Universidade de São Paulo
Instituto de Física de São Carlos

CARACTERIZAÇÃO DOS ESTADOS DE SPIN E FORMAÇÃO DE AGREGADOS DAS MICROPEROXIDASES-8, -9 EM FUNÇÃO DO pH E ESTUDOS DO CITOCROMO-*c* (S = ½) POR RPE PULSADA

Alessandra Riposati Arantes

Tese apresentada no Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor Em Ciências: Área de Física Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento
Co-Orientadora: Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes

USP/IFSC/SBI
8-2-001703

São Carlos
2005

Arantes, Alessandra Riposati
Caracterização dos estados de spin e formação de agregados das microperoxidases-8 e -9 em função do pH e estudos do citocromo –c (S=1/2) por RPE pulsada/Alessandra Riposati Arantes. São Carlos, 2005.
107 p.

Tese (Doutorado) Instituto de Física de São Carlos, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento
Co-Orientadora: Prof. Dra. Iseli Lourenço Nantes

1. Ressonância paramagnética eletrônica. 2. Microperoxidase. I. Título.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - CEP 13566-590
Caixa Postal 369 - CEP 13560-970
São Carlos - SP - BRASIL

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ALESSANDRA RIPOSATI ARANTES**, APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 23/09/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento (Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Amando Siuiti Ito - FFCLRP / USP

Prof. Dr. Marcel Tabak - IQSC / USP

Profa. Dra. Adelaide Faljoni Alario - IQ / USP

Prof. Dr. José Pedro Donoso Gonzalez – IFSC / USP

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Ao Marcel, meu amor, razão do meu viver.

A minha família, meu porto seguro.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Otaciro, não só pela excelente orientação, mas também por ser uma pessoa maravilhosa e por ter me ensinado a não ter medo da morte. À Profa. Iseli, pela co-orientação e por ter estado tão bem humorada durante todo o trabalho. Agradeço também ao Prof. Magon que sempre esteve disposto a me ensinar. À Tatiana Prieto (por ter me ensinado a pipetar....), ao Fernando (pela ajuda incondicional e por ter mostrado que sou uma DDA), ao Ronny (a quem devo muito do que sei sobre RPE pulsado), ao Jabá (por ser tão prestativo em todas as horas que precisei), ao Beto (por estar sempre presente nas horas difíceis do dia a dia do laboratório, sem sua ajuda seria impossível colocar a linha de transferência de Hélio), à Bel (por ser tão prestativa e mãezona durante todo o tempo), à Andressa, minha grande amiga, uma das pessoas mais generosas que já conheci, à Cris Nordi (que é uma pessoa super especial, sempre alegre, animada e minha companheira de organização de festas), à Pri (uma grande amiga, que me ensinou a ser sincera sempre), à Neusa (meu porto seguro em São Carlos, presente sempre que precisei), à Sheila companheira (quantas e quantas vezes não foi à padaria comigo para eu não ir sozinha). Também quero agradecer à Kelly, ao Luciano, à Luciana e ao Tiago, quase todos moradores lá de casa. À Susana (uma das pessoas mais meigas e carinhosas que tive o prazer de conhecer), ao Leandro (pela ajuda com o computador e pelas conversas na cozinha sobre a vida), a Marli (minha companheira de almoço), à Dani, à Célia, à Ana Paula, Assuero e a todo o pessoal do grupo, Zé Luiz, Melissa, Lia, Rejane, Roseane, Militar, Marcel, Débora, Julio, Wanius, Fernanda, Ceará, Fernando, Silvia... Agradeço à Fapesp pelo apoio financeiro.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....1

CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPEROXIDASES – 8, 9 E N-ACETYLMICROPEROXIDASE-9

CAPÍTULO I.1- *CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS*.....11
I.1.1. O átomo Ferro.....11
I.1.2. Hamiltoniana de Spin.....16
I.1.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-vis.....17
I.1.4. Dicroísmo Circular (CD).....22
I.1.5. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) CW.....23
I.1.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica Pulsada.....24
I.1.6.1. Largura de Linha.....26
I.1.6.2. Eco de spins.....24
I.1.6.3. Eco com Varredura de Campo (Echo Field Sweep).....30
I.1.6.4. ESEEM.....30
I.1.6.4.1. ESEEM 2 pulsos.....32
I.1.6.4.2. ESEEM 3 pulsos.....33
I.1.6.5. Tempo de Relaxação Spin-rede T_1.....34

CAPÍTULO I.2 - *MATERIAIS E MÉTODOS*.....41
I.2.1. Preparação das Amostras.....41
I.2.2. Processo de *N*-acetilação da MP-9.....43
I.2.3. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).....43
I.2.4. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-vis.....43
I.2.5. Dicroísmo Circular (CD).....43
I.2.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) CW e Pulsada.....44

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

I.2.7. Simulação de MD....45

CAPÍTULO I.3 - *RESULTADOS E DISCUSSÕES*....46

I.3.1. Acetilação da MP-9....46

I.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-Vis....47

I.3.3. Dicroísmo Circular (CD)....53

I.3.4. RPE por Onda Contínua (CW)....61

I.3.5. Modelagem da coordenação intra-cadeia do ferro da MP-9 coordenada pela simulação MD....70

I.3.6. RPE pulsada....72

CARACTERIZAÇÃO DO CITOCROMO-C EM SOLUÇÃO TAMPÃO E SDS POR RPE PULSADA

CAPÍTULO II.1 – *MATERIAIS*....81

II.1.1. Preparação das Amostras....81

CAPÍTULO II.2 - *RESULTADOS E DISCUSSÕES*....82

II.2.1. Eco com varredura de campo (*Echo field sweep*)....82

II.2.2. ESEEM....86

II.2.3. Tempo de relaxação spin-rede T_1....91

CAPÍTULO III – *CONCLUSÕES*....96

CAPÍTULO IV - *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*....99

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMACAO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de três dos hemes peptídeos originados da digestão proteolítica do citocromo c. 4

