moléculas assemelhadas. Tal abordagem tem sido relativamente efetiva porque, embora rigorosamente deva-se entender que de modo geral todos os átomos de uma molécula participam de um dado modo vibracional, para alguns grupos de átomos o movimento molecular encontra-se altamente concentrado no grupo em questão e essencialmente não se altera de uma molécula para outra. Embora esse tipo de abordagem (chamado de frequência de grupo) venha fornecendo informação significativa sobre estrutura e interações de polipeptídeos, inevitavelmente produz uma visão incompleta em comparação com o conhecimento detalhado que se pode obter a partir de uma análise mais rigorosa como aquela que envolve o cálculo de coordenadas normais .

De um modo geral pode-se afirmar que, sob condições não ressonantes , um espectro Raman de proteína consiste de contribuições vibracionais de cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos juntamente com modos originários do esqueleto polipeptídico. Dentre esses últimos, os modos vibracionais amida I e III, sobretudo, tem sido amplamente

usados na caracterização da estrutura secundária do esqueleto polipeptídico em proteínas.

Os modos vibracionais amida de polipeptídeos podem sofrer desdobramentos como resultado de interações intra e inter moleculares. A sustentação teórica para esse efeito foi desenvolvida por MIYAZAWA (1960) através de uma teoria de perturbação na qual o autor considera que as frequências observadas para os modos amida podem ser equacionadas a uma frequência sem perturbação acrescida da contribuição de termos de interação inter e intra moleculares. Evidência de que a origem física de tal perturbação se deve ao acoplamento dos dipolos de transição dos grupos amida foi indicada por KRIMM e colaboradores (BANDEKAR e KRIMM, 1979 e referências aí citadas).

A teoria de perturbação de MIYAZAWA (1960) foi desenvolvida para as vibrações amida I e II de polipeptídeos, empregando-se um modelo de osciladores fracamente acoplados. O tratamento utiliza coordenadas normais dos grupos peptídicos incorporados na cadeia polipeptídica. A coordenada normal do grupo de ordem k (q_k) é aquela cuja energia cinética T_k e energia potencial V_k são expressas por:

$$T_k = \frac{1}{2} \dot{q}_k^2 \quad \text{Equação 7}$$

e

$$V_k = \frac{1}{2} \lambda_0 q_k^2 \quad \text{Equação 8}$$

onde:

$$\lambda_0 = 4\pi^2 \nu_0^2$$

$$\nu_0 = \text{frequência vibracional}$$

A essas energias (cinética e potencial), isentas de perturbação, acrescentam-se os termos decorrentes das interações ao longo de toda cadeia polipeptídica. As expressões tornam-se desse modo:

$$T = \frac{1}{2} \sum_k \dot{q}_k^2 + \sum_{k < l} A_{kl} \dot{q}_k \dot{q}_l \quad \text{Equação 9}$$

e

$$V = \frac{1}{2} \lambda_0 \sum_k q_k^2 + \lambda_0 \sum_{k < l} B_{kl} q_k q_l \quad \text{Equação 10}$$

em que, para cada equação, o primeiro termo corresponde à soma da energia das vibrações sem perturbação e o segundo termo resulta das interações vibracionais entre os vários grupos peptídicos da cadeia. Os termos $A_{kl} \dot{q}_k \dot{q}_l$ e $B_{kl} q_k q_l$ são os termos de interação da energia cinética e da energia potencial, respectivamente, entre os grupos de ordem k e l entre si.

O desenvolvimento matricial dessas equações (segundo método de matrizes GF de Wilson, WILSON et alii, 1955) para o cálculo de frequências, considerando-se um modelo de infinitos osciladores equivalentes, conduz à expressão:

$$\nu(s) = \lambda^* / 2\pi = \nu_0 + \sum_s D_s \cos s \delta \quad \text{Equação 11}$$

onde:

δ = ângulo de fase

$\lambda_0 = 4 \pi^2 \nu_0^2$

ν_0 = frequência vibracional

$D_s = (B_s - A_s) \nu_0$ Equação 12

em que A_s e B_s correspondem aos termos de interação da energia cinética e potencial, respectivamente, e o índice s refere-se à separação entre os 2 grupos l e k ($s \equiv l - k$).

A equação 11 portanto mostra que o deslocamento de frequência devido às interações vibracionais intergrupo é

proporcional a $\cos \delta$ e à diferença entre os coeficientes de energia potencial (B_0) e de energia cinética (A_0). As equações 11 e 12 aplicam-se a quaisquer polímeros helicoidais, com ou sem ligações de hidrogênio. Embora numa cadeia helicoidal infinita o ângulo de fase possa ter qualquer valor, apenas dois deles darão origem a vibrações ativas no infravermelho, segundo HIGGS (1953): a) aquele em que o ângulo é igual a zero e portanto o momento de transição é paralelo ao eixo da hélice e b) aquele em que o ângulo é igual a χ e o momento de transição é perpendicular ao eixo.

A equação 11 poderá ser estendida ao caso específico da α -hélice. Esta é uma conformação, como se verá adiante, em que 3,6 grupos peptídicos são encontrados por volta e ligações de hidrogênio se formam entre pares de peptídeos, a cada 3 vizinhos. Desse modo, o termo de interação D_3 aqui será tão importante quanto o termo D_1 , para grupos adjacentes na cadeia. Assim, a frequência da banda paralela será:

$$\nu(0) = \nu_0 + D_1 + D_3 \quad \text{Equação 13}$$

e a da banda perpendicular:

$$\nu(\chi) = \nu_0 + D_1 \cos \chi + D_3 \cos 3\chi \quad \text{Equação 14}$$

em que $\chi = 2\pi/3.6$

As diferenças de frequência dessas bandas dependerão dos valores de D_1 e D_3 .

Dados espectrais de infravermelho obtidos por MIYAZAWA (1960) para um filme orientado de poli- γ -benzil-L-glutamato, o qual se apresenta na conformação α -helicoidal, indicaram que as bandas amida I paralela (forte) e

perpendicular (fraca) são observadas a 1650 e 1652 cm^{-1} , respectivamente. As bandas amida II paralela (fraca) e perpendicular (forte) são observadas a 1516 e 1546 cm^{-1} , respectivamente. Após deuteração, as bandas amida II desaparecem e dão origem a uma banda a 1535 cm^{-1} , conforme esperado teoricamente pelo desaparecimento do termo referente à interação entre os grupos CONH.

Na conformação em folhas β pregueadas, cada unidade repetitiva contém 2 grupos peptídicos. Haverá duas vibrações ativas no infravermelho: uma em que grupos peptídicos adjacentes se movem em fase ($\delta=0$), o qual gera uma banda paralela e outra em que grupos adjacentes movem-se fora de fase ($\delta=\pi$), a qual origina uma banda perpendicular.

Na conformação em folhas β pregueadas não há a ocorrência de ligações de hidrogênio intracadeia e dentre as várias interações intracadeia apenas aquelas entre grupos adjacentes serão consideradas. Essas interações deslocarão a frequência da banda paralela ($\delta=0$) em $+D_1$ e a frequência da banda perpendicular ($\delta=\pi$) em $-D_1$. Além disso, deverão ser consideradas as ligações de hidrogênio intercadeias, as quais se formam com igual facilidade tanto na conformação em folhas β de cadeias paralelas como naquela com cadeias antiparalelas. Essas ligações podem deslocar as bandas amida I e II significativamente. Considerando-se somente as interações entre grupos que se tornam adjacentes através das ligações de hidrogênio intercadeias, tem-se que o deslocamento de frequência será dado por:

$$\Delta \nu(\delta) = D_1' \cos \delta' \quad \text{Equação 15}$$

onde:

δ' = ângulo de fase que se estabelece entre os movimentos de grupos adjacentes através de ligações de hidrogênio intercadeias.

$D_1' = D_1$ (definido em D_1 na equação 9)

Considerando-se as interações intracadeias e intercadeias, as frequências das bandas paralela e perpendicular serão, respectivamente:

$$\nu(0,0) = \nu_0 + D_1 + D_1' \quad \text{Equação 16}$$

$$\nu(\pi,0) = \nu_0 - D_1 + D_1' \quad \text{Equação 17}$$

onde o primeiro número que aparece no parênteses refere-se ao ângulo de fase δ e o segundo ao ângulo de fase δ' (a serem definidos a seguir).

Os deslocamentos atômicos característicos de cada uma dessas frequências vibracionais são os seguintes (MIYAZAWA, 1960):

δ corresponde ao ângulo de fase entre peptídeos adjacentes no esqueleto e δ' ao ângulo de fase entre peptídeos tornados adjacentes através de ligações de hidrogênio intercadeias. O momento de transição da vibração $(0,0)$ é paralelo ao eixo da fibra de proteína (eixo z) e é proporcional a $\sin\psi \cos\phi$ em que ϕ é o ângulo entre o grupo peptídico e o eixo da fibra e ψ é o ângulo entre o momento

de transição da vibração no plano e o eixo y (o qual por definição é paralelo à intersecção entre 2 planos peptídicos adjacentes). O momento de transição da vibração $(\pi, 0)$ é perpendicular ao eixo da fibra e seus componentes x e y são proporcionais a $\sin \psi \sin \Phi$ e $\cos \psi$, respectivamente.

Para cadeias em folhas β antiparalelas, a célula unitária corresponde a 4 grupos peptídicos: 2 de uma cadeia e 2 da cadeia adjacente. Tais cadeias podem mover-se em fase ou fora de fase e como consequência tanto a banda paralela ($\delta=0$) como a perpendicular ($\delta=\pi$) sofrem um desdobramento em 2 componentes. Tais vibrações são as seguintes:

e estão representadas nas seguintes expressões:

- a) $\nu(0,0)$ inativa no infravermelho Equação 18
- b) $\nu(0,\pi) = \nu_0 + D_1 - D_1'$ Equação 19
- c) $\nu(\pi,0) = \nu_0 - D_1 + D_1'$ Equação 20
- d) $\nu(\pi,\pi) = \nu_0 - D_1 - D_1'$ Equação 21

Atribuições de frequências observadas a 1630, 1645 e 1690 cm^{-1} aos diversos tipos de vibrações de folhas β paralelas e antiparalelas que acabamos de mostrar podem ser encontradas no trabalho original de MIYAZAWA et alii de 1960 .

Em anos subsequentes, outras contribuições significativas em termos de análise de modos normais de moléculas polipeptídicas vieram somar-se aos esforços pioneiros do grupo de MIYAZAWA. Os trabalhos de KRIMM e BANDEKAR (1986 e referências aí contidas), em particular, constituem um exemplo bastante significativo. O trabalho desse grupo tem sido, ao longo dos anos, o de buscar o desenvolvimento de um campo de força para a cadeia polipeptídica, o qual seja essencialmente transferível de uma molécula para outra. Para tanto, foram assumidos comprimentos e ângulos de ligação padrões para uma cadeia polipeptídica (de acordo com COREY e PAULING, 1953). Tais campos assim construídos são em boa aproximação independentes de particularidades de estrutura. Esses trabalhos iniciaram-se com a N-metilacetamida e progressivamente estruturas polipeptídicas mais elaboradas foram sendo estudadas, tais como a poliglicina I, a β poli(L-alanina) e a α poli(L-alanina). Os campos de força puderam desse modo ser gradualmente desenvolvidos de modo a incorporar novos aspectos de estrutura. A adequação de tais procedimentos pode ser avaliada pelo erro médio verificado nas frequências preditas de banda - cerca de 5%.

A análise de KRIMM e BANDEKAR (1986) consiste no estudo dos modos normais de uma molécula de "geometria padrão", a

qual se baseia na estrutura da N-metilacetamida. Nessa molécula, os grupos CH_3 (assinalados por *) são substituídos por pontos de massa equivalente.

A partir das coordenadas de deslocamento interno, a saber: Δr = estiramento de ligação, $\Delta \theta$ = deformação angular no plano, $\Delta \omega$ = deformação angular fora do plano, $\Delta \tau$ = variação do ângulo diedro, são definidas as coordenadas locais de simetria e calculadas as frequências e a distribuição de energia potencial. Apesar da aproximação introduzida com a substituição dos grupos metila por pontos de massa, os resultados do cálculo mostram-se bastante promissores.

Processos que utilizam campos de força convergentes de polipeptídeos distintos tem também mostrado bons resultados na análise de moléculas peptídicas, permitindo mesmo que intensidades no infravermelho possam ser reproduzidas (KRIMM e BANDEKAR, 1986) com o uso de derivadas de dipolo calculadas *ab initio* da N-metilacetamida.

A aplicação da análise vibracional ao estudo conformacional de polipeptídeos e proteínas de diversos graus de complexidade estrutural tem se constituído no grande tema de pesquisa na área. Informações dessa análise para as diversas conformações secundárias são entretanto excessivamente detalhadas para serem incluídas aqui de forma extensiva. Indicaremos portanto somente as espécies vibracionais ativas e os principais parâmetros estruturais das conformações secundárias mais relevantes no contexto biológico que tem sido investigadas através da análise vibracional.

Hélices

O conceito de hélice como a mais geral estrutura repetitiva em polipeptídeos surge pela primeira vez nos trabalhos de HUGGINS (1943) e CRANE (1950). Após a caracterização de possíveis hélices com um número inteiro de resíduos por volta (BRAGG et alii, 1950), PAULING et alii 1951 e PAULING e COREY 1951 descreveram a estrutura em α -hélice, através do emprego de critérios estereoquímicos bem definidos. Essa é a conformação helicoidal predominante encontrada em proteínas globulares, embora outras estruturas em hélice também existam.

Hélices que apresentam ligações de hidrogênio intramoleculares são geralmente designadas pelo símbolo n_m (BRAGG, 1950), onde n representa o número de resíduos por volta (com sinal negativo para hélices levógiras) e m o número de átomos contidos no "anel" que se forma pelo estabelecimento das pontes de hidrogênio. Diversos são os tipos de hélices que podem ser encontradas:

α -hélice: a α -hélice foi proposta como uma possível estrutura estável para a cadeia polipeptídica por PAULING et alii (1951) e PAULING e COREY (1951). Trabalhos subsequentes de difração de raios X de ARNOTT e colaboradores (1966, 1967) definiram com maior precisão as coordenadas atômicas. De acordo com a nomenclatura de BRAGG (1950), vista acima, a α -hélice padrão é uma hélice 3_6 .

O padrão de ligações de hidrogênio na α -hélice é $5 \rightarrow 1$ significando por convenção a ligação do hidrogênio do grupo NH do resíduo 5 ao oxigênio da carboxila do resíduo 1.

Tres são as conformações possíveis para a α -hélice, a saber hélices α I, α II e hélice goniométrica. As hélices dos dois primeiros tipos estão representadas a seguir:

As hélices αI e αII tem o mesmo número de resíduos por volta (n) e a mesma unidade de translação axial (h), mas diferem nos ângulos diedros ϕ e ψ .

A estrutura αI é aquela descrita em 1967 por ARNOTT e DOVER. Seus parâmetros estruturais são: $n = 3,62$, $h = 1,50 \text{ \AA}$ e $t = 99,6^\circ$ em que t é a rotação por resíduo ao redor do eixo da hélice. Os ângulos diedros são: $\phi = -57,4^\circ$, e $\psi = -47,5^\circ$. As ligações de hidrogênio tem os seguintes parâmetros: $l(N \dots O) = 2,86 \text{ \AA}$, $l(H \dots O) = 1,88 \text{ \AA}$, $NHO = 164,2^\circ$, $HNO = 10,3^\circ$.

A estrutura αII apresenta ângulos diedros distintos da estrutura αI . São eles: $\phi = -70,5^\circ$ e $\psi = -35,8^\circ$. Os parâmetros n e h se mantem os mesmos. Essa estrutura corresponde à segunda de duas soluções possíveis para os ângulos diedros de uma hélice com n e h constantes, de acordo com MIYAZAWA (1961). As ligações de hidrogênio, mais fracas devido à inclinação do plano peptídico em relação ao eixo da hélice apresentam os seguintes parâmetros: $l(N \dots O) = 3,00 \text{ \AA}$, $l(H \dots O) = 2,12 \text{ \AA}$, $NHO = 145,7^\circ$, $HNO = 23,5^\circ$.

Essa estrutura (hélice α II) é possivelmente de grande relevância na estrutura da bacteriorodopsina (KRIMM e DWIVEDI, 1982).

A hélice goniométrica apresenta os ângulos diedros exatamente interconvertidos em relação ao observado para a hélice α I e são portanto: $\phi = -47,5^\circ$ e $\psi = -57,4^\circ$, afetando levemente os demais parâmetros da hélice (n, h).

Essas tres possíveis conformações helicoidais tem baixa energia conformacional, já que seus ângulos diedros situam-se na faixa que se estende de cerca de $\phi = -47^\circ$, $\psi = -60^\circ$ até $\phi = -88^\circ$, $\psi = -25^\circ$, a qual segundo RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN (1968) constitui a região de baixa energia para a conformação do esqueleto polipeptídico.

Análise dos modos normais de vibração é disponível para as estruturas α I e α II, mas não para a goniométrica.

Para um modelo de hélice α I estudado por FANCONI et alii em 1969, $\alpha(\text{Ala})_n$, os modos vibracionais ativos pertencem às espécies A ($\delta = 0^\circ$), E_1 ($\delta = 99,6^\circ$) e E_2 ($\delta = 199,1^\circ$), onde δ é a diferença de fase entre movimentos em unidades adjacentes da hélice. As espécies A e E_1 são ativas tanto no Raman quanto no IR, com a espécie A exibindo dicroísmo paralelo e a espécie E_1 dicroísmo perpendicular no IR. A espécie E_2 apresenta atividade somente no Raman. Há 28 modos da espécie A, 29 e 30 das espécies duplamente degeneradas E_1 e E_2 , respectivamente.

Hélice 3_{10} : a hélice 3_{10} é encontrada ocasionalmente em proteínas, mas sua ocorrência em peptídeos contendo resíduos de ácido α -aminobutírico é bem estabelecida por análise de raios-X (BOSCH et alii, 1983). Controvérsias na literatura entretanto surgiram em razão da indicação de ocorrência de conformação em α -hélice para o peptídeo

alameticina, no qual 9 entre 20 resíduos constituem-se de ácido α -aminobutírico (FOX e RICHARDS, 1982).

Os ângulos diedros para a estrutura em hélice 3_{10} são os seguintes: $\phi = -45^\circ$ e $\psi = -30^\circ$. Os parâmetros de hélice são $n = 2,99$ e $h = 2,01$ Å. Os parâmetros das ligações de hidrogênio apresentam os seguintes valores: $1(N...O) = 2,83$ Å, $1(H...O) = 1,83$ Å, $NHO = 175,1^\circ$, $HNO = 3,2^\circ$.

Hélice 3_1 : essa é uma estrutura intermediária entre α -hélice e folhas β , da qual o exemplo típico é a poliglicina II, $(Gly)_n$ II. Dados cristalográficos para esse sistema são inexistentes, em razão da dificuldade em se produzirem espécimes bem orientados e estáveis de $(Gly)_n$ II. CRICK e RICH em 1955, no entanto, propuseram para esse composto a estrutura em hélice 3_1 através de um trabalho de modelagem molecular. Nessa conformação, as hélices encontram-se completamente ligadas umas às outras, via ligações de hidrogênio $NH...O=C$. RAMACHANDRAN et alii (1966), no entanto, justificaram a formação adicional de ligações de hidrogênio $C_\alpha-H...O=C$, propondo pequenas modificações nessa estrutura. A disposição das cadeias pode ser paralela ou antiparalela, sendo esta última a forma mais característica desse tipo de conformação. Os parâmetros estruturais da hélice 3_1 , de cadeias antiparalelas, são os seguintes: ângulos diedros: $\phi = -76,9^\circ$ e $\psi = 145,3^\circ$, com repetição axial de $c = 9,30$ Å. A estrutura antiparalela pode apresentar variações mas suas principais características são: célula ortorrômbica com $a = 8,487$ Å e $b = 4,80$ Å. A célula unitária apresenta simetria C_2 . Os modos normais de vibração classificam-se em 62 espécies A e 61 espécies B, todas elas ativas no Raman e no infravermelho.

B hélices L.D : as conformações vistas até aqui referem-se a cadeias polipeptídicas em que os resíduos ou

são todos aquirais, ou apresentam a mesma quiralidade, seja L ou D, em toda sua extensão.

Há, no entanto, uma importante classe de polipeptídeos na qual ocorre uma alternância de quiralidade entre resíduos adjacentes ao longo da cadeia. Um exemplo importante desse grupo de polipeptídeos é a molécula de gramicidina A, um canal iônico transmembrana. Embora haja possibilidade de ocorrência de α -hélice, as sequências L, D favorecem novos tipos de conformações.

As β -hélices podem apresentar-se em fitas simples ou duplas, estas últimas em cadeias paralelas ou antiparalelas. São designadas pelo símbolo β^n , onde n é o número total de resíduos L + D por volta. Dois padrões distintos de ligações de hidrogênio são reconhecidos para as β -hélices de fita simples e de fita dupla com cadeias paralelas enquanto nas β -hélices de fita dupla de cadeias antiparalelas as ligações de hidrogênio são essencialmente equivalentes. Os parâmetros estruturais são específicos para cada caso e são disponíveis na literatura (KRIMM e BANDEKAR, 1986).

Folhas β

Em proteínas e polipeptídeos encontram-se regiões do esqueleto estendidas em forma de folhas, estabilizadas por ligações de hidrogênio laterais intercadeias, as quais recebem a denominação geral de folhas β . Tais estruturas foram evidenciadas originalmente em trabalhos de difração de raios X realizados em torno de 1930 na seda (MEYER e MARK, 1928) e na queratina estendida de mamífero (ASTBURY e WOODS, 1933). Constituem a principal estrutura secundária em certas proteínas como na concanavalina A e nas proteínas Bence-Jones (KRIMM e BANDEKAR, 1986). Essas conformações podem apresentar-se com particularidades de estrutura que conduzem a uma classificação em tipos com características

próprias. Considerando-se que cadeias polipeptídicas podem estender-se de forma paralela ou antiparalela entre si, tem-se basicamente três principais tipos de estruturas em folhas β , de acordo com KRIMM e BANDEKAR (1986):

- a) folhas β pregueadas de cadeias antiparalelas
- b) folhas β pregueadas de cadeias paralelas
- c) folhas β onduladas de cadeias antiparalelas

Do detalhado trabalho de PAULING e COREY (1951, 1953) resultou a definição das coordenadas que descrevem tais conformações.

Até o momento, a análise dos modos normais de vibração foi apenas aplicada a estruturas em folhas β antiparalelas (KRIMM e BANDEKAR, 1986).

Uma visão esquemática desse tipo de estrutura é apresentado a seguir:

A figura representa em A a estrutura em folhas β pregueadas antiparalelas e em B a estrutura em folhas β onduladas antiparalelas.

a) folhas β pregueadas de cadeias antiparalelas: Vários polipeptídeos quirálicos apresentam-se nessa conformação, tais como a β (Ala) $_n$, a β -poli(L-alanilglicina) e a β -poli(L-glutamato). Dentre eles, a β (Ala) $_n$ foi a molécula tomada por KRIMM e BANDEKAR (1986) como modelo para a análise vibracional desse tipo de conformação secundária. Suas principais características vibracionais são as seguintes:

Espécies de simetria	Atividade	Número de modos normais
A [$\gamma(0,0)$]	Raman	30
B ₁ [$\gamma(0,\pi)$]	Raman, IR ()	29
B ₂ [$\gamma(\pi,0)$]	Raman, IR ($\perp$)	29
B ₃ [$\gamma(\pi,\pi)$]	Raman, IR ($\perp$)	29

A β -poli(L-alanilglicina), um exemplo dessa conformação, constitui a principal sequência na cadeia polipeptídica da seda e sua estrutura de raios X é muito semelhante à do componente proteico cristalino desse produto. A simetria da célula unitária é menor que em β (Ala) $_n$, resultando em 50 modos normais de simetria de espécie A' [$\gamma(0,0)$, $\gamma(\pi,\pi)$] e 49 modos de simetria A'' [$\gamma(0,\pi)$, $\gamma(\pi,0)$], todos ativos no Raman e no infravermelho. Outro polipeptídeo que se apresenta nessa categoria de folhas β é a β -poli(L-glutamato). Para todos esses compostos, parâmetros estruturais são conhecidos e cálculos de modos normais de vibração são disponíveis (KRIMM e BANDEKAR, 1986).

b) Folhas β onduladas de cadeias antiparalelas : essa estrutura proposta por LOTZ em 1974 para a (Gly) $_n$ I a partir

de dados experimentais de difração de elétrons havia sido inicialmente sugerida por PAULING e COREY em 1953, com base em análise de modelos. Tal estrutura consiste em cadeias pareadas nas quais cada uma delas alternadamente apresenta somente resíduos da série L ou D. Esta condição pode ser satisfeita por $(\text{Gly})_n$. I. A geometria indicada através de dados de raios X é a monoclinica. A análise vibracional para essa estrutura foi primeiramente desenvolvida por MOORE e KRIMM em 1976 e numa análise subsequente teve seu campo de força refinado de modo a permitir máxima transferibilidade entre diferentes moléculas polipeptídicas com o mesmo padrão conformacional (DWIVEDI e KRIMM, 1982).

Dobras reversas

As dobras reversas constituem conformações das cadeias polipeptídicas envolvendo quatro (para as dobras β) ou três (para as dobras γ) resíduos sucessivos de aminoácidos caracterizados por uma ligação de hidrogênio intramolecular que produz uma reversão de cerca de 180° na direção da cadeia. De acordo com a terminologia de BRAGG et alii (1950), podem ser chamadas, respectivamente, de estruturas C_{10} ou C_7 .

Modelo de dobra γ

modelo de dobra β

A importância maior desse tipo de estrutura reside na sua capacidade de promover a compactação de cadeias polipeptídicas e de proteínas as quais de outro modo manter-se-iam como estruturas estendidas. Tal característica tem concentrado muitos esforços no seu estudo. As dobras reversas tem uma grande frequência de ocorrência como estrutura secundária em cadeias polipeptídicas, sendo que uma porção substancial dos resíduos superficiais ou aqueles expostos ao solvente encontram-se nessas estruturas (RICHARDSON et alii, 1976).

Referências da literatura à importância da ocorrência de dobras β ou estruturas C_{10} podem ser citadas: BEELY (1977) e AUBERT et alii (1976) mostraram que cadeias de açúcar ligam-se a glicoproteínas nessas regiões. GEISOW

(1978) indicou a presença de carboidratos em regiões de dobras β da cadeia pesada da imunoglobulina humana e da RNase B. SMALL et alii (1977) previram que cerca de 90% dos aminoácidos fosforilados por proteinoquinases encontram-se em dobras β .

A estrutura $C\gamma$ (dobras γ), embora conhecida na literatura desde 1943 (HUGGINS, 1943), foi proposta pela primeira vez somente em 1972 por NEMETHY e PRINTZ. Até o presente, somente cerca de 10 dobras γ foram identificadas nas proteínas globulares conhecidas, o que contrasta com a grande frequência de ocorrência observada para as dobras β (BAKER e HUBBARD, 1984). Há, no entanto, evidências obtidas de trabalhos de NMR e raios X de sua ocorrência em compostos de grande importância como alguns peptídeos cíclicos biologicamente ativos (FLIPPEN e KARLE, 1976, PETCHER et alii, 1976, KAWAI et alii, 1983).

Dobras β : quatro resíduos consecutivos estão envolvidos na formação dessa estrutura, a qual é estabilizada por pontes de hidrogênio internas, em geral estabelecidas entre o primeiro e o quarto resíduo. Embora sejam quatro os resíduos envolvidos somente os ângulos de torção do segundo e terceiro resíduos são críticos para a estrutura.

Tres tipos de dobras β designadas tipo I, II e III foram preditas por VENKATCHALAM (1968) para ligações peptídicas planares trans. Os tipos I e II constituem conformações não helicoidais, mas o tipo III corresponde a uma volta de uma hélice 3_{10} . Imagens especulares dessas estruturas foram também descritas e designadas como tipos I', II' e III'. Outros tipos de dobras β foram descritas e classificadas (LEWIS et alii, 1973) como tipos IV, V, V', VI e VII, totalizando onze estruturas particulares para a conformação em dobras β .

Restrições referentes à posição de certos resíduos são enfatizadas na literatura. Assim, o tipo I é compatível com qualquer resíduo de aminoácido em qualquer das posições de 1 a 4, exceto Pro na posição 3. O tipo I' requer Gly tanto em posição 2 como 3. O tipo II requer uma Gly na posição 3. O tipo II' requer uma Gly na posição 2. No tipo III, quaisquer resíduos de aminoácidos são permitidos, uma vez que esta conformação corresponde a uma porção de uma hélice.

Comprimentos e ângulos de ligação característicos de cada uma dessas estruturas são disponíveis na literatura (KRIMM e BANDEKAR, 1986).

Dobras γ : essas dobras são formadas por 3 resíduos de aminoácidos ligados por 2 pontes de hidrogênio. Uma dessas pontes é a que se estabelece entre os resíduos 3 e 1 (ponte 3 $\rightarrow$ 1, na terminologia de Bragg), formando uma estrutura C γ . Essa estrutura básica, definida no trabalho de NEMETHY e PRINTZ, em 1972, foi sendo refinada ao longo dos anos pelos autores, utilizando-se de parâmetros de energia mais adequados. Isto levou a que três diferentes conformações energeticamente estáveis fossem propostas para esta estrutura, pelos mesmos autores. Detalhes estruturais dessas conformações e seus respectivos parâmetros são encontrados no trabalho de KRIMM e BANDEKAR, de 1986.