Figura 2 - (**A**) Representação do citocromo *c*. (**B**) Estrutura do grupo heme. (**C**) A quinta coordenação do ferro hemínico do citocromo *c* férrico é ocupada pelo nitrogênio de uma histidina e sexta coordenação pelo enxofre da metionina....7

Figura 3 - Parte angular da função de onda de um elétron em 3d....11

Figura 4 - Representação dos efeitos do campo cristalino sobre os níveis de energia do íon ferro....12

Figura 5 - Possíveis valores de spin ou ocupações dos orbitais d pelos elétrons dos íons Fe^{3+}....13

Figura 6 - Níveis de energia do íon Fe^{3+} com S = 5/2 em um campo cristalino axial....15

Figura 7 - Representação esquemática da componente do campo elétrico da luz circularmente polarizada (A) direita e (B) esquerda....18

Figura 8 - Origem do efeito do dicroísmo circular....18

Figura 9 - Representação da luz elipticamente polarizada após passar pela amostra....20

Figura 10 – Ilustração da largura de linha homogênea e não homogênea....25

Figura 11 - Definição do sistema eixos de laboratório....27

Figura 12 - Ilustra a diminuição da magnetização transversal (T_2)....28

Figura 13 - Ilustração da formação do eco primário....28

Figura 14 - Ilustração de uma seqüência de ESEEM dois pulsos e o comportamento dos pacotes de spins durante a evolução do tempo τ....32

Figura 15 - Ilustração de uma seqüência de ESEEM três pulsos separados por intervalo de tempo τ fixo e t_1 incrementado....33

Figura 16 - Experimento de inversão-recuperação....36

Figura 17 - Representação esquemática do processo de relaxação direto....38

Figura 18 - Representação esquemática do processo de relaxação Raman....39

Figura 19 - Representação esquemática do processo de relaxação Orbach.... 40

Figura 20 - Representação esquemática da estrutura proposta para Microperoxidase-9 *N*-acetilada (*N*-AcMP-9)....42

Figura 21 - Análise por HPLC em pH 6,75 da amostra obtida após a N-Acetilação....46

Figura 22 - Espectros de UV-vis da MP-8 em soluções tamponadas em diversos pHs....47

Figura 23 - Espectros de UV-vis da MP-8 em diferentes concentrações....49

Figura 24 - Espectros de UV-vis da *N*-AcMP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs....50

Figura 25 - Espectros de UV-vis da MP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs....51

Figura 26 - Espectros de UV-vis da MP-9, em diferentes concentrações, obtidos em pH 7....52

Figura 27 - Espectros de UV-vis da MP-9, em diferentes concentrações, obtidos em pH 10....53

Figura 28 - Espectros de CD da MP-8 em soluções tamponadas em diversos pHs....54

Figura 29 - Espectros de CD da *N*-AcMP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs....54

Figura 30 - Espectros de CD da MP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs.....55

Figura 31 - Espectros das espécies da MP-8 envolvidas no equilíbrio e as contribuições relativas espectrais das espécies em função do pH.....56

Figura 32 - Espectros das espécies da *N*-AcMP-9 envolvidas no equilíbrio e as contribuições relativas espectrais das espécies em função.....58

Figura 33 - Espectros das espécies da MP-9 envolvidas no equilíbrio e as contribuições relativas espectrais das espécies em função.....59

Figura 34 - Dependência com a concentração da absorção da banda N (357 nm) da MP-9 em pH 7, 6 e 9.....61

Figura 35 - Espectros de RPE da MP-8 em soluções tamponadas em diversos pHs.....63

Figura 36 - Representação esquemática da distribuição das espécies como função de pH para MP-8 em solução tampão.....65

Figura 37 - Espectros de RPE da *N*-AcMP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs.....65

Figura 38 - Representação esquemática da distribuição das espécies em função do pH para *N*-AcMP-9 em solução tampão.....66

Figura 39 - Espectros de RPE da MP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs.....68

Figura 40 - Representação esquemática da distribuição das espécies como função de pH para MP-9 em solução tampão.....69

Figura 41 – A figura mostra uma conformação típica da MP-9 com coordenação intra-cadeia depois de 8 ns de simulação de MD.....71

Figura 42 - Espectros de RPE CW e pulsado da MP-9 com Imidazol.....72

Figura 43 - Espectros de RPE Pulsada (ESEEM) da MP-9 com Imidazol obtido em 2450 G.....73

Figura 44 - Espectros de RPE Pulsada (ESEEM) da MP-9 com Imidazol obtido em 2750 G....74

Figura 45 - Espectro de RPE CW e pulsada da *N*-AcMP-9 com *N*-Acetylmetionina em tampão fosfato pH 7....76

Figura 46 - Espectro de RPE pulsada (ESEEM) da *N*-AcMP-9 com *N*-Acetylmetionina em tampão fosfato pH 7....77

Figura 47 - Espectro de absorção do citocromo *c* em tampão hepes pH 7 medido através da técnica de RPE (CW) e pulsada (*echo field sweep*)....83

Figura 48 - Espectros de absorção RPE pulsada obtido por *echo field sweep* do citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7 variando a largura dos pulsos....84

Figura 49 - Espectros de absorção RPE pulsada obtido por *echo field sweep* do citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7 variando a largura dos pulsos....85

Figura 50 - Espectros de absorção RPE pulsada obtido por *echo field sweep* do citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) T = 11 K, variando a largura dos pulsos....86

Figura 51 - Espectro de RPE pulsada 2D do decaimento de eco no experimento de dois pulsos em função do campo magnético do citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7....87