2.3.3. Conformações de cadeias laterais

Aspectos referentes a microambientes e geometria de algumas ligações em cadeias laterais de certos resíduos de aminoácidos são acessíveis à investigação pela técnica Raman. 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 Tyr, bem como estado de ionização de seus grupos fenólicos, através da análise do dubleto a $850/830\text{ cm}^{-1}$.

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

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

b) a presença de fenilalanina, a qual exibe uma banda forte muito característica a 1005 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 cm^{-1} .

aspecto que tem sido usado na monitoração de funcionalidade de proteína de músculo, conforme dados da literatura (PEZOLET et alii, 1980).

2.3.4. Vibrações de baixa frequência

A região de baixa frequência responde por modos vibracionais que afetam a dinâmica da molécula de proteína como um todo. Essa região pode ser a grosso modo considerada como aquela abaixo de 400 cm^{-1} . O estudo dessa faixa de frequências, sobretudo abaixo de 100 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 (1979), 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 α -hélices. De acordo com FANCONI e PETICOLAS (1971), 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 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 cm^{-1} . Nessa região de frequências situam-se certas vibrações coerentes descritas em proteínas por DAVYDOV (1979), conhecidas por sólitons.

- vibrações de torção: referem-se ao modo de torção do grupo CH_2 e aparecem na região de 260-410 cm^{-1} .

b) vibrações intermoleculares: encontram-se aquelas vibrações decorrentes da interação com moléculas vizinhas, sejam moléculas do solvente, sejam outras moléculas da proteína. Tem-se aqui também as interações entre subunidades 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 amostras cristalinas.

2.3.5. Determinação quantitativa de conformações secundárias em cadeias polipeptídicas e proteínas a partir de seus espectros 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. 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 tem sido desenvolvidos em anos recentes. O método de PEZOLET et alii (1976) baseia-se na intensidade relativa dos picos a 1240 e 1450 cm^{-1} , os quais são atribuídos ao modo amida III e deformação angular dos grupos CH_2 , respectivamente. 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 cm^{-1} como padrão interno é comum ao método de LIPPERT et alii (1976), a ser descrito adiante. O método de PEZOLET et alii (1976) produz unicamente resultados referentes ao conteúdo em folhas β . O cálculo baseia-se na medida da intensidade relativa da banda a 1240 cm^{-1} multiplicada pelo número médio de grupos 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 β conhecidos por métodos cristalográficos de raios X. A relação observada entre intensidades do modo amida III e conteúdo de folhas β mostra-se linear e permite portanto a determinação do conteúdo dessa conformação secundária por simples interpolação.

O método de LIPPERT et alii (1976) já apresenta um avanço, uma vez que permite a estimativa do conteúdo estrutural secundário de proteínas em termos de suas frações α -hélice, folhas β 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 método se utiliza da poli-L-lisina como molécula-modelo em suas conformações puras em α -hélice, folhas β e de dados cristalográficos de proteínas com parâmetros estruturais bem definidos. Sua principal falha consiste em não permitir o cálculo do conteúdo de dobras β , em decorrência de limitações inerentes à própria molécula-modelo empregada. Esse método, por razões expostas no item 4.4 desta tese, foi o escolhido para a análise do conteúdo estrutural secundário

das proteínas estudadas neste trabalho e encontra-se mais detalhadamente exposto no item mencionado.

O método de WILLIAMS (1980 a,b), 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. É proposto que, a uma frequência fixa, a intensidade de espalhamento Raman para uma proteína seja expressa por:

$$f_{ho}I_{ho} + f_{hd}I_{hd} + f_{\beta a}I_{\beta a} + f_{\beta p}I_{\beta p} + f_tI_t + f_uI_u = I_e$$

Equação 22

em que:

I_e = intensidade Raman experimental normalizada

f = fração de cada particular estrutura secundária

I = intensidade atribuível a um polipeptídeo com 100% do tipo de estrutura indicada pelo índice

h_o = hélice ordenada

h_d = hélice desordenada

β_a = folhas β antiparalelas

t = dobras

β_p = folhas β paralelas

u = indefinido

Obtem-se a normalização dividindo-se a intensidade observada em cada número de onda pela soma das intensidades observadas em todos os números de onda. Aprimoramento do método foi publicado em 1983 por WILLIAMS. O mesmo autor apresenta em 1986 uma extensão do método de modo a incluir a região amida III.

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 (1987). Nele se utilizam como modelo as intensidades espectrais das vibrações amida I do esqueleto polipeptídico correspondentes a categorias puras de conformação secundária, a saber, α -hélice, folhas β e estrutura indefinida. Por estrutura indefinida os autores definem o conteúdo conformacional não regular e as dobras β , tomados em conjunto. Estas últimas não são portanto estimadas independentemente por este método, à semelhança do método de LIPPERT et alii (1976). O método de BERJOT et alii (1987) 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.

O método proposto por THOMAS e AGARD (1984) consiste de um procedimento de deconvolução de espectros Raman. Parte do pressuposto de que deva existir um espectro verdadeiro, original, 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 deconvolução das bandas Raman é do tipo lorentziano-gaussiana e é definida por:

$$LG = N [\Gamma/(x-u)^2 + (\Gamma/2)^2] \quad (\exp \{-\frac{1}{2} [(x-u)/\sigma]^2\})$$

Equação 23

onde Γ e 2σ são, respectivamente, as meias-larguras das bandas lorentzianas e gaussianas, $x-u$ é o centro da banda e N , uma constante de normalização.

° Métodos como os de WILLIAMS et alii (1980a,b), WILLIAMS (1983, 1986), BERJOT et alii (1987) e THOMAS e AGARD (1984) pressupõem a obtenção de dados espectrais em espectrômetros interfaciados a computador de modo a permitir que os processos de cálculo 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. Essa exigência impediu que tais métodos fossem aplicados em nosso trabalho, uma vez que o equipamento que utilizamos não dispõe dessas características. O método de LIPPERT et alii (1976), 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.

3. Sistemas em estudo

3.1. Toxina γ de escorpião brasileiro *Titvus serrulatus*

Dentro da classe *Aracnida*, os escorpiões formam uma ordem relativamente pequena, a *Scorpionida*, distribuindo-se entre sete famílias num total de 600 espécies (SAMPAIO, 1988).

Todos os escorpiões venenosos pertencem à família *Buthidae*, que compreende quatro sub-famílias: *Isometrinae*, *Buthinae*, *Centrurinae* e *Tityinae*. Dentro da sub-família *Buthinae* encontram-se os escorpiões da África e Ásia pertencentes aos gêneros *Androctonus*, *Leiurus*, *Buthus* e *Buthacus*. A subfamília *Centrurinae* é constituída pelos escorpiões da América do Norte e Central. Os escorpiões da América do Sul pertencem à sub-família *Tityinae*.

O escorpião *Titvus serrulatus*, da sub-família *Tityinae*, representa uma das espécies de escorpiões mais comuns e de maior importância do ponto de vista médico no Brasil. Sua localização predominante é na região sudeste do país, sobretudo nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Neste último ocorre com maior frequência na região Nordeste (Ribeirão Preto e arredores), no vale do Paraíba e em focos isolados próximos à Capital.

Morfologicamente caracteriza-se por apresentar cerca de 7 cm de comprimento, cor amarelada e um par de serrilhas na cauda justificando a denominação *serrulatus*.

Os venenos de escorpiões consistem de um conjunto de vários componentes proteicos com ação neurotóxica característica, decorrente de sua interação com canais de sódio de membranas excitáveis. São geralmente proteínas de baixo peso molecular, com um número médio de resíduos entre 60 e 70, ponto isoelétrico na faixa básica e que apresentam em sua estrutura quatro pontes dissulfeto. Essas características parecem ser comuns aos principais tipos de neurotoxinas de escorpião estudadas até o momento.

Até o presente, cerca de 30 toxinas de escorpião encontram-se sequenciadas, dentre as quais a toxina γ , objeto de estudo deste trabalho. Seu sequenciamento, obtido por BECHIS et alii em 1984 é o seguinte:

	10
Lys-Glu-Gly-Tyr-Leu-Met-Asp-His-Glu-Gly	
	20
Cys-Lys-Leu-Ser-Cys-Phe-Ile-Arg-Pro-Ser	
	30
Gly-Tyr-Cys-Gly-Arg-Glu-Cys-Gly-Ile-Lys	
	40
Lys-Gly-Ser-Ser-Gly-Tyr-Cys-Ala-Trp-Pro	
	50
Ala-Cys-Tyr-Cys-Tyr-Asp-Leu-Pro-Asn-Trp	
	60
Val-Lys-Val-Trp-Asp-Arg-Ala-Thr-Asn-Lys	
Cys	

FONTECILLA-CAMPS et alii (1980), através de um procedimento de alinhamento otimizado das cadeias polipeptídicas de diversas toxinas de escorpião, indicaram a existência de pelo menos três regiões bem definidas em que ocorre uma evidente conservação de resíduos. DUFTON et alii (1986) também relatam que toxinas de escorpião formam uma série de variantes conformacionais interrelacionados. Desse modo, informações estruturais disponíveis para algumas toxinas de escorpiões podem fornecer subsídios básicos para o estudo conformacional das demais.

Dentro desse contexto, talvez seja de interesse mencionarem-se aqui alguns resultados de estudos estruturais desenvolvidos por difração de raios X para a toxina variante 3 do escorpião americano *Centruroides sculpturatus* Ewing (FONTECILLA-CAMPS et alii, 1980 e FONTECILLA-CAMPS et alii, 1982): a estrutura da toxina compreende basicamente uma região de 2,5 voltas em α -hélice, uma região de 3 fitas em estrutura β antiparalela e diversas dobras β . Três das quatro pontes dissulfeto encontram-se intimamente associadas à α -hélice e às estruturas β , constituindo uma parte muito rígida da molécula. Regiões contendo resíduos de aminoácidos invariantes ou semivariantes são encontrados na molécula e muitos deles se acham numa superfície plana que se mostra nitidamente mais hidrofóbica em relação a outras áreas da molécula. As observações sugerem que esta superfície desempenhe algum papel na ação biológica das toxinas de escorpião no que se refere à sua interação com canais de sódio de membranas excitáveis.

Com base em homologias entre as sequências de aminoácidos e reatividades cruzadas com o antisoro (DELORI et alii, 1981 e ROCHAT et alii, 1979, respectivamente), as toxinas de escorpião são classificadas em sete grupos:

1º a 4º grupo: toxinas dos vários gêneros da sub-família *Buthinae*.

5º grupo: toxinas do gênero *Centruroides* (sub-família *Centrurinae*).

6º grupo: toxinas do gênero *Tityus* (sub-família *Tityinae*).

7º grupo: uma das toxinas da sub-família *Buthinae*, a qual é tóxica para insetos mas não para mamíferos.

COURAUD et alii (1982), no entanto, propõem uma classificação mais geral, baseada na distinção entre os mecanismos de ação das diversas toxinas. Assim, através

desse critério. dois grandes grupos de toxinas são definidas: as α e as β toxinas.

Esses dois grupos diferem entre si pelos mecanismos de ação que envolvem sua interação com os canais de sódio de membranas excitáveis. Definir-se-á cada um deles adiante, após ter-se introduzido alguma conceituação sobre canais iônicos e seu papel na intermediação da ação tóxica da toxina γ .

Canais iônicos e ação neurotóxica - canais iônicos constituem estruturas presentes nas membranas de células excitáveis, sensíveis à voltagem e responsáveis pelas mudanças observadas na permeabilidade a íons específicos durante certas fases do potencial de ação. Sua ocorrência na transdução de sinais em outros tipos de células é também referida (Catterall, 1988). Podem ser, a grosso modo, entendidos como poros que atravessam a membrana e cujas paredes são como que "forradas" por proteína, de tal modo que se tem uma região hidrofílica através do corpo hidrofóbico da membrana.

Os canais de sódio são os responsáveis pelo aumento na permeabilidade a esse íon durante a fase inicial do potencial de ação, em que se tem um aumento da despolarização da membrana; sua ocorrência se dá no nervo, no músculo esquelético e no músculo cardíaco. A deflagração da excitabilidade nesses tecidos produz-se através de alguma capacidade do estímulo em iniciar o decremento da polaridade da membrana (a qual originalmente apresenta um potencial de repouso internamente negativo), o que gera o aumento de sua permeabilidade ao íon Na^+ para o interior da célula, invertendo desse modo a polaridade da membrana.

Essa variação na permeabilidade ao Na^+ , e a consequente inversão da polaridade, desloca-se como uma onda ao longo do tecido excitável e constitui o chamado potencial de ação.

A ação tóxica das neurotoxinas de escorpião está ligada justamente à sua interação com sítios receptores no canal de sódio, perturbando assim a propagação do potencial de ação. A perturbação induzida pela ligação toxina-receptor ao funcionamento normal desses canais é capaz de produzir, como se pode avaliar a partir das informações fisiológicas expostas, danos extensos e críticos ao funcionamento geral do sistema nervoso (CATTERALL et alii, 1984, 1988).

Em consequência de sua notável afinidade pelo canal de sódio, essas neurotoxinas, entre as quais inclui-se a toxina γ , desempenham papel relevante como sondas no estudo dessas estruturas. Conforme assinala CATERALL (1984), com exceção das regiões dos nódulos de Ranvier nas células neurais, a densidade de canais de sódio em membranas excitáveis é muito baixa. Assim, a utilização de neurotoxinas como sondas específicas para identificação e estudo da proteína do canal de sódio assume papel crítico em estudos estruturais e neurofisiológicos.

Já se encontram mapeadas as regiões de cada sítio no canal e estabelecidas as especificidades da interação de cada um deles com categorias diversas de toxinas (Catterall, 1988). Esse autor identifica cinco sítios distintos no canal de sódio responsáveis por ligações específicas com neurotoxinas. Dentre eles o sítio receptor 4 constitui a região do canal à qual se ligam especificamente as toxinas do grupo B (ver classificação adiante), grupo ao qual pertence a toxina γ de *Tityus serrulatus*. Essa ligação se dá por um mecanismo que independe da voltagem, o que as

distingue das toxinas dos demais grupos. A ação tóxica decorre de uma intensificação da fase de ativação do canal. (CATTERALL, 1984).

A literatura recente registra o resultado dos esforços de diversos grupos no sentido de elucidação de aspectos estruturais do canal de sódio e o reconhecimento a nível molecular de seus sítios de interação com neurotoxinas:

NODA et alii em 1984 derivaram a sequência primária da proteína do canal de sódio de *Electrophorus electricus* a partir da análise da sequência do cDNA clonado: a estrutura mostrou consistir de 1820 resíduos de aminoácidos. Em 1986, NODA et alii propuseram a estrutura do canal como sendo formada por uma grande subunidade glicopeptídica com peso molecular de 260000 (dos quais 30% correspondem à fração glicídica) a qual poderia se apresentar isolada ou com duas ou três subunidades adicionais menores, de peso molecular na faixa de 37000 a 45 000, na dependência do animal ou tecido considerado. DUCH e LEVINSON (1987), em estudos de reconstituição do canal, verificaram que a subunidade glicoproteica de PM 260000 parece ser suficiente para responder pelas funções mais características do canal.

A ocorrência de diferentes populações de canais de sódio em cérebro de rato foi observada por NODA et alii em seu trabalho de 1986. Nele, os autores apresentaram o sequenciamento de duas formas homólogas dessa estrutura; o sequenciamento de uma terceira forma homóloga do canal de sódio nesse mesmo tecido foi apresentado por KAYANO et alii (1988).

De acordo com os trabalhos de NODA et alii (1986), GREENBLATT et alii (1985) e GUY e SEETHARAMULU (1986), a estrutura da subunidade maior do canal de sódio apresenta

características peculiares, consistindo de quatro unidades repetitivas que constituem domínios com sequências similares, sendo cada uma delas formada de oito segmentos dos quais seis constituem α -hélices transmembrana.

Estudos da dinâmica de funcionamento do canal (KOSOWER, 1985 ; MEVES e NAGY, 1989) e tentativas de reconhecimento a nível molecular de sítios de ligação para algumas neurotoxinas são encontrados na literatura (KOSOWER, 1985).

Grupos α e β de toxinas de escorpião - Como já mencionado, a classificação das toxinas de escorpião segundo seu mecanismo de ação estabelece a divisão das mesmas em dois grandes grupos (COURAUD et alii., 1982):

Grupo α : engloba toxinas cujo mecanismo de ação envolve um prolongamento dos potenciais de ação do nervo, músculo e células cardíacas, através de sua capacidade de retardar a fase de inativação do canal de sódio sensível à voltagem. Em alguns casos, observa-se diminuição da condutância de íons K^+ e um deslocamento na curva de inativação. A afinidade dessas toxinas pelo seu sítio é dependente do potencial de membrana: quanto mais despolarizada, menor a afinidade. O sítio é comum a todas as toxinas de *Buthinae* e à toxina II de *Anemona sulcata*. As toxinas desse grupo são também conhecidas como do tipo *Androctonus*.

Grupo β : a esse grupo pertencem as toxinas cujo mecanismo de ação apresenta características distintas, ainda não bem elucidadas. São toxinas insensíveis ao potencial de membrana, embora atuem no canal de sódio. O seu sítio de ligação no canal é o receptor 4, distinto daquele das toxinas *Buthinae*. São conhecidas também como do tipo *Centruroides*, em razão do fato desse gênero ser integrante importante do grupo. A esse grupo pertence, entre outras, a

toxina γ de *Tityus serrulatus*. Sua ação se expressa por uma intensificação da atividade do canal.

A afinidade da toxina γ de *Tityus serrulatus* pelo canal de sódio é alta ($K_d = 2,3 \times 10^{-12}$ M) com uma meia vida de dissociação maior que 10 h, a 40°C (BARHANIN et alii, 1982). Esses valores indicam uma afinidade muito alta se comparada ao observado para algumas das melhores neurotoxinas conhecidas em termos de afinidade, cujos K_d se situam na faixa de 1 a 4×10^{-9} M (BARHANIN et alii, 1982). Além disso, a toxina γ liga-se muito bem a membranas despolarizadas, diferentemente de outras toxinas, o que indica seu emprego em estudos do canal de sódio que envolvam etapas de solubilização da amostra, situação em que se tem perda da polaridade da membrana.

O veneno de *Tityus serrulatus*: o veneno desse escorpião foi primeiramente desdobrado em duas frações tóxicas por GOMEZ e DINIZ em 1966. Em 1967, GOMEZ purificou e caracterizou parcialmente uma dessas frações, a tityustoxina (TsTx). COUTINHO NETTO, em 1975, isolou e caracterizou essa mesma toxina como uma cadeia polipeptídica única com 61 resíduos de aminoácidos, determinando seu ponto isoelétrico ($pI = 8,25$) e seu peso molecular ($PM = 6995$). Os estudos conduzidos por TOLEDO e NEVES (1976) resultaram na purificação de 2 toxinas denominadas tityustoxina I, com lisina N-terminal e $PM = 6932$ e tityustoxina II, com glicina N-terminal e $PM = 8580$.

POSSANI et alii (1977) obtiveram 5 frações tóxicas do veneno de *Tityus serrulatus*, entre as quais uma fração que denominaram toxina γ com $PM \approx 7000$, 62 resíduos de aminoácidos e lisina N-terminal.

Através de modificações na metodologia de isolamento, POSSANI et alii (1981a) desdobraram o veneno em 10

diferentes componentes tóxicos, dos quais 4 foram purificados e quimicamente caracterizados. Dentre eles, a toxina que se denominou II-11 foi sequenciada em 1985. BECHIS et alii publicam em 1984, o sequenciamento completo de uma toxina de *Tityus serrulatus* denominada toxina VII.

Dentro dessa multiplicidade de procedimentos de isolamento e diversidade de nomenclatura, fazia-se necessário um esforço no sentido de se estabelecer a correspondência entre as várias frações obtidas ao longo dos anos por autores diversos. Tal tarefa foi empreendida por SAMPAIO (1988) que mostrou que a toxina γ descrita por POSSANI et alii em 1977 e sequenciada pelo mesmo autor e colaboradores em 1985 é na verdade idêntica à toxina VII sequenciada por BECHIS et alii em 1984. Corresponde também à tityustoxina I isolada em 1976 por TOLEDO e NEVES, diferindo no entanto da tityustoxina de COUTINHO NETTO (1975).

Neste trabalho, adotaremos a denominação toxina γ para indicar esta toxina.

O valor da DL 50 para a toxina γ em camundongos é de 3,57 $\mu\text{g/kg}$ (SAMPAIO, 1988). Sua atividade tóxica é mantida na faixa de pH 4,5-7,5, porém é completamente inativada a pH 1,5 (AREAS et alii, 1987).

3.2. Fosfolipases A_2

A existência de enzimas com atividade catalítica ligada à liberação de ácidos graxos a partir de fosfolípidos foi proposta pela primeira vez há cerca de cem anos atrás, quando se observou que incubando-se suco pancreático com fosfatidilcolina obtinham-se ácidos graxos livres. A descoberta de que o veneno de certas espécies de serpentes

era capaz de converter fosfatidilcolina num produto com a propriedade de hemolisar células vermelhas do sangue surge anos mais tarde, em 1903. Pesquisas subsequentes estabeleceram que o produto lítico consistia numa molécula de fosfatidilcolina da qual um ácido graxo havia sido removido. Em razão da sua referida ação lítica sobre hemáceas, o termo lisofosfatidilcolina foi introduzido para designar este produto. Somente em 1960, no entanto, definiu-se o ácido graxo de fato removido da molécula do fosfolípideo pela enzima de serpentes como sendo aquele esterificado em posição sn-2 (para dados históricos ver revisão de VAN DEN BOSCH, 1980 e referências aí citadas).

As fosfolipases A são componentes universais de células de mamíferos e são encontradas em diferentes tipos de células e nos mais variados órgãos e tecidos. Fazem parte de todas as membranas intracelulares, desempenhando uma grande variedade de funções. Podem ser intra ou extracelulares. As fosfolipases A intracelulares foram classificadas em A₁ e A₂ as quais produzem 2-acil e 1-acil lisofosfolípideos, respectivamente, como produtos de sua reação com fosfatidilcolina. As fosfolipases A extracelulares de venenos de serpentes assim como as enzimas solúveis secretadas pelo pâncreas pertencem somente ao tipo A₂. A esse grupo de enzimas extracelulares pertencem as fosfolipases que serão estudadas neste trabalho.

As fosfolipases A₂ são enzimas que quebram especificamente a ligação acila do carbono 2 de 3-sn-fosfoglicerídeos, na presença de íons cálcio. Apresentam uma marcante preferência por fosfolípidos no estado agregado, tais como em micelas, monocamadas, lipossomos ou membranas. É possível observar-se mudança dramática em sua atividade enzimática quando a concentração do substrato atinge a concentração micelar crítica (DIJKSTRA et alii, 1981 a). Constituem desse modo um atraente modelo para estudo de

interações de proteínas com o principal componente da matriz das membranas.

A fosfolipase A_2 na sua forma intracelular libera ácido aracdônico da membrana, o qual pode ser metabolizado a compostos fisiologicamente importantes tais como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros produtos decorrentes de sua oxidação. Esses compostos estão implicados em uma série de condições inflamatórias, tais como artrite e asma, o que explica o grande interesse dedicado ao desenvolvimento de inibidores para essa enzima os quais bloqueariam toda a cascata aracdônica, agindo como drogas anti-inflamatórias (PRIMROSE et alii, 1988).

Grande similaridade tem sido observada entre a enzima intracelular e sua forma extracelular, que ocorre abundantemente na secreção pancreática, em termos de especificidade de substrato, perfil cinético e sequências primárias. Esses fatos tem levado alguns autores (PRIMROSE et alii, 1988) a propor a extensão dos resultados de estudos efetuados na forma extracelular, mais facilmente isolável, à forma intracelular.

A composição e sequência de aminoácidos em fosfolipases de diversas origens são conhecidas. A massa molecular varia conforme a origem da enzima, mas em geral apresenta algum valor em torno de 14000-15000. Grande homologia sequencial é observada entre diferentes fosfolipases.

No esquema que se segue, é apresentada a especificidade das diversas fosfolipases no que se refere à ligação hidrolisada na molécula de fosfatidilcolina.

R₁, R₂ = ácidos graxos insaturados

3.2.1. Fosfolipase A₂ de veneno de *Crotalus durissus terrificus* e o complexo crotoxina.

Os venenos de serpentes constituem misturas complexas formadas em sua maior parte por proteínas, algumas delas tóxicas e outras com atividade biológica diversa. Pequenos peptídeos, aminoácidos livres, nucleotídeos, carboidratos, lípidos, íons metálicos estão também presentes, embora em menor grau (KARLSSON, 1979 e BARRILI, 1985).

O complexo crotoxina constitui o componente tóxico predominante (65-70%, segundo AIRD et alii, 1986) do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*. Foi a primeira toxina de veneno animal purificada e cristalizada, o que ocorreu através dos trabalhos de SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT há cerca de meio século atrás, mais precisamente em 1938.

O que inicialmente, entretanto, parecia a SLOTTA e FRANKEL-CONRAT uma proteína homogênea, revelou-se mais tarde um complexo molecular entre dois componentes proteicos com atividades e estruturas distintas. Os trabalhos que levantaram a hipótese de não homogeneidade dessa toxina foram alguns estudos realizados em venenos de abelhas e

serpentes (NEUMANN e HABERMANN, 1952 e HABERMANN e NEUMANN, 1954) em que a dissociação entre ação neurotóxica e atividade fosfolipásica foi observada.

Em 1956, FRANKEL-CONRAT e SINGER forneceram a evidência da não homogeneidade e dissociação da crotoxina através do bloqueio de seus amino grupos livres. A reação da crotoxina com o reagente empregado (fluorodinitrobenzeno - FDNB) resultou em 2 frações proteicas dinitrofeniladas que se diferenciavam entre si por seus conteúdos em aminoácidos e por sua solubilidade.

HABERMANN, em 1957, identificou uma fração básica com atividade fosfolipásica e de baixa toxicidade como um dos componentes da crotoxina.

Somente em 1971 a separação da crotoxina em seus constituintes por cromatografia de troca iônica foi descrita por dois grupos independentes (RUBSAMEN et alii, 1971 e HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971).

No trabalho de RUBSAMEN e colaboradores (1971), a crotoxina foi submetida a uma cromatografia em carboximetilcelulose em meio ácido. Duas frações foram obtidas:

- a) um componente básico, com atividade fosfolipásica e de baixa toxicidade.
- b) um componente ácido, sem atividade enzimática ou toxicidade.

O componente básico foi identificado como sendo uma fosfolipase A₂ (fosfatidilacilhidrolase, E.C. 3.1.1.4.)

Ao componente ácido, os autores chamaram crotapotina, nome ligado à sua capacidade de *potenciar* a toxicidade do componente básico. A crotapotina é constituída por 3 cadeias polipeptídicas (com 40, 34 e 14 resíduos de aminoácidos cada

uma), ligadas por 7 pontes dissulfeto (BREITHAUPT et alii, 1974), resultando em um peso molecular de cerca de 9000 (KARLSSON, 1979) e ponto isoelétrico de 3,7 (BREITHAUPT et alii, 1974).

Os constituintes proteicos da crotoxina foram no mesmo ano de 1971 isolados por HENDON e FRAENKEL-CONRAT utilizando cromatografia em DEAE-celulose na presença de uréia 6 M.

A partir dos resultados do trabalho de BREITHAUPT et alii de 1975, foi possível determinar-se uma estequiometria molar de 1:1 para o complexo crotapotina/fosfolipase A₂. O complexo é não covalente e interações eletrostáticas certamente são decisivas para sua estabilidade. A pH neutro o complexo dissocia-se em seus componentes nativos com um $K_D = 3 \times 10^{-9}$ M (RADVANYI e BON, 1982).

A denominação de crotoxina A e crotoxina B para os componentes ácido (crotapotina) e básico (fosfolipase A₂) do complexo crotoxina é também encontrada na literatura (HANLEY, 1979). A utilidade dessa denominação prende-se à sua capacidade de evitar possíveis confusões com outras frações com atividade fosfolipásica presentes no veneno e não ligadas ao complexo crotoxina. A existência dessas outras fosfolipases foi demonstrada por BREITHAUPT et alii em 1975.

A reassociação das 2 subunidades isoladas crotapotina e fosfolipase A₂ restaura a neurotoxicidade da crotoxina original, diminuindo no entanto a atividade enzimática da fosfolipase A₂ (BREITHAUPT, 1976). Esses resultados no entanto são conflitantes, segundo KARLSSON (1979), com aqueles obtidos por FRAENKEL-CONRAT (1976). A inibição mencionada se dá de modo específico com a fosfolipase do complexo, uma vez que a crotapotina não é capaz de inibir outras fosfolipases do veneno (BREITHAUPT, 1976). O ponto

isoeletrico do complexo (4,8, segundo BREITHAUP, 1976) é menor do que aquele observado para a fosfolipase isolada (8,6 de acordo com HORST et alii, 1972 e 9,5-9,8, de acordo com BREITHAUP et alii, 1974), sugerindo que durante a interação das 2 subunidades alguns grupos positivos da enzima são possivelmente neutralizados pela crotapotina.