Figura 52 - Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de dois pulsos em função do campo magnético para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7....88

Figura 53 - Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de dois pulsos para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7 com campo centrado em 3089 G....89

Figura 54 - Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de três pulsos. (A) citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7 com campo centrado em 3177 G. (B) citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) diluído em tampão hepes (80 mM) pH 7,4 com campo centrado 3233 G....90

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Figura 55 - **(A)** Curva de inversão-recuperação com o campo centrado em 3120 G a 11,5 K. A curva em vermelho representa o ajuste exponencial. (**B**) Taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) versus a temperatura, para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7.....92

Figura 56 - Taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) versus a temperatura. (A) citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. (B) Citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) diluído em tampão hepes pH 7,4. (C) Citocromo *c* (500 μM) com cardiolipina (36 mM) em tampão hepes pH 7,4.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cálculo dos valores g.....67

Tabela 2 – Parâmetros do ajuste da taxa de variação do tempo de relaxação.....94

ABREVIATURAS E SIGLAS

C

CD – Dicroísmo Circular

Cit-c - Citocromo-c

CW - Onda Contínua

Cys – Cisteína

CCA - *Convex Constraint Analysis*

H

His – Histidina

L

Lys – Lisina

M

MP-8 – Microperoxidase-8

MP-9 – Microperoxidase-9

MP-11 – Microperoxidase-11

MD – *Molecular Dynamics*

N

N-AcMP-9 – *N*-Acetilmicroperoxidase-9

N-AcMet - *N*-Acetylmetionina

R

RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica

U

UV-vis – Espectroscopia de Absorção Eletrônica

RESUMO

Neste trabalho, usamos as técnicas espectroscópicas de UV-vis, dicroísmo circular (CD) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para caracterizar as microperoxidases-8 e 9 e *N*-AcMP-9. As microperoxidases são produtos da digestão proteolítica de citocromo *c*, contendo em média dez resíduos de aminoácidos. Não possuindo o sexto ligante, o ferro hemínico neste caso apresenta-se no estado de alto spin. Nossos resultados mostram que a transição alcalina (pK_a = 8,53) produz agregados de hemepeptídeos no estado de baixo spin, nos quais a molécula de água é deslocada pelo grupo N-terminal da cisteína de uma MP-8 vizinha. Para valores altos de pH ocorre uma desprotonação do anel imidazol da histidina que ocupa a quinta coordenação do ferro hemínico. Nessa condição de pH a MP-8 encontra-se em um equilíbrio de espécies agregadas no estado de alto e baixo spin. Uma espécie agregada é formada pela MP-8 pentacoordenada com o hitidinato ocupando a sexta coordenação. Já a outra espécie agregada é composta pela coordenação do grupo α-amino da cisteína e do íon hidróxido, ocupando a sexta e quinta coordenação do ferro hemínico, respectivamente. Quanto a *N*-AcMp-9, o estado de baixo spin é produzido pela desprotonação da água (pK_a = 9,6) situada na sexta coordenação do ferro. Esses resultados estão de acordo com os encontrados para *N*-AcMP-8. Sobre a MP-9, o estado de baixo spin é obtido com o deslocamento da água pelo grupo α-amino terminal da lisina 13 de uma molécula vizinha. Acima do pH 8,5, o grupo ε-amino da lisina 13 estabelece uma coordenação intra-cadeia. Os monômeros exibem OH^- ou histidinato na quinta posição de coordenação. A coordenação intra-cadeia na MP-9 foi corroborada pela simulação de dinâmica molecular (MD). Vale mencionar que todos os resultados de CD e RPE foram simulados utilizando-se os programas CCA e QPOW, respectivamente. Realizamos também medidas de RPE pulsado do citocromo *c* em tampão fosfato pH 7,4 em SDS e em Cardiolipina com o objetivo de investigar o estado de baixo spin alternativo. Realizamos experimentos de eco com varredura de campo (*Echo field sweep*), ESEEM (*Electron spin echo envelope modulation*), e tempo de relaxação spin-rede T_1 para uma completa caracterização dos compostos acima citados.

ABSTRACTS

In this work we have used spectroscopic techniques such as UV-vis, circular dichroism, and electronic paramagnetic resonance to characterize the microperoxidases-8 and -9 and also *N*-AcMP-9. Microperoxidases are products of the proteolytic digestion of cytochrome c, containing an average of ten residues of aminoacids. Lacking the sixth ligand, the heminic iron is in the high spin state. Our results show that the alkaline transition (pK_a = 8,53) produces hemepeptideos aggregates in the low spin state, in which the water molecule is displaced by the N-terminal group of a nearby MP-8 cysteine. For high values of pH there is a deprotonation of the imidazole ring of the histidine that occupies the heminic iron's fifth coordination. In that pH MP-8 is found in equilibrium of aggregated species of high and low spin. An aggregated species if formed by the pentacoordinated MP-8 with the histidinate in the sixth coordination. The other aggregated species is composed by the coordination of the alpha-amino groups of cysteine and hydroxide ion, occupying the sixth and fifth coordination of heminic iron, respectively. As for N-AcMp-9, the low spin state is produced by deprotonation (pK_a=9.6) of the water located at the iron's sixth coordination. These results agree with others found for N-AcMp-8. In MP-9 the low spin state is obtained displacing the water by the terminal alpha-amino group of Lys13 in a nearby molecule. Above pH 8.5 the epsilon-amino group of Lys13 coordinates intra-chain. The monomers exhibit OH- or histidinate in the fifth coordination. The intra-chain coordination of MP-9 was confirmed by molecular dynamics simulation. It is important to notice that all results from CD and EPR were simulated using the programs CCA and QPOW, respectively. We also made pulsed EPR measures of cytochrome c in fosfato buffer pH 7.4 in SDS and in cardiolipin, in order to investigate the alternative low spin state. We made experiments with echo field sweep, ESEEM and spin-lattice relaxation time T1 for a complete characterization of the above mentioned mixture.