Crotoxina, seus componentes e atividade tóxica - Um grande número de toxinas de serpentes apresenta neurotoxicidade, seja de caráter pré ou pós-sináptico ou ambos. Seu efeito tóxico pode ser diverso, podendo apresentar atividade cardiotoxica, mionecrótica ou outras.

Os primeiros estudos farmacológicos sobre a crotoxina foram desenvolvidos por VITAL-BRAZIL (1966) e indicaram que a ação tóxica desse composto era devida primariamente ao bloqueio da transmissão neuromuscular, resultando na paralisia dos músculos esqueléticos e consequente morte do animal por parada respiratória.

Esse mesmo autor foi o primeiro a sugerir que o bloqueio neuromuscular induzido pela crotoxina é mediado por uma alteração na liberação de acetilcolina seria um efeito a nível pós-sináptico. A ação pós-sináptica foi evidenciada por outros autores (BON et alii, 1979, FRAENKEL-CONRAT, 1982, entre outros). No entanto, mais recentemente, evidências da ação pré-sináptica foram acumuladas, de tal modo que o real mecanismo de ação farmacológica "in vivo" da crotoxina ainda constitui no momento motivo de controvérsia (GABILAN, 1983). BON e colaboradores (1979) sugerem que ambos os processos possam estar envolvidos e possam contribuir para a toxicidade da crotoxina em diferentes graus.

Como aspecto comum a todas as neurotoxinas de ação pré-sináptica isoladas de veneno de serpentes é de se ressaltar a

ocorrência de uma fosfolipase A_2 básica como componente essencial da estrutura de todas elas, o que sugere que a ação tóxica dessas proteínas está intimamente ligada à atividade fosfolipásica. Exemplos de outras toxinas pré-sinápticas são a β -bungarotoxina, a taipoxina e a notoxina. Todas essas neurotoxinas de ação pré-sináptica, incluída aqui a crotoxina, são classificadas no grupo das β neurotoxinas, as quais se caracterizam por apresentarem em sua estrutura moléculas de fosfolipase contendo de 120 a 140 resíduos de aminoácidos e 6 a 8 pontes dissulfeto. Algumas toxinas desse grupo, como a crotoxina, são complexos de 2 ou 3 sub-unidades das quais pelo menos uma é uma fosfolipase A. Incluem-se no grupo das β neurotoxinas, neurotoxinas pré-sinápticas, toxinas mionecróticas, fosfolipases básicas com alta letalidade ou atividade patológica e outras proteínas com estrutura fosfolipásica. Esse grupo engloba toxinas muito resistentes, estáveis sobretudo a altas temperaturas.

Um resíduo de His no centro ativo da subunidade enzimática é crítica no que se refere à ação fosfolipásica e à neurotoxicidade dessas proteínas. Experimentos de alquilação específica desse resíduo no complexo crotoxina levaram à inibição da atividade fosfolipásica e à perda da ação neurotóxica do complexo (JENG e FRAENFEL-CONRAT, 1978). O mesmo efeito inibitório foi obtido em PLA_2 de pâncreas de porco por VOLWERK et alii (1974), através da alquilação da His 48 do centro ativo. Resultados comparáveis no que se refere à perda de atividade fosfolipásica e da toxicidade foram obtidos com experimentos semelhantes efetuados em notexina e taipoxina, indicando claramente a importância da relação entre atividade fosfolipásica e neurotoxicidade. Na β -bungarotoxina essa mesma relação foi observada através de outra estratégia: sabe-se que a atividade fosfolipásica e a liberação de acetilcolina são dependentes de íons cálcio; sabe-se também que íons Sr^{2+} podem substituir os íons Ca^{2+} na liberação da acetilcolina, mas não na atividade

fosfolipásica. STRONG e colaboradores (1976) observaram que a transmissão neuromuscular em diafragma de rato exposto a Sr^{2+} não era afetada pela β -bungarotoxina. Na crotoxina, essa mesma transmissão foi reduzida à metade por substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} . Esses resultados indicam a relação entre a atividade fosfolipásica e a ação neurotóxica (GABILAN, 1983).

Apesar da importância da relação assinalada, cumpre ressaltar que a atividade fosfolipásica não está necessariamente associada à neurotoxicidade, isto é, diversas são as fosfolipases A_2 conhecidas com alta atividade enzimática, que não se mostram neurotóxicas (STRONG et alii, 1976). No entanto, a neurotoxicidade de certas espécies de toxinas de venenos parece ser fundamentalmente dependente desse tipo de atividade fosfolipásica, conforme observa GABILAN (1983).

Hipóteses quanto ao envolvimento de fenômenos de degradação de fosfolípides de membrana e sua relação com inativação de receptores proteicos ou de canais iônicos tem sido levantadas como tentativa de se compreender a interrelação atividade fosfolipásica/neurotoxicidade. É sabido, por exemplo, que o receptor de acetilcolina é dessensibilizado por quantidades mínimas de ácidos graxos e lisofosfolipídeos (GABILAN, 1983). As discrepâncias observadas no comportamento neurotóxico de diferentes fosfolipases A_2 poderiam estar por outro lado ligadas a diferenças mais sutis de sua atividade catalítica tais como especificidade de substrato e particularidades de sua localização na membrana, por exemplo.

JENG et alii (1978) mostraram que a fosfolipase A ou a crotoxina ligam-se a membranas de eritrócitos de modo não específico, enquanto não se observa ligação para a crotapotina. BON et alii (1979) forneceram evidências experimentais que permitiram que a questão da toxicidade da

fosfolipase A_2 crotálica e o efeito potenciador sobre ela exercido pela crotapotina fossem melhor compreendidos: esses autores mostraram que a ligação da fosfolipase A_2 crotálica isolada a membranas de eritrócitos ricas em receptores de acetilcolina se dá numa relação linear, sem saturação dentro de região estudada.

Esta observação foi tomada como indicação de que a adsorção se dá nesse caso através de um grande número de sítios não específicos, de baixa afinidade. Quando na presença de crotapotina, entretanto, o padrão de ligação da fosfolipase A_2 modifica-se, indicando que a ligação com os receptores envolve somente um número limitado de sítios de alta afinidade na membrana pós-sináptica. Os autores concluíram que a crotapotina é capaz de impedir a ligação da fosfolipase a sítios inespecíficos de baixa afinidade, mas não aos sítios específicos na membrana.

Com base nesses experimentos acumulados, um modelo para a atuação da crotoxina foi proposto (BON et alii, 1979). Este modelo propõe uma atuação de "chaperone" (carregador ou guia) para a subunidade crotapotina. Ela direcionaria a fosfolipase A_2 a sítios específicos do receptor. Esse direcionamento implicaria numa mudança conformacional do complexo que favoreceria a ligação entre a fosfolipase A_2 e seus sítios específicos. Essa ação levaria à observada potenciação pela crotapotina da toxicidade da subunidade básica. Após terminada sua função "carregadora", a crotapotina dissociar-se-ia da subunidade fosfolipásica e seria descartada. Essa hipótese foi testada e confirmada posteriormente por HENDON e TU, em 1979. Através da conversão da crotoxina em complexo não dissociável, com as subunidades ligadas covalentemente entre si, foi possível aos autores demonstrar a perda da neurotoxicidade da crotoxina, reforçando a hipótese da essencialidade da dissociação fosfolipase/crotapotina para a ação tóxica. A

atividade fosfolipásica no entanto não foi perdida pela ligação covalente estabelecida entre as subunidades do complexo.

Fatores eletrostáticos constituem um outro aspecto que deve ser considerado quando se estuda o mecanismo de ação da crotoxina. O complexo apresenta um $pI=4,7$, portanto deve apresentar cargas negativas. Desse modo, seria repellido pelas membranas fisiológicas negativamente carregadas. Na dissociação do complexo, próximo aos sítios de ligação, a fosfolipase A_2 apresentar-se-ia com suas cargas positivas líquidas ($pI=8,6$), sendo desse modo atraída pelos sítios receptores da membrana.

Considerando-se a inibição da neurotoxicidade obtida pela modificação covalente do complexo (visto acima), é de se considerar que, além das interações eletrostáticas também fatores estéricos devem representar papel decisivo na ação tóxica.

Um detalhado estudo sobre a conformação do complexo crotoxina e suas subunidades foi empreendido por HANLEY em 1979, utilizando-se das técnicas espectroscópicas de fluorescência e dicroísmo circular. A inabilidade observada dos espectros independentes das subunidades isoladas em mimetizarem o comportamento espectral da crotoxina na faixa de pH de 4 a 10 foi correlacionada com o estado de agregação do complexo. Foi possível ao autor concluir a partir de dados de CD diferencial que a conformação da crotoxina difere daquela de seus componentes basicamente por um aumento na proporção de estrutura secundária em folhas β no complexo. Hipóteses referentes à imobilização de resíduos aromáticos (em particular Trp) num meio hidrofóbico, como resultado da formação do complexo, foram levantadas pelo autor a partir de dados de CD no UV próximo e de estudos de acessibilidade dos resíduos Trp a reações de oxidação. A

existência de estados conformacionais reversíveis para a crotoxina e suas subunidades, evidenciada por HANLEY nesse trabalho, leva a se considerar a sua provável utilidade no equilíbrio de associação/dissociação do complexo e no mecanismo de ação tóxica nas membranas-alvo.

A fosfolipase A_2 do complexo crotoxina: esta enzima, que denominar-se-á abreviadamente CdtPLA₂ e que constitui material de estudo deste trabalho, é uma proteína de cadeia única, com 122 resíduos de aminoácidos, estrutura tridimensional estabilizada por sete pontes dissulfeto, peso molecular ≈ 14350 (ACHARI et alii, 1985) e ponto isoelétrico 8,6, determinado por focalização isoelétrica (HORST, 1972 e GABILAN, 1983). BREITHAUPT et alii (1974), entretanto, determinaram pelo mesmo método valores de 9,5 e 9,8 para o ponto isoelétrico do que se supõe sejam isoformas da enzima. A alta basicidade da proteína, no entanto, qualquer que seja a isoforma considerada, não é compatível com o pequeno excesso de resíduos de aminoácidos básicos (3 somente), indicando que provavelmente a maior parte de seus resíduos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) está na forma amida.

O recente sequenciamento completo dos aminoácidos de sua estrutura (AIRD et alii, 1986) permite que se verifique a observação acima. Este sequenciamento veio completar e modificar o sequenciamento parcial efetuado em 1980 por FRAENKEL-CONRAT et alii. O sequenciamento de AIRD e colaboradores (1986) veio também indicar a ocorrência de regiões polimórficas na estrutura primária da fosfolipase A_2 do complexo crotoxina.

O sequenciamento completo é o seguinte:

10

His-Leu-Leu-Gln-Phe-Asn-Lys-Met-Ile-Lys-

```

20
Phe-Glu-Thr-Arg-Lys-Asn-Ala-Ile-Pro-Phe-
30
Tyr-Ala-Phe-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Trp-
40
Gly-Gly-(Gln ou Arg)-Gly-Arg-Pro-(Lys+Arg)-Asp-Ala-Thr-
50
Asp-Arg-Cys-Cys-Phe-Val-His-Asp-Cys-Cys-
60
Tyr-Gly-Lys-Leu-Ala-Lys-Cys-Asn-Thr-Lys-
70
Trp-Asp-Ile-Tyr-Arg-Tyr-Ser-Leu-(Lys+Arg)-Ser-
80
Gly-Tyr-Ile-Thr-Cys-Gly-Lys-Gly-Thr-Trp-
90
Cys-Glu-Glu-Gln-Ile-Cys-Glu-Cys-Asp-Arg-
100
Val-Ala-Ala-Glu-Cys-Leu-Arg-Arg-Ser-Leu-
110
Ser-Thr-Tyr-Lys-Tyr-Gly-Tyr-Met-Phe-Tyr-
120
Pro-Asp-Ser-Arg-Cys-Arg-Gly-Pro-Ser-Glu-
Thr-Cys

```

A enzima é dependente de íons cálcio para a sua atividade catalítica e apresenta considerável estabilidade térmica, aos ácidos e à uréia, comportamento esse característico dessa classe de enzimas. Sua atividade máxima é obtida a 55°C em pH 7-8. A ocorrência dessa enzima em equilíbrio monômero-dímero é descrita por RADVANYI e BON (1982).

A ocorrência de isoenzimas tem sido relatada por vários autores (FAURE e BON, 1987a,b e WU et alii, 1983). Observa-se que a crotoxina purificada de lotes de venenos coletados de um grande número de serpentes é de fato uma mistura de diversas proteínas de mesmo peso molecular e propriedades enzimáticas e farmacológicas semelhantes, diferindo no entanto levemente em suas propriedades cromatográficas e mobilidade eletroforética (RUBSAMEN et alii, 1971 e WU et alii, 1983). Amostras de venenos obtidos de

uma única serpente mostraram conter 5 a 10 diferentes formas de crotoxina em proporções muito variáveis (FAURE e BON, 1987a). Os autores concluíram dessas observações que essas variantes representam isoformas que devem provavelmente resultar da expressão de diversos gens ou de eventos pós-transcripcionais e não devem representar variabilidade regional ou individual. Isoformas de crotoxina resultariam da associação aleatória de diversas isoformas dos componentes A e B. Observou-se (FAURE e BON, 1987 b e BON et alii, 1988) que, no que se refere a aspectos quantitativos de sua ação enzimática e propriedades farmacológicas, duas classes de isoformas podem ser identificadas: os complexos crotoxina formados com as isoformas do componente B da chamada 1ª classe possuem uma atividade catalítica mais baixa porém são farmacologicamente mais potentes que aqueles formados com isoformas do componente B da 2ª classe. As isoformas do componente A mostraram-se equivalentes dentro desses critérios.

3.2.2. Fosfolipase e profosfolipase A_2 de pâncreas de porco.

A fosfolipase de pâncreas ocorre nesse órgão sob a forma de um precursor ou proenzima, também chamado zimogênio, enzimaticamente inativo, o qual é ativado no trato duodenal através da remoção de sete resíduos de aminoácidos (Glu-Glu-Gly-Ile-Ser-Ser-Arg) da porção N-terminal da molécula pela enzima digestiva tripsina.

A proenzima e a enzima ativa de porco foram isoladas e purificadas por DE HAAS et alii (1968a) e seu sequenciamento de aminoácidos determinado pelo mesmo autor e colaboradores (DE HAAS et alii, 1970a). A localização das 6 pontes dissulfeto foi determinada por DE HAAS et alii (1970b).

O sequenciamento completo da enzima ativa e seu zimogênio é mostrado a seguir. Encontra-se assinalado o heptapeptídeo N-terminal presente apenas na proenzima.

Heptapeptídeo N-terminal	
<u>Glu-Glu-Gly-Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Leu-Trp-</u>	10
Gln-Phe-Arg-Ser-Met-Ile-Lys-Cys-Ala-Ile-	20
Pro-Gly-Ser-His-Pro-Leu-Met-Asp-Phe-Asn-	30
Asn-Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-Leu-Gly-Gly-	40
Ser-Gly-Thr-Pro-Val-Asn-Glu-Leu-Asn-Arg-	50
Cys-Glu-His-Thr-Asp-Asn-Cys-Tyr-Arg-Asp-	60
Ala-Lys-Asn-Leu-Asn-Asp-Ser-Cys-Lys-Phe-	70
Leu-Val-Asp-Asn-Pro-Tyr-Thr-Glu-Ser-Tyr-	80
Ser-Tyr-Cys-Ser-Ser-Asn-Thr-Glu-Ile-Thr-	90
Cys-Asn-Ser-Lys-Asn-Asn-Ala-Cys-Glu-Ala-	100
Phe-Ile-Cys-Asn-Asp-Arg-Asn-Ala-Ala-Ile-	110
Cys-Phe-Ser-Lys-Ala-Pro-Tyr-Asn-Lys-Glu-	120
His-Lys-Asn-Leu-Asn-Thr-Lys-Lys-Tyr-Cys-	130

O peso molecular é de cerca de 14000 e o número de aminoácidos é de 130 para a proenzima e 123 para a fosfolipase ativa, com pontos isoelétricos de 6,5 e 7,4, respectivamente (DE HAAS et alii, 1968a,b).

Estudos cristalográficos de raios X foram inicialmente publicados em 1976 por DRENTH et alii. A estrutura proposta nesse trabalho, no entanto, continha incorreções as quais induziram a erro publicações subsequentes (JIRGENSONS e DE HAAS, 1977). Em 1983, o autor e colaboradores indicaram os erros cometidos, publicando uma versão revisada da análise

cristalográfica (DIJKSTRA et alii, 1983), a qual diferia grandemente da análise original. Esses resultados indicaram que a estrutura tridimensional da PLA₂ pancreática de porco é de modo geral muito semelhante à da bovina (DIJKSTRA et alii, 1978, 1981a), incluindo o sítio ativo. Uma apreciável diferença conformacional foi no entanto observada na alça que se estende do resíduo 59 ao 70, onde uma única substituição de resíduo de aminoácido na posição 63 (Val na enzima bovina por Phe na enzima de porco) causa um completo rearranjo da conformação da cadeia peptídica. Além disso, foi observada na fosfolipase de porco a presença de um segundo sítio íon cálcio no cristal, além daquele localizado no sítio ativo. Este segundo íon estaria, segundo DIJKSTRA et alii (1983), localizado num eixo cristalográfico de ordem 2, estabilizando a interação entre duas moléculas vizinhas.. Considerações mais detalhadas sobre aspectos dessa análise no que se refere a percentuais de estrutura secundária são apresentados no item 6, uma vez que são pertinentes à discussão de parte dos resultados deste trabalho.

Estudos estruturais realizados em fosfolipase A₂ de pâncreas de boi e mais extensos do que aqueles disponíveis para pâncreas de porco são encontrados na literatura (DIJKSTRA et alii, 1978 e 1981a). As duas enzimas apresentam alto grau de homologia sequencial em sua estrutura primária (85%). Considerando-se que aspectos estruturais relativos a atividade catalítica devam ser semelhantes para enzimas de uma mesma classe, sobretudo para aquelas altamente homólogas, pode-se concluir pela conveniência da inclusão aqui dessas informações, embora tenha-se claro que as mesmas referem-se a uma proteína assemelhada, ainda que em alto grau.

De acordo com o trabalho de DIJKSTRA et alii de 1978, a fosfolipase A₂ bovina mostra no mapa de densidade eletrônica (com resolução de 2,4 Å) a forma de um cilindro achatado com dimensões de 22x30x42 Å. Os aspectos que mais se destacam

são o alto conteúdo de estrutura secundária (50% α -hélice, 10% folhas β) e as 6 pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura tridimensional da molécula. Com as informações disponíveis do trabalho estrutural dessa mesma enzima a uma resolução de 1,7 Å, publicado por DIJKSTRA et alii (1981 b), foi possível calcular-se um percentual de folhas β de $\approx$ 14%. O sítio ativo (DIJKSTRA et alii, 1981a) encontra-se numa cavidade da superfície da molécula, onde se localiza a His 48, de importante papel na atividade catalítica. Próximos a esse resíduo estão 2 resíduos de Asp, nas posições 49 e 99, respectivamente acima e abaixo da His 48, na depressão referida. Uma densidade eletrônica extra na vizinhança da His 48, próxima ao Asp 49 foi interpretada como sendo um íon cálcio. Associado a esta densidade está também o grupo OH da Tyr 52. Há indicações de que após a ligação do cálcio, uma tirosina de cadeia lateral torna-se parcialmente protegida do solvente aquoso. O cálcio parece também induzir um efeito de carga num resíduo de histidina. Supõe-se que o grupo NH_2 da Ala 1 do sítio ativo ligue-se a uma molécula de água através de pontes de hidrogênio, a qual possivelmente se liga ao íon cálcio no sítio ativo.

O mecanismo catalítico descrito no mesmo trabalho para a fosfolipase A_2 bovina inclui uma primeira etapa de ataque nucleofílico por uma molécula de H_2O , seguida pela transferência de próton pelo anel imidazólico da His 48 e pela fixação e estabilização do oxigênio da carbonila do substrato por grupos NH levemente carregados positivamente e possivelmente pelo íon cálcio. Este íon liga-se também ao grupo fosfato do substrato, uma vez que ele tem somente um grupo carboxila (do Asp 49) na sua esfera de coordenação.

Com referência à maior atividade catalítica contra fosfolípidos micelares, considera-se que nessas estruturas o fosfolípido esteja na conformação adequada para entrar no sítio ativo (uma "torcedura" no C_α da segunda cadeia do

fosfolípide), sem necessidade de mudança de conformação, o que constitui uma vantagem entrópica. Outra vantagem seria o fato de que existe uma orientação preferencial da molécula de fosfolipase em relação aos fosfolípidos micelares. Essa orientação mais provável deve-se à existência de resíduos (hidrofóbicos e polares) que ocorrem na entrada do sítio ativo, isto é, em sua porção mais externa, como também a alguns resíduos situados nos extremos da molécula. Embora tais resíduos não sejam sempre conservados em posições homólogas, seu caráter polar/hidrofóbico se mantém em fosfolipases de diversas origens. Assim, como aspecto característico tem-se sempre um excesso de pelo menos 2 resíduos básicos em relação aos ácidos, sugerindo a formação de pontes salinas com os grupos fosfato da micela, as quais orientariam desse modo a enzima em relação à superfície micelar.

4. Materiais e métodos experimentais e de análise

4.1. Isolamento e purificação de proteínas

4.1.1. Toxina γ de escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*

As amostras de toxina γ de escorpião brasileiro *Tityus serrulatus* foram isoladas no laboratório do Prof. J.R. Giglio, no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Os processos de isolamento e purificação empregados podem ser resumidos como se segue:

Os escorpiões são mantidos em laboratório em viveiros especiais e seu veneno extraído, através de choque elétrico, em intervalos de duas semanas. O veneno assim obtido é imediatamente seco em dessecador a vácuo à temperatura ambiente e armazenado em refrigerador a 5°C. Cada extração produz em média 0,3 mg de veneno seco (SAMPAIO, 1988).

O procedimento original básico para a separação das toxinas de *Tityus serrulatus* foi descrito por SAMPAIO (1988) e SAMPAIO et alii (1983). ARANTES et alii (1984) entretanto descreveram uma metodologia que simplifica o procedimento de SAMPAIO et alii (1983), omitindo o uso de uma etapa inicial de filtração molecular em Sephadex G-25. O procedimento segundo Arantes foi aquele empregado no isolamento da toxina utilizada neste trabalho.

Em linhas gerais, submete-se o veneno bruto extraído com NH_4HCO_3 a uma cromatografia em CM-celulose-52. Elui-se inicialmente com NH_4HCO_3 0,01M pH 7,8 e a seguir com um gradiente convexo de concentração do mesmo tampão de 0,01M a 1,0M. Este procedimento produz 13 frações. Dentre elas a

fração XIII, que se mostra idêntica à fração T₁VIII de SAMPAIO et alii (1983), à toxina γ de POSSANI et alii (1977) e à TsTxI de TOLEDO e NEVES (1976) é a fração que se utilizou neste trabalho e que denominaremos ao longo do mesmo toxina γ .

A possível homologia ou identidade desta toxina com a fração T₂IV de SAMPAIO (1980) foi considerada (SAMPALIO, 1980 e POSSANI et alii, 1981a). Essa especulação decorre do fato de ambas apresentarem idênticas mobilidades eletroforéticas bem como idênticos volumes de eluição na etapa de eluição cromatográfica do método de SAMPAIO (1980). No entanto há dados que indicam que a fração T₂IV difere da toxina γ em relação aos aminoácidos Lys, Asp e Leu (SAMPALIO, 1988).

Segundo SAMPAIO (1988), a toxina γ (ou T₁VIII ou TsTxI) caracteriza-se por apresentar 62 resíduos de aminoácidos, PM 7218 e lisina N-terminal.

4.1.2. Fosfolipase A₂(fosfatidilcolina 2-acilhidrolase, E.C. 3.1.1.4.) de pâncreas de porco e seu zimogênio (pro-fosfolipase A₂)

As amostras de fosfolipase A₂ de pâncreas de porco (ppPLA₂) e de seu zimogênio ou proenzima (ppProPLA₂) foram obtidas no laboratório do Prof. P.S. Araujo, no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP. O esquema de isolamento e purificação utilizado foi rigorosamente aquele descrito por NIEUWENHUIZEN et alii em 1974.

Em linhas gerais, pode-se descrevê-lo como se segue: um homogenato límpido de pâncreas é obtido após tratamento apropriado de cerca de 1 kg do órgão fresco. Esse tratamento inclui etapas de limpeza do órgão, homogeneização do mesmo em NaCl 0,15M em banho de gelo, acidificação com ácido

clorídrico seguida de brusco aquecimento a 70° C, manutenção dessa temperatura por 3 minutos e resfriamento a 5° C. Centrifuga-se então a 0° C por 20 minutos a 7000g para separação do material insolúvel e elimina-se a porção de gordura do sobrenadante por adição de Hyflo Supercel.

O homogenato obtido é então levado a pH 7,0 com amônia e submetido a 2 adições sucessivas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (333,1g sal/l filtrado e 129g sal/l filtrado) para precipitação das proteínas. Os precipitados são separados em cada etapa por centrifugação a 7000g por 30 minutos, a frio. A dissolução desses precipitados é feita em volume mínimo de H_2O , o pH é ajustado em 7,0 e DFP (diisopropil fluorofosfato) é adicionado (5% em volume de uma solução 0,1M em isopropanol anidro) com a finalidade de impedir a ativação do zimogênio por traços de tripsina endógena. A seguir efetua-se diálise contra água corrente para remoção dos sais. Uma quantidade correspondente a 2% em volume da mesma solução de DFP 0,1M referida acima é então adicionada. Liofiliza-se. Segundo os autores, este material seco é estável por anos a -20° C.

Procede-se a seguir a uma etapa de separação cromatográfica em DEAE-celulose empacotada em coluna com tampão Tris HCl 5mM, pH 7,3. Para tanto, o liofilizado obtido é dissolvido em H_2O , adicionado de solução DFP 5% v/v e dialisado a 4° C por 4 horas contra o mesmo tampão da coluna. Como eluentes são utilizados o tampão Tris mencionado até o volume vazio da coluna, onde são eluídas algumas proteínas catiônicas e a seguir um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,1M, no mesmo tampão. Nessa região são obtidos 3 picos (A, B e C), dos quais o último contém o zimogênio (ppPro PLA₂).

A fração C é então dissolvida em tampão acetato 5mM, pH 6,0, numa concentração de 50-100 mg/ml. Dialisa-se contra o mesmo tampão por 4 horas a 4°C e aplica-se a seguir a uma

coluna de CM-celulose empacotada com o tampão acima. Elui-se com o mesmo tampão até o volume vazio, onde sai uma pequena quantidade de contaminantes aniônicos) e a seguir aplica-se um gradiente linear de NaCl (0-0,4M), preparado no mesmo tampão, para eluição do zimogênio, o qual ocorre como um pico simétrico a 0,2M NaCl. Traços de PLA₂ pura são eluídos a 0,26M de NaCl. As frações contendo o zimogênio a uma atividade específica constante são reunidas, tratadas com DFP e dialisadas extensivamente contra H₂O a 4° C.

O rendimento indicado pelo método é de 260 mg de zimogênio, com uma atividade específica (medida após ativação por tripsina) de 1000 unidades/mg proteína calculada em base seca ou 1150 unidades/mg proteína quando se utilizam dados de densidade óptica, com $\epsilon_{280} = 12,4$. O rendimento descrito no método é de 42% após a última etapa cromatográfica. Eletroforese em gel de amido e disco-eletroforese a diferentes valores de pH indicam a pureza da preparação.

Para a ativação do zimogênio à forma ativa da PLA₂, procede-se do seguinte modo: incuba-se uma solução resfriada em banho de gelo de 500 mg de zimogênio em 10 ml de CaCl₂ 0,01M com 0,1 % em peso de tripsina pura. Acompanha-se o aumento da atividade enzimática a cada 10 minutos. Cerca de 1 hora após é atingida uma atividade constante, indicando que todo o zimogênio foi convertido à enzima ativa. Adiciona-se excesso de DFP para interromper a ação da tripsina e após 15 minutos a pH 8,0 dialisa-se a 4°C contra tampão Tris-HCl 5mM pH 7,3, para remoção do peptídeo de ativação bem como dos produtos de hidrólise de DFP.

4.1.3. Fosfolipase A₂ de *Crotalus durissus terrificus*

A fosfolipase A₂ do complexo crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* (CdtPLA₂) foi obtida no laboratório do Prof. C. J. Laure, no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Os procedimentos para seu isolamento e purificação foram descritos por GABILAN (1983) e se baseiam em trabalho anterior de LAURE et alii (1971).

O veneno de cascavel foi obtido no Instituto Butantan de São Paulo e Serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. A extração desse veneno é feita sob banho de gelo por compressão manual das glândulas veneníferas seguida por secagem do mesmo em dessecador a vácuo contendo hidróxido de sódio e ácido sulfúrico e mantido a 4°C.

A purificação da crotoxina a partir do veneno bruto foi feita tomando-se inicialmente 0,4 g de veneno seco e dissolvendo-o em 3-5 ml de tampão formiato de amônio 0,5 M a pH 3,5. A amostra solubilizada foi submetida a filtração em coluna 4 cm x 45 cm contendo Sephadex G-75 equilibrada e eluída com o mesmo tampão num fluxo de 1 ml/min. A fração que apresenta a maior absorbância corresponde à crotoxina e representa a terceira fração a eluir da coluna. Esta fração, após concentrada, foi dessalinizada em Sephadex G-10, em tampão ácido fórmico 0,1N; a proteína emerge no volume vazio e o sal, ao fim da filtração. Procedeu-se a uma refiltração nas mesmas condições anteriores (Sephadex G-75) para maior pureza. A amostra foi a seguir concentrada, dialisada e liofilizada.

Para o isolamento da crotapotina e fosfolipase A₂ a partir da fração crotoxina, procede-se ao fracionamento da

mesma em coluna de troca iônica, utilizando-se como resina SP-Sephadex e como eluente o cloreto de guanidina em gradiente salino descontínuo e crescente.

Foram tomadas cerca de 0,1 g de crotoxina dissolvida em 3,0 ml de cloreto de guanidina 1,0 M, pH 4,3. Aplicou-se esta amostra a uma coluna de 2,5 cm x 40 cm de SP-Sephadex C-25, equilibrada com o tampão cloreto de guanidina 1,0 M. Eluiu-se com 120 ml de um gradiente salino descontínuo de 1,0 M (40 ml), 2,0 M (20 ml) e 3,0 M (60 ml) do mesmo tampão. O fluxo da coluna foi de 0,5 ml/min. São eluídas nessa filtração 3 frações das quais a fração III corresponde à fosfolipase A₂ e a fração I à crotapotina. Após concentração, a fração III foi dessalinizada por filtração em gel e recromatografada em SP-Sephadex C-25 nas mesmas condições anteriores para maior homogeneidade. Procedeu-se a seguir novamente às etapas de dessalinização, concentração, diálise contra água e liofilização. O rendimento final está ao redor de 41%.

Os testes de pureza indicaram a homogeneidade da amostra de fosfolipase A₂ por método cromatográfico e de focalização isoeletrica em placa de Sephadex. O ponto isoeletrico para PLA₂ foi determinado como igual a 8,6 por focalização isoeletrica. O resíduo N-terminal determinado pelo método de dansilação correspondeu à serina.

4.2. Sistemas lipíde-proteína

Foram preparadas vesículas unilamelares de lecitina de ovo destinadas ao estudo de sistemas lipíde-proteína. A lecitina usada foi preparada no laboratório do Prof. J.A.G. Arêas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, segundo método de Singleton et alii (1965). A pureza do material foi

testada por cromatografia bidimensional e uma única banda foi observada. O material foi armazenado a -45°C .

De acordo com TATTRIE et alii (1968), os ácidos graxos predominantes na molécula de fosfatidilcolina de ovo são: na posição α o 16:0 e o 18:0, com respectivamente 70% e 21% de ocorrência e na posição β o 18:1 e o 18:2 + 18:3, com 69% e 22% de ocorrência, respectivamente.

O processo de preparação das vesículas envolveu as seguintes etapas:

a) Preparação de um filme de lecitina por dissolução de uma massa conhecida (no caso 0,0107 g) do fosfolípide em 0,2 ml de HCCl_3 p.a. em tubo de ensaio. Após conveniente rotação manual do mesmo para evaporação do solvente, procedeu-se à passagem de fluxo de N_2 e submeteu-se o sistema a alto vácuo por 2 horas.

b) Adicionou-se 1 ml de KCl 0,16 M ao tubo contendo o filme de lecitina. Deixou-se por alguns minutos para hidratar, agitando levemente para desprender o filme das paredes. A seguir, submeteu-se o sistema a agitação em vórtex por cerca de 1 minuto.

c) Sonicação: utilizando-se um sonicador com ponta de titânio (marca Braunsonic, modelo 1510), empregou-se um procedimento padrão para obtenção de vesículas regulares de cerca de $350 \text{ \AA}$ de diâmetro. Este procedimento consiste em sonicações repetidas com duração de 1 minuto cada uma, a 90 watts de potência do sonicador, interrompidas por intervalos de descanso de 1 minuto, durante 30 minutos. O tubo foi mantido em banho de gelo e água durante todo o processo. A presença de um leve precipitado escuro decorrente do desprendimento de partículas de titânio do sonicador foi eliminada por centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos.

A preparação de lecitina foi guardada em geladeira e utilizada em um intervalo de 24 horas. A concentração em

lecitina correspondeu a ~1% (p/v) ou a uma molaridade de cerca de $1,33 \times 10^{-2}$ M.

O sistema proteína/fosfolípide utilizado em espectroscopia Raman foi preparado por adição em capilar de cerca de 2 mm de diâmetro de 0,001 g de ppProPla₂ em 3 µl de lecitina sonicada. A concentração em proteína para esse sistema foi portanto de 33% (p/v) ou $2,4 \times 10^{-2}$ M. A relação molar proteína/lecitina foi de 1:0,55, tomando-se os valores de 14000 e 750 para os pesos moleculares de ppProPla₂ e lecitina, respectivamente. O critério para escolha da faixa de concentração de proteína está relacionado ao nível mínimo de detecção espectroscópica para o efeito Raman em nosso instrumento.

A preparação dos sistemas ppProPla₂/SDS foi feita através da adição da proteína na concentração de 20% (p/v) ($1,4 \times 10^{-2}$ M) à solução do surfactante nas concentrações de 1% e 20% (p/v). As razões molares de mistura ppProPLA₂/SDS foram em cada caso iguais a 1/2,7 e 1/52, respectivamente. Um sistema ppProPLA₂/SDS, r.m.=200, contendo a proteína em nível abaixo do limiar de detecção espectroscópica (a 5% p/v) foi também preparado para que se analisasse seu efeito sobre as linhas Raman do surfactante.

4.3. Métodos espectroscópicos

4.3.1. Espectroscopia de espalhamento Raman laser

Nos estudos de espalhamento Raman foi utilizado um espectrômetro Raman laser marca Jarrel-Ash, modelo 25-300, com duplo monocromador, equipado com lasers de íons argônio e criptônio.

Nesse instrumento, a radiação laser proveniente do tubo de descarga é desviada de 90° com um mínimo de perda de intensidade e através de uma lente incide sobre a amostra. O feixe espalhado é focalizado através de duas lentes na fenda de entrada do duplo monocromador. A essa fenda mecânica corresponde naturalmente um valor de fenda espectral que guarda uma relação inversa com o quadrado do comprimento de onda da radiação incidente. Este valor define a resolução em cm^{-1} .

A saída do espectrômetro está focalizada no fotocatodo de uma fotomultiplicadora (ITT FW 130) a qual é termoeletricamente refrigerada a cerca de -22°C . Esse resfriamento responde por uma diminuição considerável do nível de ruído (de 200 cont/s para 2 cont/s).

Levando-se em conta a dependência da radiação espalhada com a 4ª potência da frequência da radiação excitante, foram inicialmente consideradas as radiações laser em frequências mais altas, a saber as linhas 488 nm e 514,5 nm. No entanto, algumas dificuldades relativas à ocorrência de linhas de plasma para a radiação a 488 nm fizeram com que a linha 514,5 nm fosse empregada. Obturadores na saída do feixe laser foram utilizados para interceptar possíveis linhas espúrias provenientes do tubo de descarga, uma vez que essas linhas são emitidas em ângulos maiores do que aquele que define a colimação do feixe laser (0,7 miliradianos).

Típicamente foram empregados valores de potência do laser de cerca de 30-40 mW para amostras sólidas e 80-100 mW para soluções. A resolução foi da ordem de $7,5 \text{ cm}^{-1}$. Uma lâmina de meia onda a 45° foi empregada para o registro de espectros de soluções, sendo colocada no caminho óptico do laser antes de sua incidência na amostra.

Os espectros foram registrados somente após terem sido as amostras expostas à radiação laser por um tempo suficiente para a supressão do efeito de fluorescência. Os registros foram feitos a 20 ou 40 $\text{cm}^{-1}/\text{min}$, observando-se os valores adequados para constante de tempo e abertura das fendas. Os espectros foram registrados à temperatura ambiente, em modos de detecção DC (direct current) ou PC (photon counting).

4.3.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Na obtenção dos espectros infravermelhos foram utilizados um espectrômetro infravermelho da Perkin Elmer, modelo IR-180 e um espectrômetro FT-IR Perkin-Elmer 1750.

O primeiro foi empregado para o registro dos espectros IR de absorção. O segundo permitiu a obtenção não só dos espectros em absorbância como também de espectros com deconvolução e de derivada segunda, através de tratamentos matemáticos dos dados.

O espectrômetro Perkin-Elmer IR-180 é um instrumento de feixe duplo, automatizado em várias de suas funções, cobrindo a faixa de 180 cm^{-1} a 4200 cm^{-1} através de um conjunto de 5 redes. O limite mínimo de frequência em nossos espectros (700 cm^{-1}) deveu-se ao material da janela utilizada (Irtran II), o qual absorve abaixo desse valor. Nesse instrumento, os espectros são registrados em relação a um espectro de fundo de referência. O espectrômetro opera com fontes Global (carbeto de silício).

O espectrômetro FT-IR Perkin Elmer 1750 é um instrumento cujo princípio se baseia no interferômetro de Michelson (PERKINS, 1986), numa versão aprimorada. E equipado com feixe único e utiliza fonte de cerâmica

estabilizada, operando a 1400 K. Para os procedimentos de alinhamento, conta com um laser de hélio-neônio, com potência máxima de 5mW, emitindo radiação visível no comprimento de onda de 632,8 nm. Cobre a faixa de 450 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . É instrumento de grande precisão. Os espectros são obtidos da razão entre o espectro obtido com a amostra no feixe e aquele chamado de espectro de fundo, obtido sem amostra. Os espectros são computados a partir dos interferogramas por uma transformada de Fourier. Como os tempos de varredura são em geral muito pequenos comparados com aqueles de instrumentos dispersivos, em geral várias varreduras da amostra são feitas e o espectro médio é automaticamente calculado.

O módulo computacional que compõe o espectrômetro Perkin Elmer FT-IR 1750 possui recursos que permitem a obtenção de espectros deconvoluídos e espectros derivados. Sua descrição está compilada na referência: PERKIN ELMER Command Descriptions. Recente revisão sobre o emprego de métodos de deconvolução no IR no estudo de estrutura proteica é disponível na literatura (SUREWICZ e MANTSCH, 1989).

Espectros derivados - Na obtenção da derivada segunda dos espectros apresentados neste trabalho foi utilizado o comando *deriv* o qual emprega a função derivativa de Savitsky-Golay aplicada à região espectral desejada. Esta função produzirá curvas adequadas a partir tanto de bandas gaussianas como lorentzianas. O parâmetro a ser escolhido pelo operador é a largura da janela, a qual deverá ser apropriada à largura da banda cuja derivada está sendo obtida; de modo geral, quanto maior a banda, maior a janela e vice versa. Em nossos espectros utilizamos valores que preencheram esses requisitos.

Espectros deconvoluídos - na obtenção dos espectros deconvoluídos foi utilizado o comando *enhance*, um algoritmo que se utiliza de um processo iterativo para aprimoramento da observabilidade de bandas espectrais sobrepostas. A resolução de bandas com essas características é obtida por um processo chamado deconvolução espectral. Esse processo faz mover a intensidade de regiões externas da banda para o seu centro, reduzindo assim sua efetiva meia largura e aprimorando a resolução (observabilidade).

O algoritmo *enhance* é mais adequado a espectros de absorbância que apresentam formas de pico lorentzianas. Bandas intensas em espectros de transmitância não são lorentzianas e produzirão artefatos quando intensificadas por esse comando. É necessário também que os dados espectrais a serem analisados apresentem uma boa relação sinal/ruído, próxima de 1000 para 1.

4.4. Análise espectral Raman

O método de análise espectral Raman empregado neste trabalho foi aquele desenvolvido por LIPPERT et alii em 1976. Além dos motivos inerentes ao método, já comentados no item 2.3.5., a razão de sua escolha prendeu-se também ao fato de que ele envolve um procedimento matemático relativamente simples, permitindo além disso que análises sejam feitas em espectros registrados em equipamentos não interfaciados a computador, o que em nosso caso representou uma limitação para o emprego de alguns métodos de análise mais recentes.

O procedimento emprega como modelo as intensidades espectrais relativas das vibrações amida do esqueleto de poli(L-lisina) em suas conformações α helicoidais, folhas β antiparalelas e conformação não regular, estimadas a 1240

cm^{-1} em H_2O (amida III) e a 1632 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} em $^2\text{H}_2\text{O}$ (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 H_2O e em $^2\text{H}_2\text{O}$, 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 β , em razão da inadequação da molécula-modelo escolhida.

O sistema de equações desenvolvido por LIPPERT et alii é apresentado a seguir:

$$\begin{matrix} \text{prot} & \text{prot} & & \alpha & & \beta & & \text{R} \\ \text{C} & I_{1240} & = & f_{\alpha} I_{1240} & + & f_{\beta} I_{1632} & + & f_{\text{R}} I_{1240} \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} \text{prot} & \text{prot} & & \alpha & & \beta & & \text{R} \\ \text{C} & I_{1632} & = & f_{\alpha} I_{1632} & + & f_{\beta} I_{1632} & + & f_{\text{R}} I_{1632} \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} \text{prot} & \text{prot} & & \alpha & & \beta & & \text{R} \\ \text{C} & I_{1660} & = & f_{\alpha} I_{1660} & + & f_{\beta} I_{1660} & + & f_{\text{R}} I_{1660} \end{matrix}$$

$$1,0 = f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{\text{R}}$$

em que:

$\begin{matrix} \text{prot} \\ I_{1240} \end{matrix}$ = intensidade espectral a 1240 cm^{-1} relativa àquela a 1448 cm^{-1} em H_2O

$\begin{matrix} \text{prot} & \text{prot} \\ I_{1632} & \text{e} & I_{1660} \end{matrix}$ = intensidades espectrais nas frequências indicadas relativas àquela a 1448 cm^{-1} em $^2\text{H}_2\text{O}$

$\begin{matrix} (\alpha, \beta, \text{R}) \\ I \end{matrix}$ = intensidades relativas (I_i/I_{1448}) para a

poli(L-lisina) em cada conformação considerada. Os valores empregados no cálculo foram aqueles obtidos por YU et alii (1973) e modificados por LIPPERT et alii (1976) a partir de dados espectrais de poli(L-lisina) e de dados cristalográficos de raios X de lisozima e ribonuclease A e são os seguintes:

	H ₂ O	D ₂ O	
	-----	-----	-----
	1240 cm ⁻¹	1632 cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹
Intensidade relativa para α-hélice	0,00	0,80	0,55
Intensidade relativa para folhas β	1,20	0,72	0,88
Intensidade relativa para conformação ao acaso	0,60	0,08	0,78

f_{α} , f_{β} , f_R = frações de resíduos nas conformações referidas (α hélice, folhas β antiparalelas e conformação ao acaso) presentes na molécula de proteína.

C^{prot} = constante escalar para a intensidade da banda a 1448 cm⁻¹ relativa àquela do composto modelo, poli-L-lisina.

Pode-se levantar crítica ao 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, aliada à sua praticidade de emprego, recomendam sua aplicação.

As medidas de intensidades espectrais foram feitas em todos os casos tomando-se como ponto de referência para intensidade zero uma linha base a qual mostrou ser na verdade uma combinação do espectro do solvente (para o caso de espectros de solução) com uma larga banda de fluorescência.

4.5. Preparação de amostras para estudos espectroscópicos

As amostras empregadas para o registro de espectros no infravermelho foram películas sólidas preparadas por evaporação de pequenos volumes de solução da proteína depositados sobre janelas de Irtran II e a seguir lentamente evaporados em dessecador sob vácuo.

Na espectroscopia Raman, amostras líquidas foram estudadas em capilares de vidro Pyrex com cerca de 2 mm de diâmetro. Os volumes empregados foram da ordem de 5-10 μ l. As concentrações de proteína foram de 10% (p/v) para a toxina γ ($1,5 \times 10^{-2}$ M) e de 20 a 40 % (p/v) para as fosfolipases A_2 ($1,4$ a $2,9 \times 10^{-2}$ M). Tais concentrações estão relacionadas com o nível de sensibilidade do equipamento. Pela impossibilidade de medição de valores de pH nos mínimos volumes utilizados, considerou-se que esses

valores correspondiam àqueles dos tampões empregados no preparo das respectivas soluções.

Para medidas de pH e p^2H foi empregado um potenciostato Analion-PM 600. Os valores de p^2H mencionados neste trabalho referem-se àqueles obtidos sem correções, diretamente do pHmetro, após calibração com tampões aquosos de referência.

Amostras sólidas foram empacotadas em celas de latão apropriadas.

Com a finalidade de preencher os requisitos necessários para a aplicação da análise espectral pelo método de LIPPERT et alii (1976), procedeu-se à deuteração de amostras de proteína. Para tal, as mesmas foram expostas a 2H_2O por um período não inferior a 3 horas a 25°C. Uma efetiva troca de prótons amídicos, da ordem de 80-90%, é assegurada nessas condições de acordo com BLOUT et alii (1961). Para as amostras sólidas, um procedimento semelhante foi adotado, seguido de lenta evaporação do solvente em dessecador a vácuo.

Os reagentes empregados foram de grau analítico e utilizou-se água destilada e deionizada. As pesagens foram feitas em balança analítica Zakzady-Mechaniki Precyzyjnej, Poland.

5. Resultados

5.1. Estudo vibracional da toxina γ de *Tityus serrulatus*

Os espectros Raman laser da toxina sólida e em solução tampão de acetato de sódio 0,1M, pH 4,5 nas regiões 400-1800 cm^{-1} e 2800-3100 cm^{-1} são apresentados na figura 3. O pH de ensaio para a toxina em solução encontra-se na faixa de pH em que a mesma apresenta sua atividade total (AREAS et alii, 1987). Nesses espectros é possível observar-se a presença da banda de fluorescência já mencionada, que se estende por vasta região espectral e sobre a qual se distingue o perfil das bandas Raman.

O espectro infravermelho da película evaporada da toxina na região de 700 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} é apresentado na figura 4.

A Tabela 1 contém a atribuição das principais frequências Raman observadas para a toxina sólida e em solução. A região espectral de 2500 a 2700 cm^{-1} (não mostrada), onde vibrações de estiramento S-H seriam esperadas, não registrou a ocorrência de bandas. A Tabela 2 indica as frequências no infravermelho para a película de toxina γ , bem como sua atribuição, de acordo com as correlações propostas por KRIMM e BANDEKAR (1980).

Os principais modos de vibração amida, assim como as bandas espectrais de maior relevância para a discussão dos resultados, encontram-se assinaladas para facilidade de reconhecimento.

Figura 3 - Espectros Raman de toxina γ de *Tytxus serrulatus*: a) sólido liofilizado; b) em solução de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.5. A: região de 400 a 1800 cm^{-1} ; B: região de estiramento C-H.

Figura 4 - Espectro de transmitância no infravermelho de toxina γ de *Titivus serrulatus* (película evaporada).

Tabela 1

Atribuição das frequências Raman da toxina γ de *Tityus serrulatus* sólida e a 10% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,5.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
Sólida	Em solução	
511	512	ν (S-S)
567		
643	645	ν (C-S) (Cys)
721	720	ν (C-S) (Met e Cys)
760	760	Trp (anel indólico)
829	832	[Dubleto de Tyr
853	854	
879	880	Trp (anel indólico)
	930	α -hélice [ν (C-C)]
966		
	975	
	987	
	1005	[Phe (respiração do anel)
1011	1011	
	1032	Folhas β , Phe
	1082	
1131	1130	
1177	1180	Phe
1208	1208	Phe
	1235	[Amida III, tautômeros de His
1259	1253	
	1265	
	1309	
1342	1335	Trp (anel indólico)
1357	1355	Trp (anel indólico)
	1395	
1448	1443	δ (CH ₂)
1513		Tyr
1550	1548	Trp
	1582	Phe
1597	1598	[vibrações planares de anéis aromáticos
1617	1618	
1648	1650	
	1663	

Tabela 1, cont.

Número de onda (cm^{-1})		Atribuição	
Sólida	Em solução		
1670		Amida I	
	1680		
1686	1692		
1800			
2870	2875	$\nu(\text{C-H})$	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2930	2934		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2960	2975		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
3060	3068		$\nu(\text{C-H})$ (aromáticos)

Tabela 2

Atribuição das frequências vibracionais no infravermelho de película sólida de toxina γ de *Tityus serrulatus*

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1234	Amida III
1515	Tyr
1530	Amida II
1540	
1650	Amida I
3300	$\nu(\text{N-H})$

5.2. Estudo vibracional das fosfolipases A₂: CdtPLA₂, ppPLA₂ e ppProPLA₂

Os espectros Raman de ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂ em condições deuteradas e não deuteradas, no estado sólido e em solução sob diferentes condições de meio são mostrados nas figuras de 5 a 9. Os espectros foram registrados nas regiões de 400 a 1800 cm^{-1} (onde se encontram os principais modos amida e vibrações de cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos), de 2800 a 3100 cm^{-1} (característica do estiramento C-H) e de 2500 a 2700 cm^{-1} (onde se acham as vibrações de estiramento S-H). Esta última região não registrou em nenhum caso a ocorrência de bandas e portanto não foi incluída nas figuras. A região de estiramento C-H pode ser observada na figura 10 para alguns dos sistemas estudados. O comportamento espectral aí mostrado é representativo, sob o ponto de vista qualitativo, do observado para os demais sistemas contendo fosfolipases. A atribuição das frequências observadas nessa região (DOLLISH et alii, 1974) encontra-se incluída nas Tabelas de 3 a 7. A sensibilidade dessa faixa do espectro a mudanças conformacionais não é amplamente reconhecida, embora a literatura registre alguns estudos nesse sentido (VERMA e WALLACH, 1977).

Os espectros de transmitância no infravermelho de filmes evaporados dessas proteínas estão reunidos na figura 11. Os espectros no infravermelho de derivada segunda e com deconvolução de bandas são apresentados nas figuras 12 a 15.

Bandas vibracionais de interesse para a discussão dos resultados encontram-se assinaladas para melhor identificação.

Figura 5 - Espectros Raman de amostras sólidas liofilizadas de: a) ppPLA₂ ; b) ppPLA₂ deuterada; c) ppProPLA₂; d) ppProPLA₂ deuterada; e) Cdt PLA₂; f) CdtPLA₂ deuterada.

Figura 6 - Espectros Raman de ppProPLA₂ 20% (p/v) em:
a) tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 4,4; b) tampão acetato
de sódio 0,01 M, pH 4,4; c) tampão KCl/HCl 0,05 M, pH 2,6;
d) tampão KCl/HCl 0,05 M, pH 2,3.

Figura 7 - Espectros Raman de ppproFLA₂ 20% (p/v) em:
 a) tampão KH₂PO₄ 0,01 M, pH 7,5; b) tampão KH₂PO₄ 0,01 M,
 p^H 7,3; c) tampão Na₂HPO₄ 0,01 M, pH 11,8; d) tampão
 Na₂HPO₄ 0,01 M, p^H 11,3.

Figura 8 - Espectros Raman de ppProPLA₂ 20% (p/v) em:
 a) H₂O; b) ²H₂O; c) SDS 1% em H₂O (razão molar SDS/prot = 2,5/1); d) SDS 1% em ²H₂O; e) CaCl₂ 0,1 M em H₂O; f) CaCl₂ 0,1 M em ²H₂O.

Figura 9 - Espectros Raman de: a) ppPLA₂ 20% (p/v) em tampão KH₂PO₄ 0,01 M, pH 7,5; b) ppPLA₂ 20% (p/v) em tampão KH₂PO₄, pH 7,3; c) CdtPLA₂ 40% (p/v) em H₂O; d) CdtPLA₂ 40% (p/v) em ²H₂O.

Figura 10 - Região de estiramento C-H dos espectros Raman de : a) ppProPLA₂ 20% em tampão KCl/HCl 0,05 M, pH 2,6; b) ppProPLA₂, sólido deuterado; c) CdtPLA₂, sólido original; d) ppPLA₂, 20% em tampão KH₂PO₄ 0,01 M em ²H₂O, pH 7,3.

Tabela 3

Atribuição das frequências Raman de amostras sólidas de ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂ previamente submetidas a deuteração ou como sólidos originais não tratados.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
a	a*	b	b*	c	c*	
430						[Expansão de regiões hidrocarbônicas; deformação de esqueleto √ (S-S)]
468						
510	508	508	507	505	505	Phe (deformação do anel)
562		563				
		621	623	622	620	√ (C-S) (Cys)
647	644	645	644	642	640	√ (C-S) (Cys)
665				666		√ (C-S) (Met e Cys)
					720	Trp (anel indólico)
760		759	760	755	765	
				805		
830	830	830	830	830	830	[Dubleto de Tyr
855	850	853	852	852	852	
880	880	882	880			Trp (anel indólico)
			890	887		[α-hélice [√ (C-C)]
900		899			900	
927		927	932			
		938		937		
				955		
962		963	964			
970						
	984					
1005	1005	1005	1005	1005	1005	Phe (respiração do anel)
1032	1036	1035				Folhas β, Phe
1059						
1105						
		1128	1128			
	1176	1179	1177	1178		Phe
1210	1204	1208	1205	1208	1202	Phe
1230					1230	
	1241					Amida III
1248		1250	1252	1255		
1263	1259					Tautômeros de His
		1270	1268			
	1272			1273		

Tabela 3, cont.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
a	a*	b	b*	c	c*	
1278					1286	Trp (anel indólico)
1338	1330	1337	1338	1338	1335	
1395	1408					[ν = (CO ₂ ⁻)
		1415	1417			
1452	1450	1448	1448	1448	1450	[δ (CH ₂)
1557		1557	1552	1552	1555	
1585			1586			Trp [Vibrações pla-
1615	1610	1616	1615	1615	1612	
1655	1660	1657	1658	1655		Phe [naves de anéis
				1668	1665	
				1678		[aromáticos
				1688		
					1697	[Amida I
				1778		
1797					1810	
1825	1821					
2875	2878	2880	2878	2876	2873	ν C-H [ν = (CH ₃)
2928	2928	2929	2928	2926	2926	
2972	2975	2967	2967	2962	2958	
3063	3058	3063	3062	3065	3059	

a: ppPLA₂ ; b: ppProPLA₂; c: CdtPLA₂

*: amostras deuteradas (vide texto)

Tabela 4

Atribuição das frequências Raman de amostras de ppProPLA₂ 20% (p/v) em soluções-tampão na faixa ácida de pH.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
a	a*	b	b*	
508	508	500	508	∇ (S-S)
619		622	621	Phe (deformação do anel)
643	641	647	647	[∇ (C-S) (Cys)
	658			
665	665	667	664	∇ (C-S) (Cys)
	740		732	∇ (C-S) (Met e Cys)
762	750	760	758	Trp (anel indólico)
		810	808	
829	826	833	830	[Dubleto de Tyr
837				
854	850	852	852	Trp (anel indólico)
886	878	885		
899		900		[α-hélice [∇ (C-C)]
935		934		
	949		955	
964		965		
1004	1000	1005	1003	Phe (respiração do anel)
1038	1030	1040	1035	Folhas β, Phe
	1053			
1102	1110		1108	
1130		1132		
	1148			
1158			1160	
1174	1173			Phe
		1180	1182	
1208	1207	1208	1205	Phe
1240	1245-1288		1258	[Amida III, tautômeros de His
1268	1262			
1280	1277			
1318	1319	1320	1315	
1338	1334	1338	1334	Trp (anel indólico)
1412	1408			∇ (CO ₂)
1420		1420	1418	
	1442			

Tabela 4, cont.

Número de onda (cm^{-1})				Atribuição	
a	a*	b	b*		
1448				$\delta(\text{CH}_2)$	.
	1455	1450	1450		
1505					
1550		1552	1550	Trp	[vibrações planares de anéis aromáticos]
	1582			Phe	
	1610		1615		
1619		1620			
	1632				
1653	1648	1654	1650	[Amida I]	
1677		1673			
1696					
	1769				
2885	2884	2882	2882	$\nu\text{C-H}$	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2928	2929	2935	2934		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2973		2976	2978		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
3064	3063	3068	3065		$\nu(\text{C-H})$ aromáticos

a: tampão $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ $1,0 \times 10^{-2}$ M, pH 4,4

a*: tampão $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$ $1,0 \times 10^{-2}$ M, p²H 4,4.

b: tampão KCl/HCl $5,0 \times 10^{-2}$ M, pH 2,6

b*: tampão KCl/HCl $5,0 \times 10^{-2}$ M, p²H 2,3.