INTRODUÇÃO

As hemoproteinas constituem uma classe importante de metaloproteínas que participam de inúmeras reações e atividades celulares, como o transporte de elétrons (citocromos) (Feher, 1969) e a ligação de oxigênio (hemoglobina e mioglobina) (Antonini & Brunori, 1971). Dentre as hemoproteínas, os citocromos, em sua maioria, têm um papel importante no processo de respiração celular. Sua estrutura é composta por uma cadeia polipeptídica e uma molécula de ferroporfirina como grupo prostético (grupo heme), onde o ferro hemínico pode alternar seu estado de oxidação entre Fe^{2+} e Fe^{3+}. Os citocromos que participam do processo de respiração celular são classificados em grupos: *a, b, c* e *f* e possuem estruturas e propriedades diferentes.

O citocromo *c,* alvo deste trabalho, é uma hemoproteína encontrada na intermembrana da mitocôndria e atua na cadeia transportadora de elétrons carregando um elétron do complexo citocromo b-c_1 para o complexo citocromo oxidase a-a_3. Diferentemente dos outros componentes da cadeia respiratória que são proteínas grandes e integrais de membranas, o citocromo *c* é uma proteína pequena e periférica, ligada à face externa da membrana interna da mitocôndria. Por isso, é considerado um carregador móvel com múltiplas funções quando em fase aquosa. Sendo uma hemoproteína, o citocromo *c* pode atuar como peroxidase/oxidase. Além disso, devido a sua localização celular o citocromo *c* pode atravessar a membrana externa e disparar a apoptose no citossol. Apoptose

consiste em uma autodestruição celular que requer energia e síntese protéica para a sua execução.

O entendimento do envoltório do heme é essencial na elucidação do mecanismo da oxidação e redução dos citocromos, bem como na determinação *do* mecanismo de oxigenação da mioglobina e da hemoglobina. Além disso, uma questão central na química da hemoproteína é como a estrutura peptídica controla e modifica a função do grupo prostético.

Um bom modelo para estudar o citocromo *c* são as microperoxidases, as quais são obtidas da digestão proteolítica do citocromo *c*, contendo em média dez resíduos de aminoácidos e um único resíduo de histidina como ligante axial para o ferro hemínico. A substituição do ligante na sexta coordenação do ferro é acompanhada pelas mudanças nas propriedades magnéticas. É digno de nota que uma porfirina ideal necessita ser solúvel em água, monomérica em solução aquosa, possuir um ligante axial imidazol firmemente coordenado e a sexta coordenação ser livre ou ocupada com um ligante que seja facilmente substituído. Contudo, muitos estudos físicos e espectroscópicos das microperoxidases requerem concentrações significativamente altas (Marques *et al.,* 2000), e nessas condições ocorre a formação de agregados. Uma forma de evitar a agregação é bloquear ou acetilar o *N*-terminal das microperoxidases.

Uma completa caracterização do comportamento das *N*-AcMP-8 e *N*-AcMP-11 foi realizada por Munro e colaboradores (1996) e Carraway e colaboradores (1996), respectivamente. Porém, não há trabalhos na literatura para investigação da *N*-AcMP-9. Em vista disso, um dos objetivos desse trabalho é fazer uma completa caracterização da *N*-AcMP-9, bem como da MP-8 e MP-9 em função do pH, identificando os diversos estados de agregados os quais são sugeridos na literatura, mas não identificados até o momento. Para isso, utilizamos as técnicas espectroscópicas de UV-Vis, dicroísmo circular (CD), ressonância paramagnética

eletrônica CW e pulsada. Além disso, objetivando compreender melhor o estado de spin do citocromo *c* férrico S = 1/2, realizamos medidas de RPE pulsada nos estudos de processos de relaxação em função da temperatura e das associações com superfícies carregadas.

A escolha destas técnicas deve-se ao fato das espectroscopias UV-Vis e o dicroísmo circular (CD) serem amplamente utilizadas, mas possuirem limitações na resolução das bandas apresentadas, quando ocorrem pequenas mudanças estruturais. A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) então complementa os resultados, uma vez que é uma técnica extremamente sensível a pequenas mudanças do ferro hemínico. O espectro de RPE onda contínua (CW) é o resultado de todas as interações e processos de relaxação presentes na amostra. Assim, é muito comum não se conseguir separar todas as interações que contribuem para o espectro CW, problema este que é resolvido pela técnica de RPE pulsada.

Microperoxidases hexacoordernadas

Microperoxidases (MPs) são fragmentos de hemopeptídeos, como previamente mencionado, obtidos pela digestão proteolítica do citocromo-*c* cortando a cadeia polipeptídica de modo a manter o fragmento desde o aminoácido glutamina 21 até a valina 11 no caso da MP-11, até Lisina 13 para MP-9 e até cisteína 14 para MP-8 (Figura 1) (Harbury & Loach, 1960; Aron *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 1989; Low *et al.*, 1997).

Similarmente ao citocromo-*c*, na estrutura da MP o grupo heme permanece covalentemente ligado a cisteína-14 e cisteína-17 por pontes tioeter, e a histidina é

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

mantida como quinto ligante do ferro. Porém, ao contrário do citocromo-*c* a metionina não se encontra na sexta coordenação. A ausência da ocupação da sexta coordenação do ferro permite que esse sitío seja ocupado por diferentes ligantes (Harbury *et al.*, 1960). Essa característica torna as microperoxidases um modelo realístico para o estudo de hemoproteínas.

É digno de nota que as microperoxidases não formam dímeros μ-oxo (Wang *et al.*, 1992) e, em soluções aquosas, estão na forma de monômeros quando em baixas concentrações.

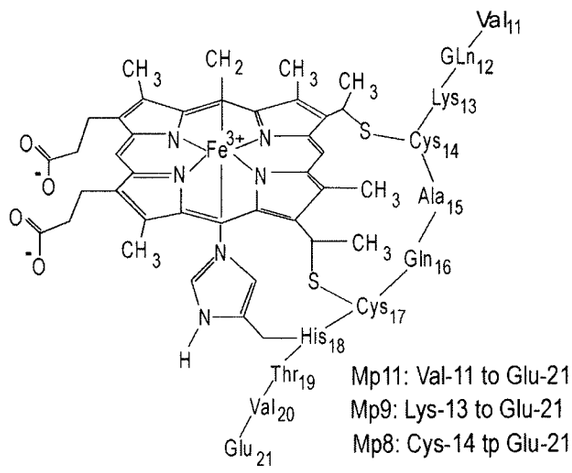


Figura 1: Representação esquemática de três dos hemes peptídeos originados da digestão proteolítica do citocromo c. Microperoxidase-11 (MP-11) retém resíduos 11-21, microperoxidase-9 (MP-9) resíduos 13-21 e microperoxidase-8 (MP-8) resíduos 14-21.

Vários estudos tem sido realizados sobre a coordenação da esfera do heme presente nas microperoxidases (Harbury *et al.*, 1959; Urry *et al*, 1967; Blumenthal *et al.*, 1979). Considerando que muitos dos estudos espectroscópicos requerem altas concentrações de MPs, o problema consiste na agregação, que pode ser praticamente eliminada pela utilização de solução em metanol (Baldwin *et al.*, 1987;

Baldwin *et al.*, 1986), soluções micelares (Mazumdar *et al.*, 1991; Carraway *et al.*, 1995) e *N*-acetilação, ou seja, bloqueio do grupo amino terminal, possível ligante para o ferro hemínico (Munro *et al.*, 1998; Lushington *et al.*, 2003; Cowley *et al.*, 2004; Munro *et al.*, 1996; Tezcan *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2000).

Os primeiros dados publicados de RPE e susceptibilidade magnética da microperoxidase-8 com o grupo amino terminal *N*-acetilado (*N*-AcMP-8), foram realizados por Yang e Sauer (1982). Seus resultados mostraram que esta modificação química previne a dimerização bloqueando a coordenação intermolecular. Mais tarde, Wang e Van Wart (1989), utilizando as técnicas de espectroscopias Raman e absorção eletrônica, observaram para *N*-AcMP-8 que a *N*-acetilação do resíduo *N*-terminal da cisteína-14 elimina a agregação em soluções com pH neutro, à temperatura ambiente. Nessas condições, também mostraram que o heme da *N*-AcMP-8 exibe a histidina-18 e a água como ligantes proximal e distal, respectivamente, e também existe como um equilíbrio térmico dos estados de spin intermediário (S = 3/2) e spin alto (S = 5/2).

A microperoxidase-11 (MP-11) bis(*N*-acetilada) também foi caracterizada (Marques & Perry, 1999). De acordo com Carraway e colaboradores (1996), o tratamento da MP-11 com anidrido acético resulta na *N*-acetilação do grupo ε- e α-amino da Lisina-13 (Lys13). A MP-11 bis(*N*-acetilada) exibe na sexta coordenação uma molécula de água, que pode ser deslocada por ligantes semelhantes como a azida. Esse deslocamento da água por outro ligante é acompanhado por mudanças das propriedades magnéticas do ferro hemínico. Nesse contexto, o estado de spin baixo das MPs (S = ½) é observado quando a água é substituída por ligantes de campo forte como N^- ou OH^- (Munro *et al.*, 1998).

Entretanto, está evidente que na literatura não há muitas informações sobre o estado de spin baixo das MPs produzidos pela coordenação do ferro hemínico

com o grupo ε- ou α-amino de outra molécula vizinha. Além disso, também não foi investigado o comportamento da microperoxidase-9 (MP-9) *N*-acetilada em solução aquosa.

Para tanto, fizemos um estudo comparativo sistemático do comportamento da MP-8, MP-9 e MP-9 *N*-acetilada (*N*-AcMP-9) em solução aquosa em função do pH.

Citocromo-c

Em termos de caracterização da estrutura, o citocromo *c* de coração de cavalo é uma das proteínas mais estudadas tanto no estado cristalino (Bushnell *et al.*, 1990) como em solução (Banci *et al.*, 1997). O citocromo *c* contém uma cadeia polipeptídica de 104 aminoácidos e um grupo planar contendo um íon ferro (grupo prostético), conhecido como grupo heme. Sua estrutura secundária é composta por três hélicies-α maiores e duas hélices-α menores, interconectadas pela cadeia polipeptídica envolvendo o heme em um arranjo esférico. O arranjo polipeptídico da proteína não protege o grupo heme totalmente, dessa forma poucos átomos do anel porfirínico são expostos ao solvente.

O citocromo *c* possui um grupo heme covalentemente ligado à cadeia polipeptídica da proteína, através de pontes tioeter com dois resíduos de cisteína 14 e 17. O átomo de ferro está coordenado octaedralmente com ligantes axiais histidina 18 e da metionina 80 (Figura 2). Esses dois ligantes axiais (o enxofre da metionina 80 e o nitrogênio da histidina 18) são considerados ligantes fortes e mantêm o ferro hemínico em um estado de spin baixo na forma de oxidação Fe^{3+} (Feher, 1969).