Tabela 5

Atribuição das frequências Raman de amostras de ppProPLA₂ a 20% (p/v) em soluções-tampão na faixa neutro básica de pH.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
a	a*	b	b*	
453				Expansão de regiões hidrocarbônicas
504	505 624	509 622	510	ν (S-S)
644	643	647	648	Phe (deformação do anel)
664	664	672 683		ν (C-S) (Cys) ⁻ ν (C-S) (Cys)
730	723	730	730	ν (C-S) (Met e Cys)
755	753	760	754	Trp (anel indólico)
	806	810	805	
832	830	830	832	[Dubleta de Tyr
852	852	854	852	
897		888 900		Trp (anel indólico)
933	935 950	937	950	α-hélice [ν (C-C)]
960		964		
1003	1004	1004	1005	Phe (respiração do anel)
1034	1034	1038	1035	Folhas β, Phe
1075				
1105		1108		
1127		1130		
	1164	1160		
1179	1180	1180		Phe
1206	1208	1208	1209	Phe
1245				[Amida III [Tautômeros de His
	1260	1250	1257	
1279		1274		
	1307			
1315			1317	
		1324		
1336	1339	1339	1340	Trp
	1395	1398		
1417	1413	1412	1415	[ν _{as} (CO ₂ ⁻)
		1422		
1450	1452	1448	1452	δ (CH ₂)

Tabela 5. cont.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição	
a	a*	b	b*		
1458					
1550	1552	1555	1555	Trp	vibrações planares de anéis aromáticos
	1588			Phe	
1617	1614	1617	1617		
	1645				
1650	1655	1654	1653	Amida I	
	1669				
	1682				
	1697				
	1718				
		1730			
		1747			
2877	2880	2883	2885		ν _{as} (CH ₃)
2934	2933	2934	2935		
	2977	2978	2982		
			3042	ν(C-H)	ν _{as} (CH ₂)
3067	3066	3068	3065		ν _{as} (CH ₃)
					ν(C-H) aromáticos

a: tampão KH₂PO₄ 1,0 x 10⁻² M, pH 7,5a*: tampão KH₂PO₄ 1,0 x 10⁻² M, p²H 7,3b: tampão Na₂HPO₄ 1,0 x 10⁻² M, pH 11,8b*: tampão Na₂HPO₄ 1,0 x 10⁻² M, p²H 11,3

Tabela 6

Atribuição das frequências Raman de amostras de ppProPLA₂ a 20% (p/v) em solução sob condições diversas de meio.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
a	a*	b	b*	c	c*	
512	508	507 620	508	508 623	507	∇ (S-S) Phe (deformação do anel)
645	648 665	643 670	646	644	652	[∇ (C-S) (Cys)
730	730			735		∇ (C-S) (Met e Cys)
760	755 805	752 808	753	755 810	758 808	Trp (anel indólico)
832	830	833	830	835	828	[Dubleto de Tyr
838						
859	853	853	852	853 887	854	Trp (anel indólico)
892		897	900	902		[α-hélice [∇ (C-C)]
940		929	938	935		
	954	958	955		957	
965				964		
989	985			987		Phe (respiração do Phe anel)
1008	1007 1035	1003 1040 1060 1102	1005 1038 1064	1004 1035 1058 1100	1005 1034	Folhas β, Phe
					1115	
		1124 1155		1127 1158		
	1180	1175		1175	1185	Phe
1210	1210	1209	1208	1208	1210	Phe
1250			1254	1248		[Amida III
	1267	1265			1258	[Tautômeros de His
1280		1283		1272	1283	[Tro
			1290			
1320	1324	1318			1316	
			1338	1333	1334	
1342	1340					[∇ = (CO ₂ ⁻)
	1389		1392	1393	1390	
	1414		1410	1420	1414	
	1428				1431	
				1438		

Tabela 6, cont.

Número de onda (cm ⁻¹)						Atribuição
a	a*	b	b*	c	c*	
1452	1450	1448	1451	1448	1452	δ (CH ₂)
					1466	
					1490	
	1535				1540	
	1555	1557	1554	1552		Trp [vibrações planares de anéis aromáticos]
1612		1607				
1622	1619	1618	1618	1618	1615	Amida I
			1640			
1657	1650	1655	1653	1653	1650	
				1668		
1678	1683				1676	
	1735					
2880	2881	2878	2881	2883	2883	ν (C-H) [
2934	2935	2932	2928	2934	2938	
2980	2988	2980		2978	2972	
3068	3066	3065	3065	3068	3066	

a: em H₂Oa*: em ²H₂Ob: em SDS a 1% em H₂O (r.m. de mistura SDS/prot = 2,5/1)b*: em SDS a 1% em ²H₂Oc: em solução de CaCl₂ 0,1M em H₂Oc*: em solução de CaCl₂ 0,1M em ²H₂O

Tabela 7

Atribuição de frequências Raman de amostras de ppPLA₂ e CdtPLA₂.

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição
a	a*	b	b*	
508	510	507	507	ν (S-S)
548			620	Phe (deformação do anel)
647		642	640	[ν (C-S) (Cys)
670			660	
693				ν (C-S) (Met e Cys)
734				
762	752	760	755	Trp (anel indólico)
837	828	828	825	[Dubleto de Tyr
854	852	852	848	
880		880		Trp
897				[α-hélice [ν (C-C)]
932	935		940	
948	950			
964				
982				Phe
1006	1006	1004	1000	Phe (respiração do anel)
1036	1036	1030	1028	Folhas β, Phe
1078				
1104				
1130		1130		
1177	1170	1174	1178	Phe
1208	1204	1205	1202	Phe
1240				[Amida III
1256	1260	1255	1262	
1277		1275		[Tautômeros de His
	1298			
1336	1322	1339	1330	[Trp
	1345		1348	
			1383	[ν _a (CO ₂ ⁻)
1413	1412			
1448	1453	1448	1448	δ (CH ₂)
	1520			

Tabela 7, cont.

o

Número de onda (cm ⁻¹)				Atribuição	
a	a*	b	b*		
1548	1548	1548	1550 1605	Trp	[vibrações planares de anéis aromáticos
1615		1615			
1652	1648	1653	1640	[Amida I	
1679		1671 1687			
	1742				
1766					
		1788			
2880	2879	2873	2878	ν(C-H)	[ν _{as} (CH ₃) ν _{as} (CH ₂) ν _{ss} (CH ₃) ν(C-H) aromáticos
2932	2932	2930	2928		
2973	2978	2973	2969		
3070	3068	3065	3060		

a : em tampão KH_2PO_4 $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 7,5

a* : em tampão KH_2PO_4 $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 7,3

b : em H_2O

b* : em $^2\text{H}_2\text{O}$

Concentração das proteínas: ppPLA₂ 20% (p/v) ou $1,4 \times 10^{-2}\text{M}$;
 CdtPLA₂ 40% (p/v) ou $2,9 \times 10^{-2}\text{M}$

Figura 11 - Espectros de transmitância no infravermelho de películas evaporadas de: a) ppProPLA₂; b) ppPLA₂; c) CdtPLA₂.

Figura 12 - Espectros no infravermelho de película evaporada de CdTePLA_2 : a) espectro de absorção; b) espectro de derivada segunda.

Figura 13 - Espectros no infravermelho de película evaporada de CdTePLA₂: a) espectro de absorção; b) espectro deconvoluido.

Figura 14 - Espectros no infravermelho de película evaporada de ppProPLA₂: a) espectro de absorção; b) espectro de derivada segunda.

Figura 15 - Espectros no infravermelho de película evaporada de ppProPLA₂: a) espectro de absorção; b) espectro deconvoluido.

As Tabelas de 3 a 8 referem-se às atribuições das frequências Raman e infravermelho mais características para as várias amostras de fosfolipases.

Os valores de intensidades relativas medidas a frequências características nos modos amida I' e amida III e empregados nos cálculos dos conteúdos de conformação secundária encontram-se na Tabela 9.

As frações de segmentos em cada conformação (f_{α} , f_{β} e f_R) calculadas a partir do sistema de equações simultâneas de LIPPERT et alii (1976) encontram-se expressas na Tabela 10, em termos de porcentagem de conformação secundária ($f_{\text{conf}} \times 100$).

A Tabela 11 contém os valores calculados das intensidades relativas do duplete de Tyr para os diversos sistemas, em condições deuteradas e não deuteradas.

5.3. Estudo espectroscópico Raman de lípides e moléculas correlatas

Com a finalidade de empreender um estudo conformacional sobre a interação entre moléculas de fosfolipase A_2 com seu substrato ou moléculas estruturalmente assemelhadas, foi efetuada inicialmente a caracterização espectroscópica pela técnica Raman das moléculas de fosfatidilcolina e de dodecilsulfato de sódio. Para a atribuição de algumas frequências vibracionais observadas nesses sistemas foram consultados os textos de NAKAMOTO (1986) e de DOLLISH et alii (1974).

Nas figuras de 16 e 17 são apresentados os espectros obtidos para essas moléculas no estado sólido (liofilizado) e em solução nas condições indicadas, cobrindo faixa de

Tabela 8

Atribuição das frequências vibracionais no infravermelho de películas sólidas de ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂.

Sistemas	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
ppPLA ₂	1518	[Amida II
	1540	
	1660	Amida I
	3316	✓ (N-H)
ppProPLA ₂	1515	[Amida II
	1551	
	1656	[Amida I
	1685	
	3316	✓ (N-H)
CdtPLA ₂	1515	[Amida II
	1546	
	1656	[Amida I
	1685	
	3316	✓ (N-H)

Tabela 9

Intensidades relativas de bandas espectrais Raman a 1240 cm^{-1} , 1632 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} para amostras de ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂, sob condições diversas de meio.

Sistemas	$I_{1240\text{ cm}^{-1}}$	$I_{1632\text{ cm}^{-1}}$	$I_{1660\text{ cm}^{-1}}$
ppPLA ₂ , sólido original	0,65		
ppPLA ₂ , sólido deuterado		0,59	1,00
ppProPLA ₂ , sólido original	0,75		
ppProPLA ₂ , sólido deuterado		0,45	0,98
CdtPLA ₂ , sólido original	0,57		
CdtPLA ₂ , sólido deuterado		0,45	0,97
ppProPLA ₂ em tampão A	1,10		
ppProPLA ₂ em tampão A'		0,87	1,05
ppProPLA ₂ em tampão B	0,83		
ppProPLA ₂ em tampão B'		0,61	0,98
ppProPLA ₂ em tampão C	0,92		
ppProPLA ₂ em tampão C'		0,65	0,98
ppProPLA ₂ em tampão D	0,88		
ppProPLA ₂ em tampão D'		0,71	1,06
ppProPLA ₂ em H ₂ O	0,81		
ppProPLA ₂ em ² H ₂ O		0,71	1,04
ppProPLA ₂ em SDS 1% em H ₂ O	0,71		
ppProPLA ₂ em SDS 1% em ² H ₂ O		0,69	0,87
ppProPLA ₂ em solução E	0,85		
ppProPLA ₂ em solução E'		0,75	0,97
ppPLA ₂ em tampão C	0,88		
ppPLA ₂ em tampão C'		1,09	1,19
CdtPLA ₂ em H ₂ O	0,60		
CdtPLA ₂ em ² H ₂ O		0,92	0,72

Tampão A : CH₃COONa $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 4,4.

Tampão A' : CH₃COONa $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, p²H 4,4.

Tampão B : KCl/HCl $5,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 2,6.

Tampão B' : KCl/HCl $5,0 \times 10^{-2}\text{M}$, p²H 2,3.

Tampão C : KH₂PO₄ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 7,5.

Tampão C' : KH₂PO₄ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, p²H 7,3.

Tampão D : Na₂HPO₄ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, pH 11,8.

Tampão D' : Na₂HPO₄ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$, p²H 11,3.

Solução E: CaCl₂ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$ em H₂O.

Solução E' : CaCl₂ $1,0 \times 10^{-2}\text{M}$ em ²H₂O.

Concentrações das proteínas em solução:

ppPLA₂ e ppProPLA₂: 20% (p/v) ou $1,4 \times 10^{-2}\text{M}$

CdtPLA₂: 40% (p/v) ou $2,9 \times 10^{-2}\text{M}$

Razão molar de mistura SDS/prot = 2,5/1.

Tabela 10

Parâmetros conformacionais para ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂ em diferentes condições experimentais, calculados a partir de espectros Raman pelo método de Lippert et alii (1976).

Sistemas	f _α x100	f _β x100	f _R x100	C	*
ppPLA ₂ , sólido	35,5	13,1	51,4	0,71	
CdtPLA ₂ , sólido	32,8	1,8	65,4	0,73	
ppProPLA ₂ , sólido	22,1	17,3	60,5	0,76	
ppProPLA ₂ em tampão A	24,5	61,6	13,9	0,75	
ppProPLA ₂ em tampão B	25,7	32,0	42,3	0,77	
ppProPLA ₂ em tampão C	22,0	42,8	35,2	0,79	
ppProPLA ₂ em tampão D	29,4	32,4	38,2	0,70	
ppProPLA ₂ em SDS a 1% **	37,0	36,4	26,5	0,84	
ppProPLA ₂ em CaCl ₂ 0,1M	32,3	41,4	26,3	0,77	
ppProPLA ₂ em H ₂ O/ ² H ₂ O	33,2	28,2	38,6	0,70	
ppPLA ₂ em tampão C	47,8	34,6	17,6	0,59	
CdtPLA ₂ em H ₂ O/ ² H ₂ O	54,1	34,5	11,4	0,81	

* : vide texto para definição dos parâmetros conformacionais

Tampão A: CH₃COONa 1,0 x 10⁻²M, pH e p²H 4,4.

Tampão B: KCl/HCl 5,0 x 10⁻²M, pH 2,6, p²H 2,3.

Tampão C: KH₂PO₄ 1,0 x 10⁻²M, pH 7,5, p²H 7,3.

Tampão D: Na₂HPO₄ 1,0 x 10⁻²M, pH 11,8, p²H 11,3.

Concentração das proteínas em solução:

ppPLA₂ e ppProPLA₂: 20% (p/v) ou 1,4 x 10⁻² M.

CdtPLA₂: 40% (p/v) ou 2,9 x 10⁻²M.

** : Razão molar de mistura SDS/prot = 2,5/1.

Tabela 11

Intensidades relativas dos dubletos de tirosina (I_{252}/I_{230}) para ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂, sob condições diversas de meio.

Sistemas	Intensidades relativas (I_{252}/I_{230})	
	a	b
ppPLA ₂ , sólido	1,49	1,12
ppProPLA ₂ , sólido	1,35	1,29
CdtPLA ₂ , sólido	1,14	1,13
ppProPLA ₂ em tampão A	1,40	1,20
ppProPLA ₂ em tampão B	1,33	0,95
ppProPLA ₂ em tampão C	1,40	1,03
ppProPLA ₂ em tampão D	1,33	0,89
ppProPLA ₂ em H ₂ O/ ² H ₂ O	1,26	1,00
ppProPLA ₂ em SDS a 1% *	1,21	1,00
ppProPLA ₂ em CaCl ₂ 0,1M	1,51	1,00
ppPLA ₂ em tampão C	1,32	0,91
CdtPLA ₂ em H ₂ O/ ² H ₂ O	1,15	0,82

a: amostras originais não tratadas

b: amostras deuteradas (vide texto)

Tampão A: CH₃COONa 1,0 x 10⁻²M, pH e p²H 4,4.

Tampão B: KCl/HCl 0,05M, pH 2,6 e p²H 2,3.

Tampão C: KH₂PO₄ 1,0 x 10⁻²M, pH 7,5 e p²H 7,3.

Tampão D: Na₂HPO₄ 1,0 x 10⁻²M, pH 11,8 e p²H 11,3.

Concentração das proteínas em solução:

ppPLA₂ e ppProPLA₂: 20% (p/v) ou 1,4 x 10⁻² M

CdtPLA₂: 40% (p/v) ou 2,9 x 10⁻² M

Razão molar de mistura SDS/prot = 2,5/1.

Figura 16 - Espectros Raman de: a) SDS sólido; b) SDS 20% em H_2O ; c) SDS 20% + ppProPLA₂ 5% em H_2O (razão molar SDS/prot = 200/1)

Figura 17 - Espectro Raman de fosfatidilcolina sólida (ganhos empregados nas regiões 400-1800 cm^{-1} e 2800-3100 cm^{-1} não idênticos).

frequência de 400 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} . As regiões de estiramento C-H, entre 2800 e 3100 cm^{-1} , estão também incluídas. Não se conseguiu o registro do espectro Raman da lecitina em forma de vesículas em solução a 1% devido a dificuldades decorrentes do fraco sinal e do espalhamento da amostra nessas condições.

As Tabelas 12 e 13 contem as atribuições das bandas observadas.

5.4. Estudo espectroscópico Raman de sistemas do tipo lípide/proteína

Espectros Raman obtidos para os sistemas ppProPLA₂/lecitina e ppProPLA₂/SDS em solução a diferentes razões molares são apresentados nas figuras 8 (c,d), 18 e 19. As tabelas 14 e 15 contem as atribuições das principais frequências observadas.

Tabela 12

Atribuição das frequências Raman de dodecilsulfato de sódio sólido, em solução e na presença de ppProPLA₂.

Número de onda (cm ⁻¹)			
SDS sólido	SDS 20% em H ₂ O	SDS + ppProPLA ₂ em H ₂ O *	Atribuição
585			[$\delta(\text{O-S-O})$]
621			
840	834	840	[$\nu(\text{C-C})$]
892	889	889	
1064	1064	1063	
1085			
1130	1128	1128	
			[$\nu(\text{S-O})$]
1297	1302	1305	t(CH ₂)(em fase)
1438	1440	1438	[$\delta(\text{CH}_2)$]
1455	1454	1452	
	1470	1466	$\delta(\text{CH}_3)$
	1648	1648	$\delta(\text{H-O-H})$
2845	2852	2850	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2878			$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
	2902	2899	
2933	2930	2928	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2959	2962	2960	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$

* Razão molar de mistura SDS/prot = 200/1

Concentração em SDS: 20% (p/v)

Concentração em ppProPLA₂: 5% (p/v)

Tabela 13

Atribuição das frequências Raman de fosfatidilcolina sólida.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
717	$\nu_{\text{as}}(\text{C-N})$ (colina)
769	$\nu_{\text{as}}(\text{O-P-O})$
849	$\nu_{\text{as}}(\text{O-P-O})$
876	$\nu(\text{C-C})$
933	
959	
971	
1023	
1066	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
1086	
1122	
1270	$\nu(\text{C-C})$ (all-trans)
1300	t, r (CH_2)
1440	t (CH_2) (em fase)
1458	$\delta(\text{CH}_2)$
1658	$\nu(\text{C}=\text{C})$ (em cis)
1738	$\nu(\text{C}=\text{O})$
2852	$\nu(\text{C-H})$ $\left[\begin{array}{l} \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2) \\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3) \\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_2) \\ \nu_{\text{as}}(\text{CH}_3) \end{array} \right]$
2888	
2924	
2960	
3012	$\nu(\text{C-H})$ de grupos
3038	
	C = CHR

Figura 18 - Espectros Raman de misturas de ppProPLA₂ 20% com SDS 20% (razão molar SDS/prot = 52/1) em: a) $2\text{H}_2\text{O}$; b) H_2O . A: região de 400 a 1800 cm^{-1} ; B: região de estiramento C-H.

Figura 19 - Espectros Raman de: a) ppProPLA₂ 33% (p/v) adicionada a preparação de vesículas de lecitina de ovo, em KCl 0,16 M. Razão molar de mistura prot/lec=1:0,55; b) ppProPLA₂ 20% em KCl 0,16 M. A: região de 400 a 1800 cm^{-1} ; B: região de estiramento C-H.

Tabela 14

Atribuição de frequências Raman de sistema SDS/ppProPLA₂* em H₂O e em ²H₂O.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição	
H ₂ O	² H ₂ O		
420	422	[Expansão de regiões hidro-carbônicas; deformação de esqueleto ν(S-S) δ(O-S-O) ν(C-S) (Cys)	
510	510		
	590		
	675		
	780		
	808		
830	829	[Dubleto de Tyr	
838			
849	848		
859			
	873		
885	887	Trp (anel indólico) α-hélice [ν(C-C)]	
	935		
970			
1006	1004	[Phe (respiração do anel)	ν(C-C)
1063	1060		
	1088		
	1122		
1130	1131		
	1157		
	1194		
1205	1206	Phe	
1240		[Amida III, tautômeros de	ν(S-O)
1247			
1300	1298	His	
	1320		
	1343	Trp	
1390		[ν _{as} (CO ₂)	
	1414		
	1436		
1444			
1450	1448	δ(CH ₂)	

Tabela 14, cont.

1458		
	1474	δ (CH ₃)
	1586	Phe
1613	1610	Vibrações planares de anéis aromáticos
	1648	
1658		[Amida I
2850	2852	<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> ν (CH₂) ν (CH₃) ν C-H ν (C-H) (aromáticos) </div>
	2884	
2897	2900	
	2923	
2932	2930	
3066	3065	

Concentração de ppProPLA₂ e de SDS: 20% (p/v).

*Razão molar de mistura SDS/prot: 52/1

Tabela 15

Atribuição de frequências Raman de amostras de ppProPLA₂ em KCl 0,16 M, na presença e ausência de vesículas de lecitina de ovo.

Número de onda (cm ⁻¹)		Atribuição
Com lecitina ^a	Sem lecitina ^b	
508	509	ν(S-S)
646	644	ν(C-S) (Cys)
	724	ν(C-S) (Met e Cys)
	740	
759	754	Trp (anel indólico)
835	837	[Dubleto de Tyr
854	852	
887		
902	900	[α-hélice [ν(C-C)]
935	935	
	962	Phe
1003	1005	Phe (respiração do anel)
	1043	Folhas β, Phe
1207	1206	Phe
1237	1243	[Amida III, tautô- de His
1275		
	1288	
1315		
1342	1335	Trp (anel indólico)
1453	1448	δ(CH ₂)
1553	1543	Trp [Vibrações planares de anéis aromáticos
1616	1614	
1653	1652	Amida I
2879	2880	ν(C-H) [ν _{as} (CH ₃) ν _{as} (CH ₂) ν(C-H) aro- máticos
2932	2934	
3065	3068	

Concentração de ppProPLA₂:

em a: 33% (p/v) ou 2.4 x 10⁻²M

em b: 20% (p/v) ou 1.4 x 10⁻²M

Concentração de lecitina: 1,33 x 10⁻²M

Razão molar prot/lecitina = 1:0,55.

6. Discussão

6.1. Frequências de modos vibracionais conformacionalmente sensíveis observados em espectros de polipeptídeos e proteínas — subsídios para discussão

Esqueleto polipeptídico: À parte os esforços teóricos de cálculo de modos normais de vibração para a ligação peptídica nas diversas conformações secundárias que o esqueleto polipeptídico pode assumir (os quais tentamos expor no item 2 desta tese), defronta-se o leitor interessado com uma vasta literatura referente ao registro e interpretação de espectros vibracionais de polipeptídeos e proteínas cujo interesse se prende ao conhecimento de aspectos de conformação e sua possível interrelação com características de funcionalidade dessas estruturas.

Assim, embora expectativas teóricas sejam disponíveis para compostos-modelo, como vimos, verifica-se a ocorrência de procedimentos empíricos de sistematização de regiões de frequência correlacionadas a estruturas secundárias determinadas. Em razão do fato de que tais sistematizações resultam do levantamento de dados espectrais da literatura relativos a um conjunto de proteínas escolhidas pelo autor, resulta que discrepâncias não raramente são observadas. As atribuições baseiam-se no conhecimento paralelo de dados estruturais das proteínas em estudo, obtidas em geral via dados cristalográficos de raios X. As discrepâncias mencionadas baseiam-se também nos efeitos que as cadeias laterais são capazes de produzir nas frequências características de cada conformação. Em nosso trabalho, o processo de atribuição de frequências dos modos vibracionais amida, o qual é apresentado no item de resultados desta tese nas Tabelas 1 a 8 e 12 a 15, obedeceu a considerações relativas a tratamentos semi-empíricos de

dados espectrais apresentados por vários autores, os quais passamos a relatar a seguir:

De acordo com TU et alii (1982), as seguintes faixas de frequência são propostas para as bandas Raman amida I e amida III referentes às diversas conformações polipeptídicas:

Conformações	amida I (cm^{-1})	amida III (cm^{-1})
α -hélice	1645-1658	1260-1305
folhas β	1665-1680	1230-1242
dobras β	1662-1672	1255-1300
conformação aperiódica	1660-1665	1242-1252

Como se vê, grandes sobreposições de frequência são observadas, o que torna a análise espectral qualitativa baseada unicamente na posição das bandas amida um procedimento questionável em vários casos. Em particular, no caso de proteínas contendo resíduo de His, o modo amida III pode encontrar-se comprometido em razão de se encontrarem na mesma região as frequências de vibração dos tautômeros desse resíduo de aminoácido, como se verá adiante. Além disso, as conformações consideradas são limitadas aos tipos mais prevalentes, sem especificações de detalhes estruturais mais sutis, como se viu no item 2 desta tese.

BYLER e SUSI (1988), baseando-se na análise das bandas amida I de espectros Raman de dez proteínas globulares liofilizadas não deuteradas, propuseram as seguintes atribuições das bandas Raman observadas no modo amida I e suas respectivas faixas máximas de frequência para cada conformação:

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1632 $\pm$ 1	folhas β
1645 $\pm$ 3	H ₂ O ligada
1656 $\pm$ 3	α -hélice
1661 $\pm$ 2	dobras e conf. aperiódica
1672 $\pm$ 4	folhas β
1683 $\pm$ 3	dobras
1689 $\pm$ 2	dobras
1694 $\pm$ 3	dobras

Os mesmos autores, utilizando-se de dados espectrais de infravermelho para o modo vibracional amida I, apresentaram a seguinte relação de faixas máximas de frequências observadas e suas respectivas atribuições:

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1623 $\pm$ 3	folhas β
1630 $\pm$ 4	folhas β
1637 $\pm$ 3	folhas β
1645 $\pm$ 4	conformação aperiódica
1653 $\pm$ 4	α -hélice
1663 $\pm$ 4	dobras
1670 $\pm$ 2	dobras
1675 $\pm$ 5	folhas β
1683 $\pm$ 2	dobras
1689 $\pm$ 2	dobras
1694 $\pm$ 2	dobras

O modo amida II, inativo no Raman em condições de não ressonância, pode ser observado no infravermelho, onde é ativo. KRIMM e BANDEKAR (1980) fornecem as seguintes atribuições para esse modo:

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1520 - 1543	α -hélice
1523 - 1555	Folhas β antiparalelas
1536 - 1562	Dobras β

No entanto, a sensibilidade do modo vibracional amida II quanto à conformação do esqueleto polipeptídico não está ainda bem estabelecida e as atribuições apresentadas são controvertidas. Referências recentes indicam que a banda a cerca de 1515 cm^{-1} , por exemplo, muito próxima do limite inferior desse modo, pode estar associada a resíduos de Tyr (SUSI e BYLER, 1986).

Como aspecto que vale frisar, tem-se que as atribuições Raman e infravermelho baseadas na ocorrência de frequências de modos vibracionais amida para conjuntos de proteínas com estrutura cristalográfica conhecida podem gerar discrepâncias devido à diversidade das amostras tomadas, muito à semelhança do que tem sido observado (BAILEY et alii, 1979) no caso de métodos empíricos de previsão de estrutura de proteínas a partir de sua estrutura primária (CHOU e FASMAN, 1978).

Cadeias laterais: Dentro da espectroscopia vibracional, a técnica Raman normal e ressonante tem se mostrado de utilidade não só no estudo da conformação secundária do esqueleto polipeptídico, como também na investigação dos microambientes de cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos em proteínas, e de aspectos geométricos de certas ligações de interesse. As tabelas de atribuição de frequências de modos de vibração de cadeias laterais, constantes desta tese, basearam-se nas considerações a seguir relatadas. Dentre os resíduos de maior interesse para esse tipo de estudo encontram-se:

Tirosina: o duplete Raman a cerca de 850 e 830 cm^{-1} resulta de uma ressonância de Fermi entre a vibração de respiração simétrica do anel e uma harmônica da vibração de deformação fora do plano do anel benzênico para-substituído.

YU et alii (1973) observaram que as intensidades relativas dessas linhas dependiam do ambiente ocupado pela cadeia lateral da tirosina e poderiam dessa maneira ser afetadas por suas interações.

SIAMWIZA et alii (1975) mostraram que a relação de intensidades do duplete encontra-se na verdade relacionada ao estado do grupo hidroxila fenólico e não ao ambiente do anel benzênico ou à conformação do esqueleto polipeptídico.

O oxigênio fenólico nos resíduos de tirosina pode atuar em situações opostas (PARKER, 1983): como átomo receptor numa ligação forte de hidrogênio na qual o doador de próton é um hidrogênio muito ácido, ou como doador de próton numa ligação forte de hidrogênio em que o átomo receptor seja por exemplo um íon carboxilato negativo. No primeiro caso, tem-se valores para a relação I_{850}/I_{830} da ordem de 10:4 (2,5) e no segundo caso da ordem de 3:10 (0,3).

Quando localizados na superfície de uma proteína em solução aquosa, os grupos OH fenólicos existirão simultaneamente como receptores e doadores de prótons em ligações de hidrogênio que são classificadas de fracas a moderadas; nesses casos a relação de intensidades referida se situa em torno de 10:8 (1,25), embora os valores possam variar entre 9:10 (0,9) (L-tirosina a pH 0,3 em H_2O) e 10:7 (1,42) (glicil-L-tirosina a pH 2,5 em H_2O).