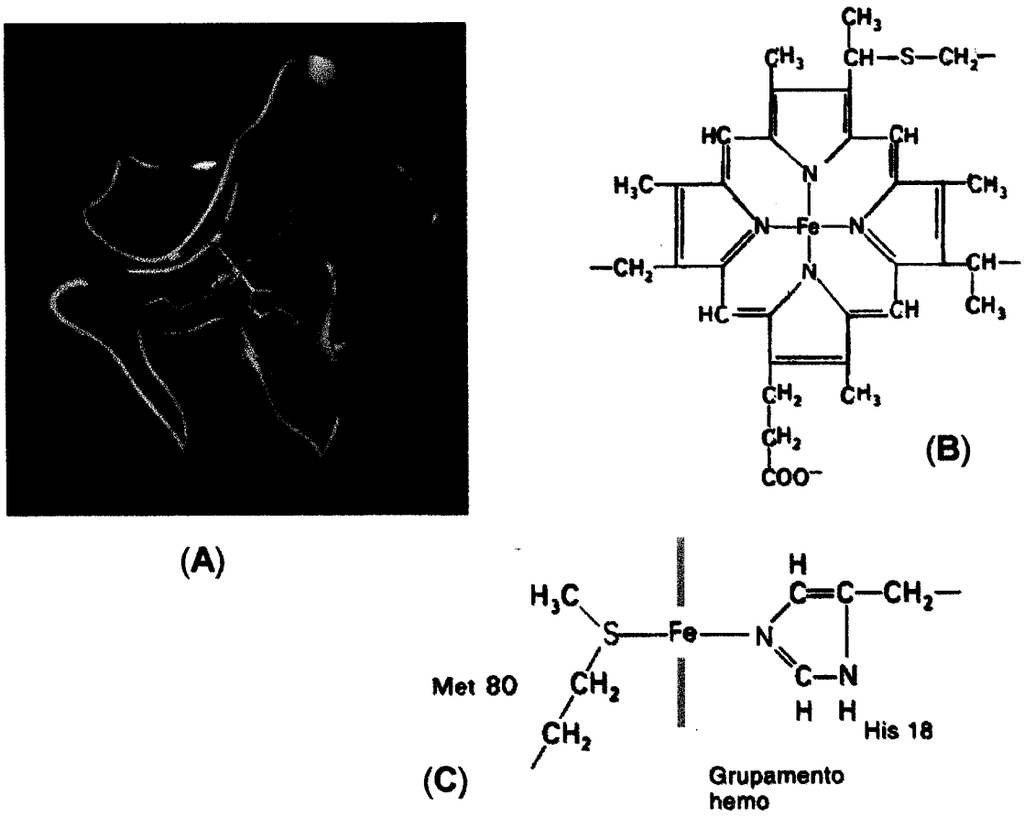


Figura 2: (**A**) Representação do citocromo *c* por *ribbons*, utilizando-se o programa *LabWiew*. O grupo heme está ilustrado em azul. (**B**) Estrutura do grupo heme. (**C**) A quinta coordenação do ferro hemínico do citocromo *c* férrico é ocupada pelo nitrogênio de uma histidina e sexta coordenação pelo enxofre da metionina.

A sexta coordenação do átomo de ferro, Fe-S (Met 80), não é considerada particularmente uma ligação estável e pode ser facilmente quebrada por aumento do pH e por aumento da temperatura (Wuthrich *et al.*, 1971). O enfraquecimento da ligação Fe-S provoca uma mudança no estado de spin baixo para o estado de spin alto do ferro hemínico. A perda da ligação do ferro hemínico com a metionina 80 ocasiona um pequeno movimento da seqüência dos resíduos de 78 a 90. Esse movimento usualmente ocasiona uma abertura e uma conseqüente exposição do heme, o que pode facilitar o transporte de elétrons.

A interação entre o citocromo *c* e bicamadas lipídicas vem sendo alvo de inúmeros estudos. (Nicholls, 1974; Pinheiro, 1994). Essas investigações demonstram que a interação eletrostática é um importante fator na associação do citocromo *c* com membranas fosfolipídicas, mas não o único. Rytömaa e Kinnunem (1995) propuseram um modelo no qual a cadeia carbônica do lipídio é acomodada no canal hidrofóbico, presente na estrutura do citocromo *c,* entretanto não ficou totalmente compreendido o papel da cadeia acil.

A associação do citocromo *c* com membranas lipídicas induz mudanças do campo cristalino no ferro hemínico, as quais mudam o estado de spin do átomo de ferro. Procurando compreender melhor o papel da cadeia acil Zucchi e colaboradores (2003) mostraram uma correlação entre a cadeia carbônica interagindo com diferentes tipos de membranas lipídicas. As mudanças estruturais no grupo heme foram correlacionadas com a natureza do lipídio, isto é, com a carga da cabeça e com o tamanho e o tipo da cadeia fosfolipídica. De acordo com o tipo da cadeia carbônica lipídica e a carga da cabeça foram observados três estados de spin para o citocromo *c* em diferentes proporções: citocromo *c* nativo estado de spin baixo com simetria rômbica (S = ½, g_1= 3,075, g_2=2.238 e g_3=1,270), um outro estado de spin baixo com rombicidade menor (S = ½, g_1 = 2,902, g_2 = 2,225 e g_3 = 1,510) e um estado de spin alto (S = 5/2, $g_{//}$ = 6,0 e $g_{\perp}$ = 2,0).

Em continuação ao trabalho realizado por Zucchi e colaboradores (2003), foram investigadas neste trabalho utilizando a técnica de RPE pulsada, as modificações de estado de spin do íon Fe^{3+} decorrentes da associação com superfícies de lipossomos carregados. Para tanto, selecionamos amostras que apresentaram estado de spin baixo com rombicidade menor são elas: citocromo *c* em SDS e cardiolipina. Além disso, realizamos medidas com citocromo c em tampão fosfato pH 7,4, a fim de comparar com as amostras citadas acima. Efetuamos experimentos de eco com varredura de campo (*Echo field sweep*),

ESEEM (*Electron spin echo envelope modulation*), e tempo de relaxação spin-rede T_1.