Utilizando-se dessas características peculiares da relação de intensidades do duplete da Tyr em função da

localização externa ou interna desse resíduo na molécula proteica, CRAIG e GABER (1977) propuseram um sistema simples de equações para determinação quantitativa do número de resíduos de Tyr enterrados ou expostos na molécula. Essas equações foram subsequentemente corrigidas por TU (1982) e são as seguintes:

$$N_{\text{enterrado}} + N_{\text{exposto}} = 1$$

$$0,5 N_{\text{enterrado}} + 1,25 N_{\text{exposto}} = I_{850}/I_{830}$$

Na tabela 11, apresentadas no item de resultados, esses valores foram calculados para as várias proteínas em estudo.

Esquemáticamente é possível representar-se as ligações de hidrogênio envolvidas quando se tem uma Tyr exposta ao solvente hidrofílico ou quando enterrada em ambiente hidrofóbico (TU, 1982):

CASWELL e SPIRO (1986) relatam resultados de estudos de alta sensibilidade dos microambientes de resíduos aromáticos tais como Tyr e Trp, empregando-se modificação química seletiva desses resíduos e detecção pelo método Raman ressonante no ultravioleta.

Triptofano: dentre as diversas bandas Raman atribuídas ao anel indólico do resíduo de Trp (544, 577, 761, 879, 1014, 1338, 1363, 1553 e 1582 cm^{-1}), aquela a 1360 cm^{-1} ou próxima desse valor pode ser correlacionada com as condições de meio experimentadas pelo anel indólico da cadeia lateral. Uma banda Raman fina a 1360 cm^{-1} é tomada como indicação de um Trp enterrado. Na verdade, é a intensidade do vale entre as bandas a 1340 e 1360 cm^{-1} do Trp que mais frequentemente se utiliza como sonda do microambiente desse resíduo, devido à baixa intensidade da banda a 1360 cm^{-1} .

A literatura registra ainda (KITAGAWA et alii, 1979) a medida da intensidade relativa da banda a 880 cm^{-1} na monitoração das mudanças nas características hidrofóbicas/hidrofílicas do microambiente do Trp. Essa banda apresentaria a vantagem de ser mais sensível a tais mudanças do que aquela a 1360 cm^{-1} .

Histidina: o grupo imidazólico da cadeia lateral da histidina, o qual desempenha papel determinante na função de diversas proteínas, pode apresentar-se sob duas formas tautoméricas:

O tautômero I representa a forma τ -N-protonada e o tautômero II a forma π -N-protonada. Essas duas formas apresentam vibrações de respiração a 1282 cm^{-1} e 1260 cm^{-1} , respectivamente. A coincidência dessas frequências com o modo vibracional amida III em proteínas dificulta ou mesmo

impede sua análise, sendo nesse caso indicado o processo de N-deuteração da molécula proteica com a finalidade de se deslocar esse modo amida para regiões mais baixas de frequência. Em nosso trabalho, a intensidade residual no modo amida III após deuteração, que pode ser observada em praticamente todos os espectros Raman apresentados (figuras 5 a 9), foi interpretada como relativa a modos do anel imidazólico da histidina ou a vibrações do modo amida III de regiões não deuteradas remanescentes na molécula. Espectro Raman obtido a pH neutro indica que o grupo imidazólico encontra-se em equilíbrio entre as duas formas tautoméricas mencionadas (ASHIKAWA e ITOH, 1979).

Fenilalanina: das diversas bandas vibracionais Raman características da cadeia lateral desse resíduo, destaca-se aquela da respiração do anel benzênico a 1005 cm^{-1} , observável sempre que a concentração de fenilalanina excede a concentração de 1% (TU, 1982). É uma banda relativamente fina e bastante evidente nos espectros de proteínas contendo Phe, já que ocorre numa região sem sobreposições importantes com outras bandas vibracionais. Não apresenta, no entanto, correlação com o ambiente em que se encontra a cadeia lateral do resíduo de Phe, podendo em função disso ser tomada como banda de referência em certos casos. Em nossos espectros mostrou-se consistentemente como uma das bandas mais bem formadas e de fácil identificação.

Outra banda Raman característica de Phe é aquela a 624 cm^{-1} . YU e EAST (1975) utilizaram a intensidade dessa banda em um procedimento para o cálculo da relação entre fenilalanina e tirosina em proteínas, empregando a equação:

$$\frac{I_{624}}{I_{644}} \times 1,25 = \frac{\text{Phe}}{\text{Tyr}}$$

A validade deste método no entanto não é universal, segundo verificações de LIDDLE e TU (1981) e seu uso é portanto limitado. Em nossos espectros, as linhas a 624 cm^{-1} para as diversas proteínas ensaiadas mostraram uma baixa relação sinal/ruído, dificultando em geral sua identificação. As demais linhas da Phe encontram-se a 1033, 1183, 1207, 1585, 1605 cm^{-1} , sendo que as 4 últimas encontram-se sobrepostas quando na presença de resíduos de Tyr.

Metionina e cisteína - as ligações C-S: NOGAMI et alii (1975) verificaram a ocorrência de correlação entre as frequências de estiramento C-S e a rotação interna em torno da ligação C-S na metionina e no isometilsulfeto.

No resíduo de Met as frequências de estiramento C-S dependem da sua conformação. Duas frequências são observadas. A forma trans apresenta duas bandas a 655 e a 724 cm^{-1} enquanto a forma gauche apresenta uma só banda a 700 cm^{-1} .

Nos resíduos de cisteína e cistina, a vibração de estiramento CS está relacionada à rotação interna ao longo do eixo C-C do segmento X-C-CH₂-S-S. A frequência dessa vibração vai depender do átomo X que estiver na posição trans em relação ao átomo de enxofre adjacente à ligação

C-C. Acompanhe-se melhor a descrição no esquema que se segue:

Atomo X em trans

Frequência em cm^{-1}

C—S

H	entre 630 e 670 cm^{-1}
C	720 cm^{-1}
N	700 cm^{-1}

A análise das geometrias observadas para esses grupos em nosso trabalho será exposta adiante, nos itens referentes a cada proteína .

Grupamentos sulfidríla: dentre as vibrações observadas em espectros Raman de proteínas, somente aquelas referentes à vibração S-H aparecem na região 2500-2600 cm^{-1} . Desse modo, a detecção de grupos S-H livres através de espectroscopia Raman é um procedimento livre de interferência ou ambiguidade. A importância da detecção espectroscópica se revela sobretudo em certos casos em que a análise química convencional encontra obstáculos para sua detecção em razão de mascaramento desses grupos (FOX et alii, 1977 e 1979). Poucas proteínas apresentam bandas Raman referentes a modos de estiramento S-H ; exceções são algumas proteínas da lente do olho (cristalino) (EAST et alii, 1978) e alguns vírus como o bacteriófago MS2 (THOMAS et alii, 1976). Em nossos espectros, não evidenciamos em nenhum caso a presença de bandas características de grupos tióis livres.

Grupamentos dissulfeto: esses grupamentos constituem as chamadas ligações ou pontes dissulfeto, as quais se estabelecem intramolecularmente conferindo grande estabilidade à molécula de proteína.

Essas ligações produzem uma linha Raman relativamente intensa a cerca de $500-550\text{ cm}^{-1}$ correspondente ao estiramento S-S.

Para melhor se compreenderem os aspectos geométricos da conformação desses grupamentos é necessário se considerar que a ponte dissulfeto, embora normalmente expressa como -S-S- é na verdade mais apropriadamente representada pelo segmento $\text{C}(\alpha)\text{-C}(\beta)\text{H}_2\text{-S-S-C}(\beta)\text{H}_2\text{-C}(\alpha)$.

SUGETA et alii (1973) propuseram que a frequência de estiramento S-S depende dos ângulos de torção nesse segmento. Assim, as frequências S-S a 510, 525 e 540 cm^{-1} são esperadas para 3 principais tipos de geometria, a saber: ggg, tgg e tgt, respectivamente. Nelas os 2 sítios em trans em relação aos átomos de S estarão ocupados, respectivamente por 2 átomos de hidrogênio, 1 hidrogênio e 1 carbono, ou 2 átomos de carbono. Para maior clareza, observe-se a figura a seguir:

VAN WART e SCHERAGA (1976) contestaram a teoria de SUGETA et alii (1973), sustentando que haveria na verdade uma correlação linear entre S-S e o ângulo diedro CS-SC na faixa de 0° - 60° . Para a região entre 70° e 90° uma única frequência, a 510 cm^{-1} , seria segundo eles esperada.

KITAGAWA apresentou em 1979 evidências experimentais que favoreciam a teoria de Sugeta, indicando no entanto que algumas concessões quanto à transferibilidade de dados cristalográficos de raios X deveriam ser admitidas.

Em 1986, VAN WART e SCHERAGA e WEISS LOPEZ et alii admitiram as proposições de SUGETA, o que veio reforçar a adequação das correlações propostas. O modelo de SUGETA et alii (1973) foi portanto aquele adotado em nosso trabalho para a atribuição das geometrias dos segmentos CCSSCC a partir das frequências de estiramento S-S, conforme se verá nos sub-itens referentes a cada proteína estudada, inclusos nesta Discussão.

Grupamentos ácidos: os aminoácidos ácido aspártico e ácido glutâmico apresentam cadeias laterais que contem grupos COOH. Apesar desse grupamento apresentar frequência de grupo na região $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, raramente são relatadas bandas nessa faixa em espectros Raman de proteínas. No entanto, em proteínas contendo alto teor desses aminoácidos, algumas vezes pode-se observar um modo vibracional a cerca de 1417 cm^{-1} , que tem sido atribuído ao grupamento ionizado -COO^- .

6.2. Toxina γ de *Titivus serrulatus*

O confronto entre os espectros da toxina na forma liofilizada e em solução tampão acetato a pH 4,5 (figura 3) indica uma aparente mudança na intensidade relativa dos

modos amida conformacionalmente sensíveis assim como de algumas outras bandas da proteína. Duas bandas, sem atribuição, são observadas a 567 e 1800 cm^{-1} no espectro do sólido e ausentes no espectro da solução. Por outro lado, não são 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 conformacionais em cadeias laterais.

Esqueleto polipeptídico: conforme foi mostrado em detalhes em itens anteriores, é fato bem estabelecido que os modos vibracionais amida I, II e III nos espectros vibracionais estão correlacionados com a estrutura secundária polipeptídica da molécula de proteína.

A banda amida I dos espectros da toxina γ sólida e em solução (figura 3) apresenta-se alargada, consistindo de um ombro a 1686 cm^{-1} , um máximo a 1670 cm^{-1} e uma banda de média intensidade a 1648 cm^{-1} no espectro do sólido. O espectro da solução apresenta um ombro a 1680 cm^{-1} , um máximo a 1663 cm^{-1} e uma banda de média intensidade a 1650 cm^{-1} . Tomando-se como referência de intensidade em cada um dos dois espectros a banda de deformação angular dos grupos metileno a 1448 cm^{-1} , observa-se que o modo amida I do espectro do sólido é menos intenso que aquele do espectro da solução. Tal fato se deve à contribuição neste último da banda de deformação angular da água a 1645 cm^{-1} .

A presença das bandas a 1648 e 1650 cm^{-1} na figura 3 é uma indicação clara da ocorrência de conformação α -helicoidal. As bandas a 1670 e 1663 cm^{-1} são indicativas de

folhas β , com possível contribuição de conformação não regular. Os ombros a 1686 e 1680 cm^{-1} são atribuídos a dobras β .

No espectro infravermelho (figura 4), a banda amida I é larga e intensa, com um máximo de intensidade a 1650 cm^{-1} . Essa banda é consistente com a presença de estrutura em α -hélice. Não foram observados no perfil dessa banda aspectos que indicassem a ocorrência de outras conformações, o que pode ser devido à limitação imposta pelo nível de resolução do equipamento empregado.

O modo amida II, usualmente fraco ou ausente no espectro Raman, mostra-se bastante evidente no infravermelho (figura 4), embora com menor intensidade que aquela observada para o modo amida I. Três bandas são observadas a 1515 , 1530 e 1540 cm^{-1} . Embora atribuições conformacionais de bandas do modo amida II no infravermelho sejam encontradas na literatura, parece haver indicações de que esse modo ainda não se encontra suficientemente estudado para permitir tais procedimentos. De acordo com PARKER (1983), no entanto, pode-se com as devidas ressalvas tentativamente atribuir as bandas a 1515 e 1540 cm^{-1} à α -hélice e a banda a 1530 cm^{-1} a folhas β e/ou estrutura não regular.

A banda amida III, ativa no Raman, apresenta-se aí alargada (figura 3), sugerindo a coexistência de diferentes conformações secundárias. Os máximos observados a 1259 cm^{-1} e 1253 cm^{-1} para os espectros do sólido e solução, respectivamente, são atribuídos à presença de estruturas não ordenadas. A banda fraca a 1309 cm^{-1} indica a ocorrência de dobras β . A região em torno de 1240 cm^{-1} (típica de estruturas β) apresenta intensidade espectroscópica apesar de não se detectarem aí bandas evidentes ou bem formadas. Além dos modos vibracionais do esqueleto nessa região, deve-se assinalar que bandas do anel imidazólico do resíduo de

His são esperadas nessa mesma faixa de frequência, o que constitui um fator de interferência. Esse modo é inativo no infravermelho (figura 4), não podendo portanto ser aí analisado.

Os resultados Raman e infravermelho são portanto consistentes com a coexistência de várias estruturas secundárias na conformação da toxina sólida e em solução, nas condições de ensaio. Qualitativamente o comportamento espectral apresentado sugere a predominância de estrutura em folhas β , indicada sobretudo pela forte banda Raman amida I centrada em 1670 cm^{-1} e 1663 cm^{-1} para o sólido e solução, respectivamente. As demais estruturas deverão ser menos predominantes. O máximo da banda Raman amida III a 1250 cm^{-1} indica contudo que o teor de estruturas α -helicoidais não é desprezível na molécula. A ocorrência de estruturas em α -hélice é reforçada pela banda de vibração do esqueleto polipeptídico ($\nu\text{ C-C}$) a cerca de 930 cm^{-1} e que pode ser observada nos espectros Raman da figura 3. Indicações da ocorrência de dobras são mais tênues, sendo somente observáveis em discretos ombros no modo Raman amida I.

O duplete da tirosina: toxina γ de *Tityus serrulatus* possui 5 resíduos de tirosina em sua estrutura. Nos espectros Raman do sólido e da solução dessa proteína (figura 3) o duplete apresenta-se com uma relação de intensidades I_{1553}/I_{1528} igual a 1,15. Empregando-se a equação empírica proposta por CRAIG e GABER (1977) e modificada por TU (1982), calcula-se que 4 desses resíduos encontram-se expostos na superfície da molécula e somente um deles acha-se enterrado, provavelmente em região hidrofóbica da molécula.

Triptofano: a ausência de qualquer banda a 1360 cm^{-1} nos espectros Raman da figura 3 indica que os três resíduos de triptofano da toxina γ estão expostos ao solvente.

Vibrações de estiramento S-S e S-H: os espectros Raman da toxina γ sólida e em solução (figura 3) na região em torno de 500 cm^{-1} apresentaram uma única banda simétrica, com máximo a cerca de 511 cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico S-S, indicando uma geometria semelhante para as 4 pontes dissulfeto da molécula. De acordo com a correlação proposta por SUGETA et alii (1973) e confirmada por VAN WART e SCHERAGA (1986) e WEISS-LOPEZ et alii (1986), a conformação gauche-gauche-gauche (ggg) para os segmentos CCSSCC deve predominar na toxina γ .

Uma busca cuidadosa na região $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ (não apresentada), onde seriam esperados modos de estiramento S-H, revelou a não ocorrência de bandas, indicando a não existência de grupamentos livres sulfidríla na molécula.

Estiramento C-S: bandas referentes ao estiramento C-S nos espectros do sólido e da solução são observadas a 643 cm^{-1} e na região em torno de 720 cm^{-1} , esta última de muito fraca intensidade. As bandas de estiramento C-S na região $600\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ podem se originar tanto de grupos metionina como de cistinas (CAREY, 1982). Desse modo as correlações propostas entre ν C-S e a conformação dos segmentos -C-C-S- são mais simples quando apenas um desses grupos está presente. Tal não é o caso da molécula de toxina γ em que se tem a ocorrência de um resíduo de metionina (na 6ª posição) e de 4 pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína. Consultando-se as relações frequência/conformação estabelecidas a partir dos estudos de NOGAMI et alii (1975) em metionina e isobutilmetilsulfeto (TU, 1982) e expostas no item 6.1. conclui-se que as bandas verificadas em nossos espectros não permitem uma atribuição conformacional inequívoca. As observações parecem indicar mais de uma conformação para os grupamentos -C-C-S- na molécula.

Outras bandas vibracionais: a banda vibracional a 1011 cm^{-1} , relativa à respiração do anel monosubstituído é usualmente forte no espectro Raman de proteínas contendo o resíduo Phe. Como vimos, essa banda é insensível a características do ambiente em que tal resíduo se encontra sendo portanto de pouca utilidade na análise conformacional. Sua importância prende-se à confirmação de sua ocorrência em proteínas não sequenciadas e à sua utilização como banda de referência. Nos espectros da figura 3, a banda da respiração do anel da Phe pode ser observada a 1010 cm^{-1} .

As bandas de His, resíduo de importância crítica no mecanismo de atividade enzimática de muitas proteínas, encontram-se em região coincidente com o modo vibracional amida III. Esse modo é bastante intenso nos espectros da toxina γ (figura 3), apresentando diversas bandas relativas à estrutura secundária do esqueleto polipeptídico. Dessa forma, a eventual análise das bandas da histidina encontra-se prejudicada.

A toxina γ é a primeira proteína tóxica de *Tityus* a ser completamente sequenciada e os trabalhos estruturais disponíveis restringiam-se até aqui a dados de CD e NMR, os quais sugeriam a presença de estrutura secundária em folhas estendidas, sem no entanto fornecer informações quanto a eventual presença de outras estruturas secundárias (POSSANI et alii, 1981b). Medidas de denaturação térmica (a 51°C) e de troca de prótons amídicos disponíveis na literatura indicam que a estrutura globular da toxina γ é marcadamente menos rígida que aquela observada para as toxinas de *Centruroides* (POSSANI et alii, 1981b). Nosso trabalho evidencia a presença de estruturas em folhas β nessa proteína, reforçando resultados de trabalhos de CD e NMR, acima referidos. Essa conformação parece ser a estrutura secundária predominante da molécula, conforme indicado pelo máximo da banda amida I. A presença de outras conformações

secundárias é por outro lado claramente indicada pela ocorrência de ombros a frequências características nos modos amida dos espectros vibracionais ou por outras bandas características de esqueleto, conforme se mostrou. O estudo das cadeias laterais de alguns resíduos de aminoácidos permitiu que se estabelecessem características de seus respectivos microambientes (para Tyr e Trp) e aspectos de geometria de ligação (para os segmentos -C-C-S-S-C-C-).

Embora sob o aspecto qualitativo não se tenham observado discrepâncias entre as estruturas secundárias presentes no sólido e na proteína em solução, deve-se considerar a possibilidade de que mudanças nos teores das mesmas possam ter ocorrido, conforme parecem indicar algumas alterações nas intensidades relativas de bandas conformacionalmente sensíveis do esqueleto.

Os resultados desses estudos realizados com a toxina γ de *Tityus serrulatus* foram publicados (AREAS et alii, 1987).

6.3. Fosfolipases A₂

Esqueleto polipeptídico: as bandas amida I e amida III de CdtPLA₂, ppPLA₂ e sua proenzima em solução aquosa e dos respectivos sólidos obtidos a partir de meio aquoso são bem formadas e centradas em torno de 1650-1660 cm⁻¹ nos espectros Raman. Esta ocorrência é consistente com a predominância de regiões em α -hélice ou em estrutura não regular nas duas proteínas. Uma leve assimetria na região de número de onda mais alto é observada, a qual se atribue a estruturas em folhas β e/ou dobras β .

O modo Raman amida III apresenta um perfil com bandas evidentes porém muito mal resolvidas na região 1240-1260

cm^{-1} , indicando a coexistência de conformações secundárias múltiplas.

Amostras deuteradas em solução exibem espectros com um decréscimo significativo na intensidade relativa do modo amida I devido à ausência do modo de deformação angular da água a 1640 cm^{-1} . Por outro lado, um aumento na região amida III pode ser observado como consequência da sobreposição da banda de deformação angular da $^2\text{H}_2\text{O}$ a cerca de 1205 cm^{-1} . A deuteração também produziu um deslocamento no modo amida III em direção à região em torno de 950 cm^{-1} . Esse deslocamento está de acordo com o esperado, considerando-se a contribuição da deformação angular no plano do grupo $\text{N}-^2\text{H}$. A intensidade remanescente na região amida III dos espectros das amostras deuteradas indica que essa não é uma região pura para as amostras ensaiadas, combinando na verdade vibrações de outras origens, tais como aquelas originárias de cadeias laterais de tautômeros de His.

Nos espectros de absorção no infravermelho (figuras 11 a 15) é possível observar-se que uma banda amida I forte, centrada em $1655\text{--}1660 \text{ cm}^{-1}$ é uma característica comum para as proteínas estudadas. Esse máximo de frequência é indicativo da presença de estruturas α -helicoidais ou não regulares nas moléculas de proteína. Uma assimetria de forma de banda é no entanto aparente nos espectros para esse modo vibracional; na região de alta frequência, a resolução a cerca de 1685 cm^{-1} de uma banda originalmente sobreposta no modo amida I pode ser observada nos espectros de derivada segunda e com deconvolução (figuras 12 a 15). Tal característica espectral é tomada como indicação da presença de estruturas em folhas β e dobras β . Banda menos intensa a 1630 cm^{-1} confirma a ocorrência de conformação em folhas β na proenzima pancreática.

O modo vibracional amida II, o qual é inativo no Raman, pode ser observado nos espectros infravermelho onde é ativo. Frequências a 1515 e 1546 cm^{-1} , 1515 e 1551 cm^{-1} , 1513 e 1540 cm^{-1} foram observadas para CdtPla₂, ppProPla₂ e ppPla₂, respectivamente. De acordo com estudos recentes, a banda próxima a 1515 cm^{-1} provavelmente está associada com resíduos de Tyr (SUSI e BYLER, 1986). Apesar de atribuições apresentadas por KRIMM e BANDEKAR (1980), as quais foram tomadas como base para as atribuições desse modo apresentadas na Tabela 8, a correlação entre os máximos observados para esse modo e a conformação do esqueleto polipeptídico não está ainda perfeitamente estabelecida.

Só a informação contida no modo amida I dos espectros de absorção no infravermelho já é, no entanto, suficiente para que se confirme a evidência qualitativa Raman segundo a qual diferentes estruturas secundárias coexistem nas moléculas de PLA₂, o que é consistente com dados de raios X e de CD para ppPLA₂ e CdtPLA₂, respectivamente (DIJKSTRA et alii, 1983 e HANLEY, 1979).

A ocorrência de múltiplas estruturas secundárias na mesma molécula é geralmente o caso da maioria das proteínas naturais. As contribuições relativas das conformações secundárias únicas para a estrutura geral da molécula podem ser monitoradas pelas intensidades relativas Raman a frequências características, tomando-se usualmente como banda de referência para proteínas o modo conformacionalmente insensível de deformação angular dos grupos metileno a 1448 cm^{-1} . No entanto, o alargamento das bandas frequentemente leva à superposição das mesmas, tornando a monitoração das mudanças conformacionais somente através de medidas diretas de variação nas intensidades relativas a frequências características, um procedimento sensível a erro. Em razão disso, métodos semi-quantitativos de estimativa de conteúdos de estrutura secundária que levam

em conta esses efeitos tem sido empregados nos estudos estruturais de proteínas a partir de espectros vibracionais.

Mudanças nas intensidades relativas Raman de modos conformacionalmente sensíveis foram observados para os diferentes sistemas ensaiados e foram quantitativamente analisados através do método de LIPPERT et alii (1976). Pares de amostras deuteradas e não deuteradas em condições experimentais semelhantes foram analisadas quanto a seu conteúdo de estrutura secundária. A análise empregou intensidades relativas a frequências características nos modos amida I' e amida III (Tabela 9) e os resultados indicaram os valores das frações de segmentos em cada conformação (f_α , f_β , f_R) para cada sistema ensaiado. Esses valores foram expressos em termos de porcentagem de conformação secundária ($f_{\text{cont}} \times 100$) presente na molécula de proteína (Tabela 10).

O tratamento dos dados espectrais revelou que a estrutura secundária predominante no estado sólido para as fosfolipases estudadas é a espiral aleatória, a qual mais apropriadamente chamamos de conformação aperiódica ou não regular. Na verdade, esse conteúdo muito provavelmente inclui a fração em dobras β , não revelada independentemente por esse método. Em seu trabalho sobre conformação de miotoxina a empregando o mesmo algoritmo, BAILEY et alii (1979) indicam que de fato a fração de dobras β parece estar incorporada ao termo f_R do sistema de equações de LIPPERT et alii (1976). Considerando-se isso, observa-se que níveis mais altos de regiões estruturadas não regularmente (dobras β incluídas) são encontrados em ppPLA₂ liofilizada quando comparado à enzima cristalina. Uma ótima concordância no entanto é observada entre os teores de folhas β determinados neste trabalho para a forma liofilizada de ppPLA₂ através da análise dos espectros Raman pelo método de LIPPERT et alii (1976) e aqueles obtidos por DIJKSTRA et

alii (1983) para a enzima cristalizada, através de dados de raios X. Esses resultados indicam que a liofilização parece induzir alterações conformacionais na molécula de fosfolipase A_2 mas essas mudanças se restringem às regiões helicoidais e não regulares, não afetando contudo as frações em folhas β . Mais rigorosamente, poder-se-ia questionar a mudança no teor em α -hélice entre as duas formas sólidas (liofilizada e cristalina), considerando-se os seguintes dados: no trabalho cristalográfico de DIJKSTRA et alii (1983) as informações estruturais permitem que se calcule teor helicoidal que perfaz um total de 45%, dos quais 37% são representados por α -hélice e 8% por hélice 3_{10} . Nossa análise espectral Raman indicou um percentual de 35,5% para estrutura em α -hélice. Não há especificações para outros tipos de hélice no método empregado. Levando-se em conta a proximidade das frequências vibracionais para as várias estruturas helicoidais (KRIMM e BANDEKAR, 1986), estamos considerando que o fator f_2 do sistema de equações de LIPPERT possivelmente responda pela totalidade dessas estruturas, já que este seria o parâmetro mais provável a incluir o teor de hélices de tipos não α . Nesse caso, a diferença no teor de α -hélices entre a forma sólida liofilizada e o cristal seria significativa.

Alterações conformacionais associadas ao processo de liofilização foram já observadas em α -lactalbumina através de espectrometria Raman (YU, 1974).

Nossos resultados contradizem uma interpretação de JIRGENSON e DE HAAS (1977) baseada em dados de dicroísmo circular, de acordo com a qual a molécula de ppPLA $_2$ não apresenta hélices bem desenvolvidas em solução. Os autores atribuíram o comportamento quiroptico observado por CD à existência de estruturas rígidas e assimétricas na molécula que simulariam um comportamento helicoidal. Tal interpretação parece ter sido inspirada em resultados de

difração de raios-X de 1976 de DRENTH et alii que descartavam a presença de hélices no cristal de ppPLA₂. O trabalho cristalográfico foi revisto posteriormente e a versão publicada em 1983 indicava o erro das conclusões anteriores e admitia a ocorrência de α -hélices em quantidades significantes na proteína cristalina. Nosso trabalho mostra, através da técnica vibracional, a qual independe da existência de centros opticamente ativos na molécula, a clara existência de considerável fração de α -hélices, tanto no sólido liofilizado como em solução, indicada pelo modo amida I consistentemente centrado em cerca de 1655 cm⁻¹, bem como pelos parâmetros pertinentes calculados (Figuras 5a,b e 9a,b e Tabela 10).

Níveis distintos de conteúdos de estruturas secundárias foram calculados para as formas tóxica (Cdt) e atóxica (pp) das fosfolipases A₂ estudadas neste trabalho (Tabela 10). Um conteúdo menor de estruturas em folhas β (≈2%) foi calculado para CdtPLA₂ sólida contra 13% para a enzima pancreática sólida. Regiões α -helicoidais corresponderam aproximadamente à mesma percentagem em ambas as enzimas (32,8 e 35,5%, respectivamente), porém o conteúdo de regiões não regularmente ordenadas mostrou-se aproximadamente 1,3 vezes maior na enzima crotálica em relação à de porco.

Pode também ser observado na Tabela 10 que ppProPLA₂ apresentou menos regiões regularmente estruturadas quando comparada à forma ativa da enzima em condições de ensaio semelhantes (no estado sólido como pó liofilizado e em solução aquosa em tampão fosfato 0,01M pH 7,5). As discrepâncias conformacionais foram expressas por um maior teor de regiões em α -hélice e um conteúdo levemente menor de folhas β na enzima ativa (Tabela 10) comparado à proenzima. O balanço final indica que a transição conformacional associada à transformação de ppProPLA₂ a ppPLA₂ leva a um decréscimo no conteúdo de regiões não regulares as quais se

reestruturariam, sozinhas ou em associação com outras partes da molécula, em novas regiões α -helicoidais na enzima ativa.