Este trabalho é dividido em duas partes e será apresentado de acordo com a seguinte distribuição:

- No capítulo I.1 é apresentada uma introdução das microperoxidases hexacoordenadas;
- No capítulo I.2 faremos um resumo teórico sobre o íon ferro, Hamiltoniana de spin e as técnicas espectroscópicas de absorção eletrônica, dicroísmo circular, ressonância paramagnética eletrônica CW e pulsada;
- No capítulo I.3 estão descritos os materiais e métodos de preparação das amostras para o estudo com cada técnica espectroscópica;
- No capítulo I.4 apresentamos os resultados e discussões dos mesmos;

Na segunda parte, que é dedicada aos estudos do citocromo *c* em soluções tampão, SDS e cardiolipina, a tese é apresentada da seguinte forma:

- No capítulo II.1 uma introdução ao citocromo *c*;
- No capítulo II.2 os materiais e métodos para o estudo com a técnica de RPE pulsado;
- Os resultados obtidos e as discussões com a técnica de RPE pulsado são colocados no capítulo II.3;
- Por fim, as conclusões do trabalho são apresentadas no capítulo III.

CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPEROXIDASES – 8, 9 E N-ACETYLMICROPEROXIDASE-9

CAPÍTULO I.1 - CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

I.1.1. O átomo Ferro

Freqüentemente, o átomo de ferro pode apresentar-se em três estados de oxidação: Fe^{2+} com configuração eletrônica d^6 (ferroso), Fe^{3+} d^5 (férrico) e Fe^{4+} d^4 (ferril). Um átomo de ferro possui 26 elétrons, dos quais 18 estão em camadas fechadas e 8 estão na configuração orbital $3d^6\ 4s^2$. A camada 3d possui 5 orbitais e a dependência angular das cinco funções de onda (orbitais) está mostrada na Figura 3. Três dos orbitais, denominados d_{xy}, d_{xz} e d_{yz} ou orbitais t_{2g}, são idênticos, exceto pela sua orientação espacial. Esses orbitais estão orientados entre os eixos x, y e z e consequentemente possuem densidades eletrônicas mínimas ao longo dos eixos e densidades máximas nas diagonais entre os eixos. Ao contrário, os orbitais e_g ($d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2}) apontam ao longo dos eixos (Atkins, 2001).

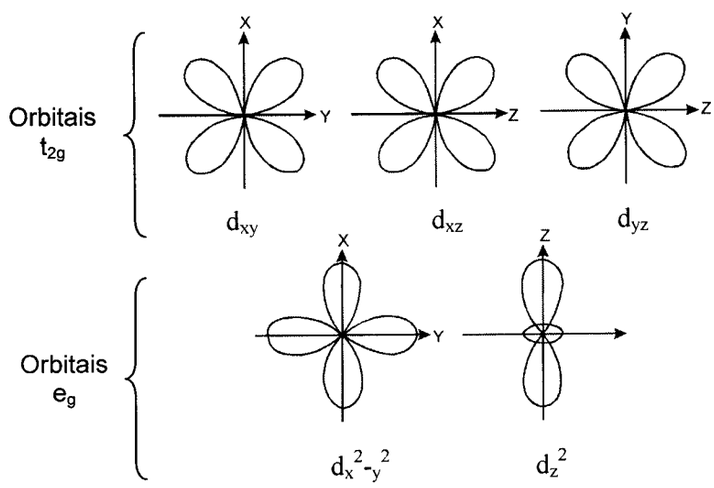


Figura 3: Parte angular da função de onda de um elétron em orbitais 3d.

No íon livre os cincos orbitais 3d possuem a mesma energia. Porém, se considerarmos que estejam ligados ao ferro seis ligantes formando uma simetria octaédrica a degenerescência será levantada, pois o efeito do campo cristalino de cada ligante não é o mesmo em todos os orbitais. Desta forma, o desdobramento dos níveis de energia degenerados é sensível à simetria da vizinhança.

Para tornar mais clara o efeito da simetria, na Figura 4 está ilustrado o desdobramento nos níveis de energia dos orbitais d para uma simetria esférica, octaédrica regular, octaédrica com distorções tetragonal e rômbica.