Uma proeminente transição espiral aleatória $\rightarrow$ folhas β foi observada na dissolução de ppPLA₂, ppProPLA₂ e CdtPLA₂ em solução aquosa, indicando que este possa ser um fenômeno geral para esta classe de enzimas. Os espectros correspondentes são mostrados nas figuras 5 a 9 e os parâmetros conformacionais na Tabela 10. Um aumento da ordem de 2,6 vezes no conteúdo de folhas β , em sua maior parte devido a rearranjos nas regiões não regulares, conforme se discutirá adiante, foi observado para ppPLA₂ após dissolução da proteína sólida em meio de tampão fosfato em pH neutro (Figuras 5a,b e 9a,b, Tabela 10). A mudança de estado físico também levou a um aumento menos intenso porém ainda significativo, no conteúdo de α -hélice (1,3 vezes). A monitoração da constante C indicou que a dissolução foi capaz de induzir uma mudança conformacional terciária na molécula de PLA₂, com uma diminuição dos grupos CH expostos à superfície. A correlação entre os valores de C e características hidrofóbicas/hidrofílicas dos grupamentos CH foi indicada por LIPPERT et alii em seu trabalho (1976), no qual é descrita a variação direta daquele parâmetro com a diminuição do teor de solvente hidrofílico. O aumento observado nos conteúdos de folhas β e α -hélice de ppPLA₂ foi acompanhado por uma diminuição de cerca de 2/3 no conteúdo de regiões não regulares da molécula, o que leva a se supor que essas regiões muito provavelmente se reestruturaram sob a influência do meio aquoso. ppProPLA₂ apresentou o mesmo comportamento após dissolução, ou seja, um aumento no conteúdo de folhas β (de 2 a 3,5 vezes) e manutenção ou ligeiro aumento na fração de α -hélice; ambos os efeitos mostraram-se dependentes das condições de meio (pH, composição iônica. Veja Tabela 10). CdtPLA₂ apresentou uma marcante aquisição de estruturas em folhas β após dissolução, indo de menos de 2% no estado sólido a 34,5%

(cerca de 20 vezes) em solução aquosa não tamponada. Essa mudança conformacional foi acompanhada por um aumento de 1,6 vezes no conteúdo de α -hélice, o qual passou então a responder por mais da metade das estruturas secundárias do esqueleto polipeptídico da toxina (Tabela 10).

Um aumento no conteúdo de folhas β induzido por dissolução foi detectado na molécula de β -lactoglobulina por FRUSHOUR e KOENIG (1975) através da intensificação da banda Raman a 1240 cm^{-1} , característica de estruturas em folhas β . A análise semi-quantitativa dos espectros Raman de α -bungarotoxina (THOMAS et alii, 1986) indicou um aumento da ordem de 5 vezes no conteúdo de estrutura secundária em folhas β para a proteína em solução comparado ao teor apresentado para a forma cristalina. Foi sugerido que a transição espiral aleatória $\rightarrow$ folhas β observada após dissolução de proteínas em solventes aquosos possa constituir um aspecto geral para proteínas globulares contendo um grande percentual de estrutura desordenada no estado sólido (FRUSHOUR e KOENIG, 1975). Essa generalização assim poderia se aplicar ao caso das fosfolipases estudadas neste trabalho, nas quais esse percentual apresentou-se na faixa de 50 a 65%. O mecanismo pelo qual tal transição ocorre permanece ainda no campo das especulações. De acordo com CREIGHTON (1983), movimentos da cadeia polipeptídica devem estar associados a rotação, estiramento ou deformação de ligações covalentes. Mudanças envolvendo ligações únicas da molécula dariam origem a movimentos extremamente grandes na molécula como um todo e portanto muito improváveis num meio viscoso. Deve-se então supor que os movimentos de diversas ligações estejam de alguma forma coordenados, de modo a produzir movimentos mais plausíveis. Medidas de tempos de relaxamento obtidos através de NMR de ^{13}C tem permitido uma melhor compreensão da possibilidade de movimentação dos vários segmentos de uma proteína em relação à sua posição dentro da molécula. A sistemática ocorrência

de valores mais baixos para os tempos de relaxamento de ^{13}C em regiões terminais de cadeias laterais em relação a regiões mais próximas ao esqueleto polipeptídico (GLUSHKO et alii, 1972) reforça a idéia quanto à necessidade de algum tipo de coordenação de movimentos. Medidas de constantes de difusão entre terminações da cadeia polipeptídica evidenciam a resistência que a cadeia proteica oferece ao movimento de suas pontas. Os resultados desses estudos, obtidos a partir de experimentos de dinâmica de transferência de energia fluorescente (CREIGHTON, 1983) indicam que, apesar de sua aparente estabilidade, diferentes grupos numa cadeia polipeptídica de conformação não regular chocam-se cerca de 10^3 a 10^4 vezes por segundo, o que pode representar uma via para eventuais rearranjos. A transição que gera estruturas em folhas β parece não ser bem compreendida, devido sobretudo à ausência de um bom sistema -modelo com o qual estudar o processo. A literatura refere a formação de grandes estruturas insolúveis compostas de diversas cadeias polipeptídicas, como comportamento mais característico para a formação de folhas β em polipeptídeos sintéticos (CREIGHTON, 1983). Em altas diluições, essas estruturas se formam intramolecularmente porém a velocidades muito baixas, da ordem de segundo-minuto. A não ocorrência de eventos de nucleação no processo foi indicada por AUER e PATTON (1976) para o sistema poli(L-Tyr). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse tipo de mudança conformacional são controvertidos e parecem depender fortemente dos sistemas considerados (HARTMAN et alii, 1974).

Em nosso trabalho, utilizamos concentrações de proteína da ordem de 10^{-2} M ($\approx 20\%$ p/v), em razão do limite de sensibilidade da técnica Raman. Apesar de tais concentrações, que poderiam ser consideradas altas do ponto de vista bioquímico, observou-se a transição espiral aleatória $\rightarrow$ folhas β como transição predominante resultante

da dissolução. O fenômeno, no entanto, não resultou aparentemente em diminuição da solubilidade da amostra.

Levando-se em conta o fato de que em nossos sistemas a transição conformacional se deu por passagem para a fase aquosa, é de se considerar o papel que as moléculas de H_2O possam assumir na estabilização da estrutura estendida em folhas β para os casos estudados. Um outro ponto a se considerar é aquele referente a fatores cinéticos e termodinâmicos envolvidos na definição da estrutura final adotada pela molécula proteica sob condições estabelecidas. Sabe-se que as proteínas são capazes de organizar sua conformação tridimensional em escalas de tempo da ordem de 10^{-4} a 10^{-3} s. Um cálculo do tempo necessário para que uma cadeia polipeptídica com 100 resíduos por exemplo possa experimentar todas as possíveis conformações até eventualmente atingir a de menor energia livre levaria a um valor médio de 10^{25} s, ou 10^{17} anos, segundo CREIGHTON (1983). Portanto, a conformação observada certamente não é aquela de energia livre mais baixa, mas simplesmente aquela mais estável dentre as conformações cineticamente acessíveis.

É possível encontrar-se na literatura um suporte teórico mais bem estabelecido para a transição espiral aleatória $\rightarrow \alpha$ -hélice, a qual foi também detectada em nossos sistemas, embora em menor grau. O mecanismo de "nucleação-zipping", proposto por ZIMM e BRAGG (1959) e por LIFSON e ROIG (1961) tem sido usado na descrição desse tipo de transição, embora tal enfoque leve em conta transições em solução, não necessariamente associadas a mudanças de fase ou a processos de dissolução. Nesse modelo, a etapa energeticamente mais desfavorável e mais lenta é a iniciação da hélice a partir de uma região de espiral aleatória. O subsequente aumento da hélice a partir deste núcleo é rápido e relativamente favorecido. A iniciação da hélice pode se

dar em qualquer parte na espiral aleatória, mas o seu crescimento ou desdobramento somente ocorre nas extremidades das hélices e nunca em seu interior. Embora aparentemente ser estruturas rígidas, as α -hélices são em geral sistemas dinâmicos em solução, estruturando-se e desfazendo-se numa velocidade de 10^5 - 10^7 vezes por segundo. A dificuldade de iniciação de uma hélice pode ser entendida considerando-se dois fatores: a) a baixa concentração efetiva dos resíduos envolvidos nas pontes de hidrogênio (resíduos em posições relativas 1 e 4) quando ainda não se tem nenhum primórdio de hélice, em contraposição ao observado quando um dos resíduos já está fixo, ou seja, quando já existe um núcleo helicoidal; b) interações desfavoráveis entre dipolos com mesma orientação (representados pelas ligações peptídicas) observadas quando da formação do núcleo da hélice. No subsequente crescimento da hélice, interações entre cauda e cabeça dos dipolos compensam esses efeitos desfavoráveis de alinhamento.

Não é possível se saber a partir dos espectros vibracionais se o aumento no teor de estruturas secundárias se deu como uma expansão de regiões já estruturadas na molécula ou se através de novos núcleos de estruturação. Em qualquer dos dois casos, no entanto, é certo que regiões de estrutura aperiódica ou não regular contribuíram para a evolução do novo padrão conformacional secundário, uma vez que o teor representado por essas regiões é drasticamente reduzido por dissolução.

Para a CdtPLA₂, alguns resultados de dicroísmo circular (CD) são disponíveis e indicam os seguintes percentuais de estruturas secundárias para CdtPLA₂ em solução: 18% α -hélice, 37% folhas β e 45% espiral aleatória. O teor de estrutura em folhas β é comparável ao obtido em nosso trabalho (Tabela 10), porém as estimativas de HANLEY (1979) para as regiões em α -hélice indicam valores mais

baixos que os nossos. A propósito desse fato, é interessante notar que BAILEY et alii (1979) numa análise conformacional de miotoxina A_2 sugere que a estimativa de conteúdo estrutural secundário por CD pode levar a baixos valores para o teor em α -hélice. HANLEY (1979) assinala que o conteúdo conformacional de CdtPLA₂ calculado por CD está em evidente contradição com o calculado por dados cristalográficos de raios X para PLA₂ pancreática bovina, uma enzima homóloga em que 50% é representado por α -hélice, 10% por folhas β e 40% por espiral aleatória. O autor especulou que tal discrepância poderia ser atribuída a possíveis relações estruturais entre uma forma tóxica e outra atóxica de duas enzimas homólogas. Na verdade, não se pode deixar de considerar a possibilidade de que o baixo teor de folhas β na enzima bovina cristalina esteja apenas refletindo uma tendência geral da molécula de PLA₂ no estado sólido. A aparente contradição seria então simples consequência da transição conformacional da fosfolipase associada à mudança de estado físico.

Para ppPLA₂, em valores de pH correspondentes a condições de denaturação (pH 11,5 e 2,5) foi observado que o conteúdo de estrutura secundária mostrou-se de nível comparável àquele observado em solução aquosa ou em solução neutra em tampão fosfato (Tabela 10). Embora uma leve tendência em relação a um decréscimo no conteúdo de estrutura secundária regular tenha sido observada nesses sistemas, parece evidente que a maior parte da arquitetura estrutural secundária se manteve inalterada sob condições em que a enzima já tem sua atividade comprometida. Este fato é consistente com a alta estabilidade estrutural descrita na literatura para a fosfolipase A_2 em solução, para a qual a presença de numerosas pontes dissulfeto (seis em pp(Pro)PLA₂ e sete em CdtPLA₂) certamente contribue. As pequenas flutuações conformacionais observadas nas condições experimentais mencionadas (extremos de pH) devem ser

atribuídas ou a um certo grau de flexibilidade estrutural da molécula como um todo, que se espera seja exibido por proteínas em solução, ou a pequenas porém críticas mudanças na estrutura do sítio catalítico da enzima, ou mais provavelmente a ambos. A investigação espectroscópica da molécula de CdtPLA₂ através de técnica de CD (HANLEY, 1979) indica a ocorrência de mudanças estruturais reversíveis associadas ao tratamento denaturante ácido da proteína, o qual foi também interpretado como um reflexo de flexibilidade estrutural sob esta condição; o tratamento alcalino produziu, no entanto, alterações conformacionais irreversíveis neste caso.

Apesar da conhecida estabilidade geral da molécula de fosfolipase em solução, foi observado que CaCl₂ e CH₃CH₂COONa em valores de pH neutro e ácido, respectivamente, tem evidentes efeitos estruturantes sobre ppProPLA₂, expressos como um grande aumento nos percentuais de conformação em folhas β e um decréscimo nos percentuais de conformação aleatória comparado ao que foi observado para a proteína em solução na ausência de sal. Um leve decréscimo no conteúdo de α -hélice foi também observado (Tabela 10). O papel dos íons cálcio como um requisito para a plena atividade da fosfolipase pode estar ligado a esse efeito, já que mudanças conformacionais podem ser esperadas da complexação cálcio-enzima. Os resultados deste trabalho indicam que essas mudanças envolvem o nível secundário de organização do esqueleto polipeptídico e são expressas sobretudo por um aumento significativo no conteúdo de folhas β . A espectroscopia Raman evidenciou, recentemente, uma mudança estrutural secundária induzida por cálcio na molécula de α -lactalbumina, expressa por um aumento da fração α -helicoidal e diminuição no conteúdo de folhas β (HEREMANS e HEREMANS, 1988). No que se refere à molécula de fosfolipase, a indução de alterações conformacionais pelo cálcio é descrita para um caso bem ilustrativo: na molécula

dimérica de PLA_2 de veneno de *Crotalus atrox*, o íon cálcio induz uma modificação estrutural na proteína desbloqueando o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima (KEITH et alii, 1981 e BRUNIE et alii, 1985).

O papel dos íons acetato sobre os parâmetros conformacionais da enzima não apresenta correlações tão óbvias e não é desse modo facilmente compreendido. Não propomos aqui, portanto, hipóteses relativas ao comportamento observado.

Pontes dissulfeto e modos de estiramento S-H: Os máximos de frequência do modo de estiramento S-S, consistentemente centrados em torno de 510 cm^{-1} , bem como a aparência simétrica das bandas nos espectros Raman das enzimas crotálica e pancreática sob diferentes condições experimentais permitiram concluir-se que as sete pontes dissulfeto em Cdt PLA_2 e as seis em pp PLA_2 e ppPro PLA_2 devem apresentar uma mesma geometria. Conforme correlações bem estabelecidas (SUGETA et alii, 1973) e já mencionadas anteriormente neste trabalho (item 2), a conformação predominante para os segmentos CCSSCC é a gauche-gauche-gauche.

A região de 2500 a 2700 cm^{-1} nos espectros Raman, onde modos de estiramento SH seriam esperados, não evidenciou a presença de bandas, o que foi tomado como indicação de que todos os resíduos Cys estão envolvidos em pontes dissulfeto, não restando grupamentos sulfidríla livres.

Dubleto da tirosina: a intensidade relativa do dubleto I_{1533}/I_{1528} nos espectros Raman de Cdt PLA_2 no estado sólido e em solução mostra um valor consistente de aproximadamente 1,17. Aplicando-se as equações empíricas propostas por CRAIG e GABER (1977) e corrigidas por TU para a quantificação dos resíduos de Tyr enterrados e expostos, calculou-se que 10

dentre os 11 resíduos desse aminoácido encontram-se expostos na superfície molecular.

Para pp(Pro)PLA₂ foi observada uma ligeira variação da intensidade do duplete em torno do valor 1,25 para espectros obtidos em diferentes condições experimentais. Empregando-se o mesmo procedimento acima foi possível calcular-se que todos os oito resíduos de Tyr encontram-se expostos na superfície molecular.

Os valores mais baixos observados para o duplete da tirosina em amostras deuteradas (Tabela 11) é uma consequência da diferença nas constantes de ionização para H₂O e ²H₂O. Assim, ²H₂O é um doador de próton mais fraco para ligação com o oxigênio fenólico da Tyr do que a H₂O, o que leva a valores mais baixos para a relação de intensidades I₈₅₀/I₈₃₀ em amostras deuteradas. Apesar disso, as razões observadas em nossos espectros ainda se encontram na faixa de 0,9-1,4, referente à ocorrência externa de cadeias de Tyr.

Triptofano: em nossos espectros, nenhuma linha a 1360 cm⁻¹ foi observada para quaisquer das fosfolipases ensaiadas. A banda a 880 cm⁻¹ apresentou-se de modo geral mal resolvida e sua ocorrência se deu mais como um ombro da banda de estiramento C-C, a cerca de 900 cm⁻¹, do que como banda isolada. As intensidades relativas I₈₈₀/I₁₄₄₈ mostraram variações desprezíveis com as condições experimentais usadas. Essas características espectrais observadas levaram à conclusão de que os três resíduos de Trp em CdtPLA₂ e o resíduo único desse aminoácido na molécula de ppProPLA₂ e ppPLA₂ estão expostos à superfície molecular e não são influenciados por mudanças de estado físico, pH, presença de Ca²⁺ ou ion acetato, dentro dos limites das condições experimentais empregadas.

Estiramento C-S: as bandas eventualmente atribuíveis a essas vibrações (região 600-750 cm^{-1}) apresentam-se com baixa intensidade e sua resolução é ainda dificultada por relação sinal/ruído desfavorável. Como foi visto, tanto grupos metionina como cistinas podem gerar esses modos vibracionais de tal modo que proteínas contendo ambos os tipos de resíduos, como é o caso das fosfolipases aqui estudadas, são mais dificilmente analisadas quanto à conformação de seus grupos -C-C-S-. Concluimos portanto que uma atribuição inequívoca desses modos encontra-se prejudicada, de modo semelhante ao observado para a toxina γ . As observações parecem também aqui apontar para a coexistência de conformações distintas para os segmentos -C-C-S- das moléculas.

Os resultados dos estudos efetuados com as fosfolipases A_2 aqui relatados foram recentemente publicados (AREAS et alii, 1988 a,b, 1989).

6.3.1. Interações enzima/substrato e seus análogos: modelos para a interação lipíde/proteína

Espectros Raman de fosfatidilcolina e de dodecilsulfato de sódio: Embora em nosso trabalho tenha-se focalizado primordialmente o efeito do lipíde sobre a proteína e não o inverso, julgamos oportuno introduzir aqui algum comentário sobre os espectros Raman de lípides obtidos (figuras 16 e 17).

Os espectros vibracionais dessas moléculas ou de moléculas assemelhadas, tais como surfactantes, apresentam duas principais regiões as quais refletem características de conformação de suas cadeias hidrocarbônicas (LIS et alii, 1976a,b e MENDELSON e MAISANO, 1978):

a) a região em torno de 1100 cm^{-1} contém transições representativas de modos de estiramento C-C da cadeia hidrocarbônica e, no caso de fosfolípides, também do modo de estiramento simétrico PO_2 . As bandas a 1100 cm^{-1} incorporam o estiramento C-C para conformações *all-trans*, como no caso de sistemas gel-cristalinos e modos C-C de regiões contendo ligações *gauche-gauche*. A relação *trans/gauche* em que as ligações C-C podem ocorrer pode ser inferida da variação de algumas intensidades relativas a frequências características nessa região.

b) a região em torno de 2900 cm^{-1} contém vibrações de estiramento metila e metileno. A relação I_{2880}/I_{2850} é sensível à ocorrência de rotâmeros *gauche* no fosfolípide. Por ser sensível ao empacotamento lateral das moléculas de lípide, é usada como medida da fluidez das cadeias hidrocarbônicas nesses sistemas.

Uma terceira região de interesse é indicada por SPIKER e LEVIN (1975) a $700\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, correspondendo a vibrações de estiramento de ligações C-N e grupos PO_2 das regiões polares de fosfolípides.

O sistema SDS/ppProPLA_2 : este sistema, empregado como um modelo inicial para o estudo preliminar de alguns aspectos da interação lípide-proteína, mostrou-se muito adequado para estudos Raman devido sobretudo à sua homogeneidade óptica. A escolha de SDS, um surfactante carregado negativamente, leva em conta a dependência da força da interação fosfolipase-lípide no que se refere à existência de cargas negativas no componente lipídico (VOLWERK et alii, 1986).

Para o sistema SDS/ppProPLA_2 na relação molar de mistura 2,5/1 (figura 8 c,d), os resultados da análise espectral Raman (Tabela 10) revelam que cerca de 30% das

regiões de conformação secundária aperiódica se reorganizam por interação com a molécula de surfactante, levando a um aumento nos conteúdos de α -hélice e folhas β na proteína. A razão molar de mistura empregada corresponde a um estado monomérico para os complexos estudados, para os quais se demonstrou a ocorrência de estruturas oligoméricas em razões molares SDS/ppProPLA₂ mais altas (HILLE et alii, 1983). Esta razão corresponde também aproximadamente ao número de sítios de alta afinidade para um derivado do ácido palmítico marcado com nitróxido (ácido 5-doxilpalmítico) na molécula de CdtPLA₂, para a qual outros sítios de menor afinidade são observados a razões molares lípide/proteína mais altas (RADVANYI et alii, 1995).

O aumento observado no valor da constante C para o sistema SDS/ppProPLA₂ (relação molar = 2.5) em relação ao calculado para a proteína na ausência de lípide (Tabela 10) foi interpretado com base em algumas considerações do método original de LIPPERT et alii (1976). Segundo elas, a intensidade da banda a 1448 cm⁻¹, atribuída a uma combinação de deformações de grupos C-H e C-H₂, seria diretamente proporcional ao número desses grupos presentes na proteína somente no caso de suas vibrações de deformação terem a mesma amplitude. Este fato explica a falta de correlação observada entre esse parâmetro e o número de grupos CH₂ e CH presentes na proteína. Foi no entanto observada, para uma dada proteína, uma tendência de aumento no valor desse parâmetro com quantidades decrescentes de solvente hidrofílico. Inferimos dessa observação que altos valores de C (considerados em relação a um valor de referência) corresponderiam a uma situação representada por grupos hidrofóbicos CH₂ menos densamente agrupados na molécula proteica, em outras palavras, mais expostos à superfície, já que a interferência do meio hidrofílico nesse caso é mais fraca. Valores baixos de C refletiriam a situação oposta, aquela na qual uma banda CH₂ menos intensa estaria associada a interações hidrofóbicas aumentadas, com conseqüente maior

proximidade entre grupos CH_2 em regiões internas da molécula proteica, induzidas pelo meio hidrofílico prevalente. O observado aumento no valor de C para o sistema SDS/ppProFLA₂ (r.m.=2,5/1) em relação àquele calculado para a proteína pura indica portanto que a presença do SDS é capaz de induzir uma abertura da molécula de proteína de modo a expor grupos CH_2 mais internos tornando-os disponíveis para interação com grupamentos similares da molécula do surfactante. Esses resultados são compatíveis com o observado por ^{13}C NMR para a interação albumina/SDS, em que a interação proteína/surfactante resulta na exposição de novos sítios hidrofóbicos para interação (INOUE et alii, 1979).

Nossos resultados indicam que não houve mudanças significativas no que se refere à geometria das pontes dissulfeto e microambientes dos resíduos Tyr e Trp para o sistema SDS/ppProFLA₂ (relação molar = 2,5) em relação à proteína isolada. Alterações na conformação dos segmentos CSSC de soroalbumina bovina foram observadas por interação dessa proteína com surfactantes (SDS e brometo de tetradeciltrimetilamonio), resultando em aumento da população das conformações ggt para os grupamentos mencionados. Mudanças nos microambientes de resíduos de Tyr foram também observados (AOKI et alii, 1982).

Um sistema SDS/ppProFLA₂ com razão molar 52:1 foi também ensaiado (figura 18). As concentrações utilizadas foram de 20% (p/v) tanto para o surfactante como para a proteína. Embora tenha sido obtido o espectro Raman do sistema também em meio de $^2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 18), a análise quantitativa do conteúdo conformacional para esses sistemas ficou prejudicada em razão do fato de a banda a 1448 cm^{-1} incorporar vibrações referentes a grupos CH_2 do SDS, juntamente com aquelas oriundas da proteína. No entanto, através de uma apreciação qualitativa do espectro, foi

possível observar-se que a intensidade relativa da banda a 1250 cm^{-1} no modo amida III foi algo afetada pela presença do surfactante. Os valores registrados para as intensidades dessas bandas relativas à intensidade da banda de respiração do anel da Phe foram: na ausência do surfactante, $I_{1250}/I_{1005} = 0,63$ e na presença dele, $I_{1250}/I_{1005} = 0,80$.

Embora esse aumento seja talvez significativo, não se observa a mesma variação, por exemplo, na banda a 1655 cm^{-1} no espectro do sistema deuterado, nem tampouco na banda a 935 cm^{-1} , referente a estiramento C-C de regiões helicoidais, as quais mantem suas intensidades relativas inalteradas. Não foram tampouco observadas alterações de frequência ou intensidade para bandas relativas a cadeias laterais de Tyr, Trp ou pontes S-S.

O sistema fosfatidilcolina/ppProPLA₂: a banda de estiramento C-C a 935 cm^{-1} , típica de α -hélices, apresentou mudança em sua intensidade relativa quando na presença do fosfolípide (figura 19). Tomando-se como referências de intensidade as bandas de respiração do anel da Phe a 1005 cm^{-1} e a banda de deformação angular dos grupos metilênicos a 1448 cm^{-1} , tem-se os seguintes valores: $I_{935}/I_{1005} = 0,39$ e $I_{935}/I_{1448} = 0,40$, para a proenzima na ausência do fosfolípide e $I_{935}/I_{1005} = 0,85$ e $I_{935}/I_{1448} = 0,91$, na presença do fosfolípide. A intensidade da banda a ca. 1650 cm^{-1} , também característica de α -hélice, não foi utilizada neste caso porque encontra-se sobreposta ao modo de deformação angular da H₂O; a banda típica de α -hélice no modo amida III encontra-se também mal resolvida nos espectros.

A indução de estruturas helicoidais em proteínas ou polipeptídeos pela presença de lípidos é indicada na literatura em alguns exemplos recentes. CARRIER e PEZOLET (1986) evidenciaram por espectroscopia Raman a formação de

hélice em poli(L-lisina) por complexação com DPPG (dipalmitoil fosfatidil glicerol). MANTULIN et alii (1986), utilizando dicroísmo circular, relatam aumento de estrutura em α -hélice em apolipoproteína AI (o componente majoritário que compõe a lipoproteína de alta densidade do plasma humano) induzido por sua associação com DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), com a qual ela se associa espontaneamente.

Apesar de se mostrar útil no estudo da interação lípide-proteína (CARMONA et alii, 1987, TARASCHI e MENDELSON, 1980, AOKI et alii, 1982), 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 utilização da técnica vibracional em investigações nesse campo.

As indicações portanto de mudança conformacional secundária da ppProPLA₂ no sentido de aumento do teor de α -hélice por interação com o fosfolípide devem ser tomadas com cautela, levando-se em conta aspectos referentes à baixa resolução de algumas bandas de importância na análise conformacional.

A análise conformacional quantitativa para esse sistema não foi efetuada por não ter sido viável a obtenção do espectro em meio deuterado.

Foi ainda observado para este sistema alguma variação na intensidade relativa da banda de estiramento S-S a ca.

510 cm^{-1} . embora não tenham sido registrados deslocamentos de frequência ou mudança na simetria da mesma.

6.3.2. Aspectos estruturais e sua ligação com a neurotoxicidade.

Os resíduos de aminoácidos nas fosfolipases A_2 diretamente envolvidos na ligação com lípidos situam-se em torno da cavidade do sítio ativo, formando uma região com caráter hidrofóbico, o chamado domínio da ligação lipídica (SLOTBOOM et alii, 1985).

TSAI et alii (1987) observaram que fosfolipases A_2 com toxicidade pré-sináptica possuem nas proximidades dessa região um excesso de três ou quatro resíduos de aminoácidos básicos comparado a enzimas não neurotóxicas. Esses resíduos estão agrupados nas circunvizinhanças da porção N-terminal, considerando-se o dobramento tridimensional da molécula; localizam-se perto de pontes dissulfeto, o que indica que sua posição é relativamente fixa. A natureza desse "cluster" básico, catiônico, é intensificada pela proximidade do α -amino grupo da região N-terminal e pelo momento de dipolo de duas regiões de hélices vizinhas. Sua ocorrência se dá nas proximidades de regiões de alta hidrofobicidade, quais sejam aquelas envolvidas na interação lipídica já mencionada.

Confrontando-se as informações do trabalho de TSAI et alii (1987) com os dados de sequência disponíveis para as fosfolipases A_2 aqui estudadas, concluimos que os resíduos de números 60 e 65 são aqueles que contribuem para o excedente de carga positiva na região de domínio da ligação lipídica, na enzima crotálica em relação à enzima pancreática. Os resíduos nas posições indicadas são: 60 - Lys e Asp e 65 - Arg e Asn, para as enzimas crotálica e pancreática, respectivamente. Trabalhos

estruturais comparativos tem indicado a correlação entre o excesso de cargas positivas nessa região da proteína com a neurotoxicidade (TSAI et alii, 1987).

A associação dos sítios tóxicos catiônicos de enzimas neurotóxicas com regiões de mais alta hidrofobicidade que as regiões correspondentes nas enzimas não neurotóxicas parece ser uma ocorrência diferencial entre esses sistemas. A determinação de índices hidropáticos permitiu que se conhecessem as regiões com caráter mais acentuadamente hidrofóbico na molécula de CdtPLA₂ (TSAI et alii, 1987). Essas regiões hidrofóbicas permitiriam a interação entre a toxina e os componentes lipídicos da membrana, de modo a facilitar a formação de pontes salinas entre os "clusters" catiônicos do sítio tóxico aí localizado com receptores negativamente carregados na membrana pré-sináptica. A falta desse domínio em várias fosfolipases A₂ atóxicas explicaria a ausência de especificidade de ligação com as membranas neuronais.

7. Conclusões

Os principais pontos que resultam da discussão dos resultados deste trabalho são relatados a seguir:

I) Toxina γ de veneno de *Tityus serrulatus*

a) A análise dos modos vibracionais amida I, II e III dos espectros Raman e infravermelho da toxina sólida e em solução indicou a coexistência dos diversos tipos de conformações secundárias no esqueleto polipeptídico, com predominância da estrutura em folhas β seguida por regiões de conformação não regular e α -hélice e alguma evidência de dobras. Sob o ponto de vista qualitativo, as conformações secundárias para a forma sólida e em solução mostraram-se portanto semelhantes, embora esse fato não afaste a possibilidade de ocorrência de discrepâncias nos teores das diversas conformações que uma análise quantitativa, não efetuada aqui, possa eventualmente vir a indicar.

b) Os segmentos CCSSCC das quatro pontes dissulfeto assumem a conformação gauche-gauche-gauche, conforme indicado pela banda de estiramento S-S, simétrica e centrada em ca. 510 cm^{-1} .

c) A análise do duplete da tirosina (853/828) indica que quatro dentre os cinco resíduos desse aminoácido encontram-se expostos na superfície molecular.

d) Os três resíduos de Trp encontram-se todos na superfície da molécula.

e) As características acima mencionadas, referentes a geometria e a microambientes de cadeias laterais mostraram-se as mesmas para a toxina sólida e em solução.

II) Fosfolipases A₂

a) Os conteúdos conformacionais para a ppPLA₂ sólida liofilizada mostraram-se distintos daqueles obtidos por difração de raios X para a proteína cristalizada no que se refere aos conteúdos de α -hélice e regiões aperiódicas.

b) No estado sólido amorfo, conteúdos de estrutura secundária calculados para a fosfolipase tóxica (Cdt) e atóxica (pp) mostraram-se discrepantes, com um teor mais baixo de estruturas em folhas β sendo observado na enzima crotálica.

c) Uma proeminente mudança conformacional associada à dissolução da proteína em meio aquoso foi observada para amostras de ppProPLA₂, ppPLA₂ e CdtPLA₂ e mostrou envolver sobretudo transições do tipo espiral aleatória $\rightarrow$ folhas β .

d) Foi observado que a transformação ppProPLA₂ $\rightarrow$ ppPLA₂ é acompanhada por mudança conformacional expressa por um teor mais elevado de estruturas em α -hélice na enzima ativa.

e) Ions cálcio e acetato em pH ácido apresentaram evidentes efeitos estruturantes sobre ppProPLA₂ em solução.

f) Apesar das flutuações conformacionais não desprezíveis em valores de pH alcalino e ácido, constatou-se que a maior parte de arquitetura molecular da proenzima é preservada sob estas condições.

g) Estudo da interação ppProPLA₂/SDS em um sistema com razão molar proteína/surfactante = 1:2,5 indicou um rearranjo de regiões não regulares da proteína em padrões de estrutura α -helicoidal e de folhas β ; essas mudanças foram acompanhadas por transições conformacionais terciárias nas

quais interações hidrofóbicas entre grupos CH_2 da proteína e do surfactante desempenham papel relevante.

h) Indicações preliminares de mudança conformacional na molécula de fosfatidilcolina induzidas por sua interação com ppProPLA₂ foram registradas.

i) O número de resíduos de Tyr enterrados e expostos foi calculado para cada molécula e os resultados indicaram que sua localização é predominantemente externa e para a ppProPLA₂ não depende de condições de pH (na faixa de 2,5 a 12) ou composição iônica do meio.

j) Os resíduos de Trp apresentaram localização invariavelmente externa, independente das condições experimentais empregadas.

k) Conformação do tipo gauche-gauche-gauche foi consistentemente observada para os segmentos CCSSCC das pontes dissulfeto, a qual se manteve inalterada sob as diversas condições experimentais utilizadas.

l) Não foi observada correlação entre microambientes ou geometria de cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos assinalados e estado físico das amostras.

o 2. Referências bibliográficas

ACHARI, A., RADVANYI, F.R., SCOTT, D., BON, C. e SIGLER, P.B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9385.

AIRD, S.D., KAISER, I.I., LEWIS, R.V. e KRUGGEL, W.G. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 249, 296.

ALBRECHT, A.C. (1961) J. Chem. Phys. 34, 1476.

AOKI, K., OKABAYASHI, H., MAEZAWA, S., MIZUNO, T., MURATA, M. e HIRAMATSU, K. (1982) Biochim. Biophys. Acta 703, 11.

ARANTES, E.C., PRADO, W.A., LAURE, C.J., LUCAS, S.M. e GIGLIO, J.R. (1984) Arg. Biol. Tecnol. 27, 258.

AREAS, E.P.G., ARAUJO, P.S., GABILAN, N., LAURE, C.J. e KAWANO, Y. (1988 a) Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas Vol. I, 137.

AREAS, E.P.G., GABILAN, N., LAURE, C.J. e KAWANO, Y. (1988 b) in XI International Conference on Raman Spectroscopy (Clark, R.J.H. e Long, D.A., eds.) p. 769, John Wiley & Sons, New York.

AREAS, E.P.G., GIGLIO, J.R., ARANTES, E.C. e KAWANO, Y. (1987) Biochim. Biophys. Acta 915, 292.

AREAS, E.P.G., LAURE, C.J., GABILAN, N., ARAUJO, P.S. e KAWANO, Y. (1989) Biochim. Biophys. Acta 997, 15.

ARNOTT, S. e DOVER, S.D. (1967) J. Mol. Biol. 30, 209.

ARNOTT, S. e WONACOTT, A.J. (1966) J. Mol. Biol. 21, 371.

- ASHIKAWA, I. e ITOH, K. (1979) Biopolymers 18, 1859.
- ASTBURY, W.T., e WOODS, H.J. (1933) Phil. Trans. Royal Soc. London, Ser. A 232, 333.
- AUBERT, J.-P., BISERTE, G. e LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.-H. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 175, 410.
- AUER, H.E. e PATTON, E. (1976) Biophys. Chem. 4, 15.
- BAILEY, G.S., LEE, J. e TU, A.T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8922.
- BAKER, E.N. e HUBBARD, R.E. (1984) Progr. Biophys. Mol. Biol. 49, 97.
- BANDEKAR, J. e KRIMM, S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 774.
- BARHANIN, J., GIGLIO, J.R., LEOPOLD, P., SCHMID, A., SAMPAIO, S.V. e LAZDUNSKI, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12553.
- BARRET, T.W. e PETICOLAS, W.L. (1979) J. Raman Spectr. 8, 35.
- BARRILI, Y. (1985) Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, USP, São Paulo, 96 p.
- BECHIS, G., SAMPIERI, F., YUAN, P.-M., BRANDO, T., MARTIN, M.-F., DINIZ, C.R. & ROCHAT, H. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 1146.
- BELLY, J.G. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1051.

BERJOT, M., MAX, J. e ALIX, A.J.P. (1987) J. Raman Spectr. 18, 289.

BLOUT, E.R., DE LOAE, C. e ASADOURIAN, A. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 1894.

BON, C., CHANGEUX, J.P., JENG, T.W. & FRAENKEL-CONRAT, H. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 471.

BON, C., CHOUMET, V. FAURE, G. JIANG, M.-S., LEMBEZAT, M.-P., RADVANYI, F. e SALIOU, B. (1988) Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas Vol. II, 9.

BOSCH, R., JUNG, G. e WINTER, W. (1983) Acta Crystallogr. Sec. C 39, 776.

BRAGG, L., KENDREW, J.C. e PERUTZ, M.F. (1950) Proc. Royal Soc. London Ser. A 203, 321.

BREITHAUP, H. (1976) Toxicon 14, 221.

BREITHAUP, H., OMORI-SATO, T., LANG, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 403, 355.

BREITHAUP, H., RUBSAMEN, K. e HABERMANN, E. (1974) Eur. J. Biochem. 49, 333.

BROTHERUS, J.B., MOLLER, J.V. e JORGENSEN, P.L. (1981) Biochim. Biophys. Res. Commun. 100, 146.

BRUNIE, S., BOLIN, J., GEWIRTH, D. e SIGLER, P.B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 9742.

BYLER, D.M. e SUSI, H. (1988) J. Ind. Microbiol. 3, 73.

CAREY, P.R. (1982) Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies, Academic Press, New York, 262 p.

CARMONA, P., RAMOS, J.M., de COZAR, M. e MONREAL, J. (1987) J. Raman Spectr. 18, 473.

CARRIER, D. e PEZOLET, M. (1986) Biochemistry 25, 4167.

CASWELL, D.S. e SPIRO, T.G. (1986) Biochim. Biophys. Acta 873, 73.

CATTERALL, W.A. (1984) Science 223, 653.

CATTERALL, W.A. (1988) Science 242, 50.

CHOU, P.Y. e FASMAN, G.D. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 251.

COLTHUP, N.B., DALY, L.H. e WIBERLEY, S.E. (1964) Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 511p., Academic Press, New York.

COREY, R.B. e PAULING, L. (1953) Proc. Royal Soc. London Ser.B 141, 10.

COURAUD, F., JOVER, E. DUBOIS, J.M. e ROCHAT, H. (1982) Toxicon 20, 9.

COUTINHO NETTO, J. (1975) Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

CRAIG, W.S. e GABER, B.P. (1977) J. Am. Chem. Soc. 99, 4130.

CRANE, H.R. (1950) Sci. Mon. 70, 376.

CREIGHTON, T.E. (1983) *Proteins. Structures and Molecular Properties*, 515 p., N.H. Freeman and Company, New York.

CRICK, F.H.C. e RICH, A. (1955) Nature 176, 780.

DAVYDOV, A.S. (1979) Physica Scripta 20, 387.

DE HAAS, G.H., POSTEMA, W., NIEUWENHUIZEN, W. e VAN DEENEN, L.L.M. (1968 a) Biochim. Biophys. Acta 159, 118.

DE HAAS, G.H., POSTEMA, N.M., NIEUWENHUIZEN, W. e VAN DEENEN, L.L.M. (1968 b) Biochim. Biophys. Acta 159, 118.

DE HAAS, G.H., SLOTBOOM, A.J., BONSEN, P.P.M., NIEUWENHUIZEN, W., VAN DEENEN, L.L.M., MAROUX, S. DLOUHA, V. e DESNUELLE, P. (1970 a) Biochim. Biophys. Acta 221, 54.

DE HAAS, G.H., SLOTBOOM, A.J., BONSEN, P.P.M., VAN DEENEN, L.L.M., MAROUX, S., PUIGSERVER, A. e DESNUELLE, P. (1970 b) Biochim. Biophys. Acta 221, 31.

DELORI, P., VAN RIETSCHOTEN, J. e ROCHAT, H. (1981) Toxicon 19, 393.

DIJKSTRA, B.W., DRENT, J. e KALK, K.H. (1981 a) Nature 289, 604.

DIJKSTRA, B.W., DRENT, J. KALK, K.H. e VANDERMAELEN, P.J. (1978) J. Mol. Biol. 124, 53.

DIJKSTRA, B.W., KALK, K.H., HOL, W.G. e DRENT, J. (1981 b) J. Mol. Biol. 147, 97.

DIJKSTRA, B.W., RENETSEDER, R., KALK, K.H., HOL, W.G.J. e DRENT, J. (1983) J. Mol. Biol. 168, 163.

DOLLISH, F.R., FATELEY, W.G. e BENTLEY, F.F. (1974) Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds, 443 p., John Wiley & Sons, New York.

DUCH, D.S. e LEVINSON, S.R. (1987) J. Membrane Biol. 98, 43.

DRENTH, J., ENZING, C.M., KALK, K.H. e VESSIES, J.C.A. (1976) Nature 264, 373.

DUFTON, M.J., DRAKE, A.F. e ROCHAT, H. (1986) Biochim. Biophys. Acta 869, 16.

DWIVEDI, A.M. e KRIMM, S. (1982) Macromolecules 15, 177.

EAST, E.J., CHANG, R.C.C., YU, N.-T. e KUCK, J.F.R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1436.

EDSALL, J.T. (1936) J. Chem. Phys. 4, 1.

FANCONI, B., TOMLINSON, B., NAFIE, L.A., SMALL, W. e PETICOLAS, W.L. (1969) J. Chem. Phys. 51, 3993.

FANCONI, B. e PETICOLAS, W.L. (1971) Biopolymers 10, 2223.

FAURE, G. e BON, C. (1987 a) Toxicon 25, 229.

FAURE, G. e BON, C. (1987 b) Biochemistry 27, 730.

FLIPPEN, J.L. e KARLE, I. (1976) Biopolymers 15, 1081.

Fontecilla-Camps, J.C., Almassy, R.J., Suddath, F.L. e Bugb, C.E. (1982) Toxicon 20, 1.

FONTECILLA-CAMPS, J.C., ALMASSY, R.J., SUDDATH, F.L., WATT, D.D. e BUGG, C.E. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6496.

FOX, J.W. ELZINGA, M. e TU, A.T. (1977) FEBS Lett. 90, 217.

FOX, J.W., LEE, J., AMORESE, D. e TU, A.T. (1979) J. Appl. Biochem. 1, 336.

FOX, R.D., JR. e RICHARDS, F.M. (1982) Nature 300, 325

FRAENKEL-CONRAT, H. (1982) J. Toxic. Toxin Reviews 1, 205.

FRAENKEL-CONRAT, H., JENG, T.W., HENDON, R.A. (1976) Report at 10th Int. Congr. Biochemistry, Hamburg, Germany, July 25-31.

FRAENKEL-CONRAT, H., JENG, T.W. e HSIANG, M. (1980) Natural Toxins. Eaker, D. e Wadstron, T., eds. Pergamon Press.

FRAENKEL-CONRAT, H. e SINGER, B. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 60, 64.

FRUSHOUR, B.G. e KOENIG, J.L. (1975) Biopolymers 14, 649.

GABILAN, N.H. (1983) Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 79 p.

GARFINKEL, D. e EDSALL, J.T. (1958) J. Am. Chem. Soc. 80, 3818.

GEISOW, M. (1978) Nature 274, 642.

GLUSHKO, V.I., LAWSON, P.J. e GURD, F.R.N. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3176.

GOMEZ, M.V. (1967) Tese de Doutorado, Escola Veterinária, UFMG, Belo Horizonte.

GOMEZ, M. V. e DINIZ, C.R. (1966) Mem. Inst. Butantan Simp. Intern. 33, 899.

GREENBLATT, R.E., BLATT, Y. e MONTAL, M. (1985) FEBS Letters 193, 125.

GUY, H.R. e SEETHARAMULU, P. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 508.

HABERMANN, E. (1957) Biochem. Z. 329, 405.

HABERMANN, E. e NEUMANN, W. (1954) Arch. exp. Path. Pharmac. 223, 388.

HANLEY, M.R. (1979) Biochemistry 18, 1681.

HARTMAN, R., SCHWANER, R.C. e HERMANS JR., J. (1974) J. Mol. Biol. 90, 415.

HENDON, R.A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1560

HENDON, R.A. e TU, A.T. (1979) Biochim. Biophys. Acta 578, 243.

HEREMANS, L. e HEREMANS, K. (1988) in XI International Conference on Raman Spectroscopy (Clark, R.J.H. e LONG, D.A., eds.) p. 775, John Wiley & Sons, New York.

HERZBERG, G. (1945) Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, Van Nostrand, New York, 1945.

HIGGS, P. (1953) Proc. Royal Soc. A 220, 472.

HILLE, J.D.R., EGMOND, M.R., DIJKMAN, R., VAN OORT, M.G., JIRGENSONS, B. e DE HAAS, G.H. (1983) Biochemistry 22, 5347.

HORST, J., HENDON, R.A. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1042.

HUGGINS, M.L. (1943) Chem. Rev. 32, 195.

INCARDONA, N.L., PRESCOTT, B., SARGENT, D., LAMBA, D.P. e THOMAS JR., G.J. (1987) Biochemistry 26, 1532.

INOUE, Y., SASE, S., CHUJŌ, R., NAGAOKA, S. e SOGAMI, M. (1979) Biopolymers 18, 373.

JENG, T.W. e FRAENKEL-CONRAT, H. (1978) FEBS Letters 87, 291.

JENG, T.W., HENDON, R.A. e FRAENKEL-CONRAT, H.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 600.

JIRGENSONS, B. e DE HAAS, G.H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 494, 285.

JORGENSEN, P.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta 694, 27.

KARLSSON, E. (1979) Chemistry of protein toxins in snake venoms. In Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 52, 159-212, Born, G.V.R., Farah, A., Herken, H. e Welch, A.D., eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

KAWAI, M., RICH, D.H. e WATSON, J.D. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 398.

KAYANO, T., NODA, M., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H. e NUMA, S. (1988) FEBS Letters 228, 187.

KEITH, C., FELDMAN, D.S., DEGANELLO, S., GLICK, J., WARD, K.B., OLIVER JONES, E. e SIGLER, F.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8602.

KITAGAWA, T. AZUMA, T. e HAMAGUCHI, K. (1979) Biopolymers 18, 451.

KOSOWER, E.M. (1985) FEBS Letters 182, 234.

KOYAMA, Y., CAREY, P.R., LONG, R.A., MARTIN, W.G. e SCHNEIDER, H. (1979) J. Biol. Chem 254, 10276.

KRIMM, S. e BANDEKAR, J. (1980) Biopolymers 19,1.

KRIMM, S. e BANDEKAR, J. (1986) Adv. Prot. Chem. 38, 181.

KRIMM, S. e DWIVEDI, A.M. (1982) Science 216, 407.

LAURE, C.J., COUTINHO NETTO, J. e GONÇALVES, J.M. (1971) Ciência e Cultura 23, 313, supp.

LEWIS, P.M., MOMANY, F.A. e SCHERAGA, H.A. (1973) Biochim. Biophys. Acta 303, 211.

LIDDLE, W.K. e TU, A.T. (1981) Appl. Spectr. 35, 444.

LIFSON, S. e ROIG, A. (1961) J. Chem Phys. 34, 1963.

LIPPERT, J.L., TYMINSKI, D. e DESMEULES, P.J. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98, 7075.

LIS, L.J., GOHEEN, S.C., KAUFFMAN, J.W. e SHRIVER, D.F. (1976a) Biochim. Biophys. Acta 443, 331.

LIS, L.J., KAUFFMAN, J.W. e SHRIVER, D.F. (1976b) Biochim. Biophys. Acta 436, 513.

LORD, R.C. e YU, N.T. (1970) J. Mol. Biol. 50, 509.

LOTZ, B. (1974) J. Mol. Biol. 87, 169.

MANTULIN, W.W., POWNALL, H. e JAMESON, D.M. (1986) Biochemistry 25, 8034.

MENDELSON, R. e KOCH, C.C. (1980) Biochim. Biophys. Acta 598, 260.

MENDELSON, R. e MAISANO, J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 506, 192.

MEVES, H. e NAGY, K. (1989) Biochim. Biophys. Acta 988, 99.

MEYER, K.H. e MARK, H.F. (1928) Ber. dtsch. Chem. Ges. B61, 1932.

MIYAZAWA, T. (1960) J. Chem. Phys. 32, 1647.

MIYAZAWA, T. (1961) J. Polymer Sci. 55, 215.

MIYAZAWA, T. SHIMANOUCHI, T. e MIZUSHIMA, S.-I. (1958) J. Chem. Phys. 29, 611.

MOORE, W.H. e KRIMM, S. (1976) Biopolymers 15, 2439.

NAKAMOTO, K. (1986) Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 4th ed., 484 p., John Wiley & Sons, New York.

NEMETHY, G. e PRINTZ, M.P. (1972) Macromolecules 5, 755.

NEUMANN, W. e HABERMANN, E. (1952) Naturwissenschaften 39, 286.

NIEUWENHUIZEN, W., KUNZE, H. e DE HAAS, G.H. (1974) Meth.Enzymol. 32, 147.

NODA, M., SHIMIZU, S., TANABE, T., TAKAI, T., KAYANO, T., IKEDA, T., TAKAHASHI, H., NAKAYAMA, H., KANAOKA, Y., MINAMINO, N., KANGAWA, K., MATSUO, H., RAFTERY, M.A., HIROSE, T., INAYAMA, S., HAYASHIDA, H., MIYATA, T. e NUMA, S. (1984) Nature 312, 121.

NODA, M., IKEDA, T., KAYANO, T., SUZUKI, H., TAKESHIMA, H., KURASAKI, M., TAKAHASHI, H. e NUMA, S. (1986) Nature 320, 188.

NOGAMI, N., SUGETA, H. e MIYAZAWA, T. (1975) Bull. Chem. Soc. Japan 48, 2417.

PARKER, F.S. (1983) Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry, 550 p., Plenum Press, New York.

PAULING, L. e COREY, R.B. (1951) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 235.

PAULING, L. e COREY, R.B. (1953) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39, 253.

PAULING, L., COREY, R.B. e BRANSON, H.R. (1951) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **37**, 205.

PERKIN ELMER Command Descriptions. FTIR Reference Manual. CDS-3 Applications Software.

PERKINS, W.D. (1986) Topics in Chem. Instr. **63**(1), A 5.

PETCHER, T.J., WEBER, H.-P. e RUEGGER, A. (1976) Helv. Chim. Acta **59**, 1480.

PETICOLAS, W.L. (1979) Meth. Enzymol. **61**, 425.

PEZOLET, M., PIGEON-GOSSELIN, M. e COULOMBE, L. (1976) Biochim. Biophys. Acta **453**, 502.

PEZOLET, M., PIGEON-GOSSELIN, M., NADEU, J. e CAILLE, J.-P. (1980) Biophys. J. **31**, 1.

PLACZEK, G. (1934) Handbuch der Radiologie **VI**, **2**, 209.

POSSANI, L.D., ALAGON, A.C., FLETCHER JR., P.L. e ERICKSON, B.W. (1977) Arch. Biochem. Biophys. **180**, 394.

POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., MOLARES, J.M. e SVENDSEN, I. (1981a) Carlsberg Res. Commun. **46**, 195.

POSSANI, L.D., MARTIN, B.M., SVENDSEN, I., RODE, G.S. e ERICKSON, B.W. (1985) Biochem. J. **229**, 739.

POSSANI, L., STEINMETZ, W.E., DENT, M.A.R., ALAGON, A.C. e WUTHRICH, K. (1981b) Biochim. Biophys. Acta **669**, 183.

PRIMROSE, W.U., FISHER, J. e ROBERTS, G.C.K. (1988) XIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Madison, Wisconsin, USA, P 16-19.

RADVANYI, F.R. e BON, C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12616.

RADVANYI, F., ROUSSELET, A., DEVAUX, P. e BON, C. (1985) J. Biol. Chem. 260, 8765.

RAMACHANDRAN, G.N. e SASISEKHARAN, V. (1968) Adv. Protein Chem. 24, 283.

RAMACHANDRAN, G.N., SASISEKHARAN, V. e RAMAKRISHNAN, C. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 168.

RAMAN, C.V. e KRISHNAN, K.S. (1928) Nature 121, 501.

RENETSEDER, R., BRUNIE, S., DIJKSTRA, B.W., DRENTH, J. e SIGLER, P.B. (1985) J. Biol. Chem. 260, 11627.

RICHARDSON, J.S., RICHARDSON, D.C., THOMAS, K.A., SILVERTON, E.W. e DAVIES, D.R. (1976) J. Mol. Biol. 102, 221.

ROCHAT, H., BERNARD, P. e COURAUD, F. (1979) Adv. Cytopharmacol. 3, 325.

RUBSAMEN, K., BREITHAUPT, H. e HABERMANN, E. (1971) Naun. Schmie. Arch. Pharmacol. 270, 274.

SAMPAIO, S.V. (1980) Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

SAMPAIO, S.V. (1988) Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP sobre Toxinas Proteicas, Vol. I, 102.

SAMPAIO, S.V., LAURE, C.J. e GIGLIO, J.R. (1983) Toxicon 21, 277.

SIAMWIZA, M.N., LORD, R.C., CHEN, M.C., TAKAMATSU, T., HARADA, I., MATSUURA, H. e SHIMANOUCHI, T. (1975) Biochemistry 14, 4870.

SINGLETON, (1965) J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 53.

SLOTBOOM, A.J., VAN SCHARRENBURG, G.J.M., VAN DER WIELE, F., ASTMA, W. e DE HAAS, G.H. (1985) in Peptides-Structure and Function. Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium. C.M. Deber, V.J. Hruby and K.D. Kopple, eds., Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA, p. 347.

SLOTTA, K.H. e FRAENKEL-CONRAT, H.L. (1938) Ber. dtisch. Chem. Ges. 71, 1076.

SMALL, D., CHOU, P.Y. e FASMAN, G.D. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 341.

SMEKAL, A. (1923) Naturwiss 11, 873.

SNYDER, R.G., SCHERER, J.R. e GABER, B.P. (1980) Biochim. Biophys. Acta 601, 47.

SPIKER, R.C., Jr. e LEVIN, I.W. (1975) Biochim. Biophys. Acta 388, 361.

SPIRO, T.G., ed. (1988) Biological Applications of Raman Spectroscopy, Vol 1: Raman Spectra and the conformations of biological macromolecules. 550 p. John Wiley & Sons, New York.

STRONG, P.N., GOERKE, J., OBERG, S.G. e KELLY, R.B. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 178.

SUGETA, H., GO, A. e MIYAZAWA, T. (1973) Bull. Chem. Soc. Jpn. 46, 3407.

SUREWIDZ, W.K. e MANTSCH, H.H. (1988) Biochim. Biophys. Acta 952, 115.

SUSI, H. e BYLER, M. (1986) Meth. Enzym. 130, 290.

TANG, J. e ALBRECHT, A.C. (1970) In Raman Spectroscopy. Theory and Practice, Vol 2, 33, Szymanski, H.A., ed., Plenum Press, New York.

TARASCHI, T. e MENDELSON, R. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 2362.

TATTRIE, N.H., BENETT, J.R. e CYR, R. (1968) Can. J. Biochem. 46, 819.

THOMAS, G.J.,JR. (1987) In Biological Applications of Raman Spectroscopy. Vol. 1: Raman spectra and the conformation of biological macromolecules, 135, Spiro, T.G., ed., John Wiley & Sons, New York.

THOMAS, G.J.,JR. e AGARD, D.A. (1984) Biophys. J. 46, 763.

THOMAS, G.J.,JR., PRESCOTT, B., BENEVIDES, J.M. e WEISS, M.A. (1986 a) Biochemistry 25, 6768.

THOMAS, G.J., JR., PRESCOTT, B., LOVE, R. e STROUD, R.M. (1986 b) Spectrochim. Acta, 42 A, 215.

THOMAS, G.J.,JR., PRESCOTT, B., McDONALD-ORDZIE, P.E. e HARTMAN, K.A. (1976) J. Mol. Biol. 102, 103.

TOLEDO, D.V. e NEVES, A.G.A. (1976) Comp. Biochem. Physiol. 55B, 249.

TSAI, I.-H., LIU, H.-C. e CHANG, T. (1987) Biochim. Biophys. Acta 916, 94.

TU, A.T. (1982) Raman Spectroscopy in Biology: Principles and Applications, 65-116, John Wiley & Sons, New York.

VAN DEN BOSCH, H. (1980) Biochim. Biophys. Acta 604, 191.

VAN WART, H.E. e SCHERAGA, H.A. (1976) J. Phys. Chem. 80, 1823.

VAN WART, H.E. e SCHERAGA, H.A. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3064.

VENKATACHALAM, C.M. (1968) Biopolymers 6, 1425.

VITAL BRAZIL, O. (1966) Mem. Inst. Butantan 33, 981.

VOLWERK, J.J., JOST, P.C., DE HAAS, G.H. e GRIFFITH, O.H. (1986) Biochemistry 25, 1726.

VOLWERK, J.J., PIETERSON, W.A. e DE HAAS, G.A. (1974) Biochemistry 13, 1446.

WEBB, S.J. (1980) Phys. Rep. 60, 201.

WEISS-LOPEZ, B.E., GOODROW, M.H., MUSKER, W.K. e NASH, C.P. (1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 1271.

WIGGINS, P.M. (1988) Prog. Polym. Sci. 13, 1.

WILLIAMS, R.W. (1983) J. Mol. Biol. 166, 581.

WILLIAMS, R.W. (1986) Meth. Enzym. 130, 311.

WILLIAMS, R.W., CUTRERAT, T. DUNKER, A.K. e PETICOLAS, W.L. (1980 a) FEBS Lett. 115, 306.

WILLIAMS, R.W., DUNKER, A.K. e PETICOLAS, W.L. (1980 b) Biophys. J. 32, 232.

WILSON JR., E.B., DECIUS, J.C. e CROSS, P.C. (1955) Molecular Vibrations. The theory of infrared and Raman vibrational spectra. 388 p. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

WU, S.H., CHANG, F.H. e TZENG, M.C. (1983) J. Chromat. 259, 375.

YU, N.T. (1974) J. Am. Chem. Soc. 96, 4644.

YU, N.-T. e EAST, E.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2196.

YU, T.-J., LIPPERT, J.L. e PETICOLAS, W.L. (1973) Biopolymers 12, 2161.

ZIMM, B.H. e BRAGG, J.R. (1959) J. Chem. Phys. 31, 526.