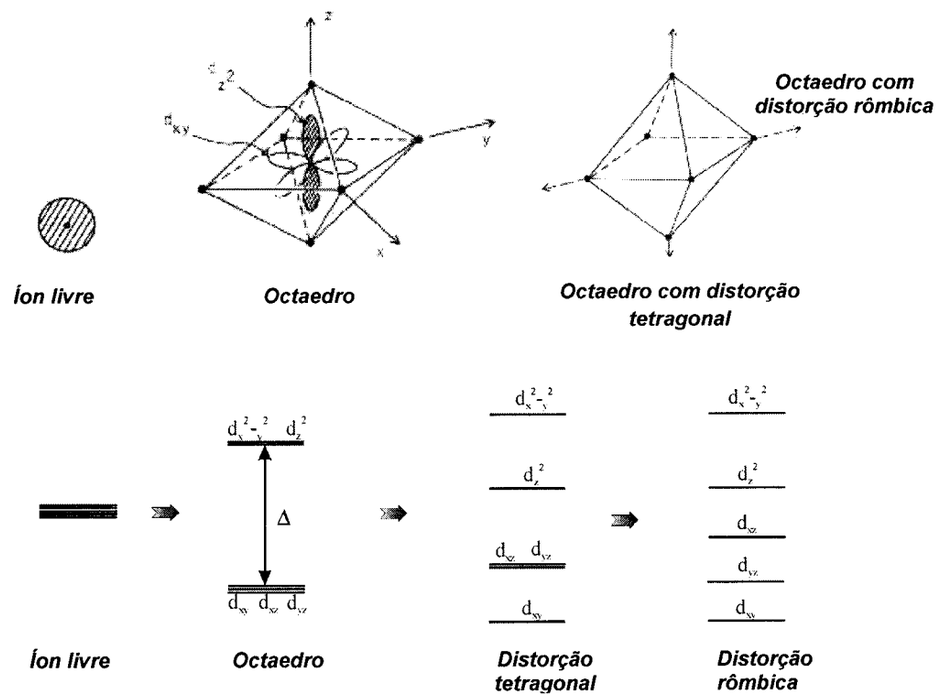


Figura 4: Representação dos efeitos do campo cristalino sobre os níveis de energia do íon ferro (Feher, 1969).

Sendo Δ a diferença de energia entre orbitais t_{2g} e e_g (Feher, 1969). A magnitude de Δ depende principalmente da força do campo ligante ou campo cristalino, que é uma medida da grandeza com que um grupo complexante irá

separar as energias dos elétrons d. É possível arranjar os ligantes comuns na ordem crescente da força do campo ligante: $I^- < Br^- < Cl^- < F^- < OH^- < H_2O < SCN^- < NH_3 < NO_2^- < CN^-$ (Atkins, 2001). Entretanto, na literatura (Munro & Marques, 1996) consta que o grupo OH^- se comporta como um ligante forte, cuja configuração é caracterizada por estado de spin baixo. Dependendo da intensidade do campo ligante, Δ, o íon poderá ter configurações que variam de spin alto a spin baixo. Assim, ligantes fortes, como o cianeto (CN^-), fornecem uma configuração de spin baixo, porém ligantes fracos, como a água, fornece configuração de spin alto. Na Figura 5 está ilustrado um exemplo desse procedimento para o Fe^{3+}.

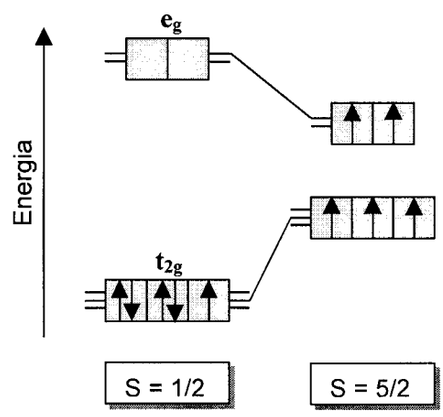


Figura 5: Possíveis valores de spin ou ocupações dos orbitais d pelos elétrons dos íons Fe^{3+} dependendo do valor de Δ (Atkins, 2001).

O estado de spin do íon também poderá ser alterado em temperaturas baixas, por exemplo em temperatura de Hélio líquido.

I.1.2. Hamiltoniana de Spin

Para entender esse sistema, que consiste de um íon paramagnético contido em um campo cristalino, deve-se considerar todas as interações do spin eletrônico. O tratamento dessas interações é realizado considerando a Hamiltoniana de spin do sistema em questão, a partir da qual podemos obter as quantidades de interesse, ou seja, autofunções e os níveis de energia. A Hamiltoniana de spin que descreve o sistema em estudo - íon Fe^{3+} no estado de spin 5/2, em hemoproteínas, é dada por:

$$H = \beta g_0 B S_z + D S_z^2 + E\left(S_x^2 - S_y^2\right) \qquad (1)$$

Na equação acima o parâmetro β é o magneton de Bohr, g_0 o fator giromagnético do elétron, B o campo magnético externo aplicado na direção z, S_x, S_y, S_z as componentes de spin ao longo de um sistema de eixos cristalinos (escolhido de maneira a não haver termos do tipo S_xS_y em *H)* e D e E constantes devido ao desdobramento do campo zero. É comum que os parâmetros D (distorção axial) e E (distorção rômbica) sejam representados como λ = E/D cujo valor é restrito a $\lambda \leq 1/3$. Portanto, no caso de máxima distorção rômbica o parâmetro λ será igual a 1/3, para simetria axial temos E = 0 e D $\neq$ 0 e, para simetria cúbica, temos D = E = 0.

O primeiro termo da Hamiltoniana de spin surge devido ao efeito Zeeman, ou seja, interação entre os momentos magnéticos dos elétrons com o campo magnético externo H, produzindo um desdobramento adicional nos níveis de energia.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Já o segundo termo, denominado interação fina, representa a interação dos elétrons desemparelhados do íon paramagnético com o campo cristalino criado pelos átomos vizinhos. Com o intuito de esclarecer tal procedimento, suponhamos íons ou moléculas com mais de um spin eletrônico desemparelhado próximo. Nesse caso, os spins serão submetidos ao campo magnético aplicado e ao campo magnético gerado pelos spins eletrônicos de outros elétrons desemparelhados vizinhos. Esta interação magnética, que ocorre envolvendo o acoplamento spin-órbita, provocará uma separação nos níveis de energia mesmo na ausência de campo magnético externo, sendo essa quebra de degenerescência chamada de separação de campo zero (D) ou interação fina.

No heme, quando o íon Fe^{3+} está sujeito a um campo cristalino fraco criado pelos ligantes, os três dubletos de Kramers (± 5/2, ± 3/2, ± 1/2) desdobram-se em três níveis com diferentes energias em campo magnético zero, como está ilustrado na Figura 6. Os diferentes desdobramentos podem ser entendidos considerando que o eixo de quantização (Z) para o sistema não depende do campo magnético externo mas sim do campo cristalino criado pelos ligantes, isto é, D >> gβH (Feher, 1969).

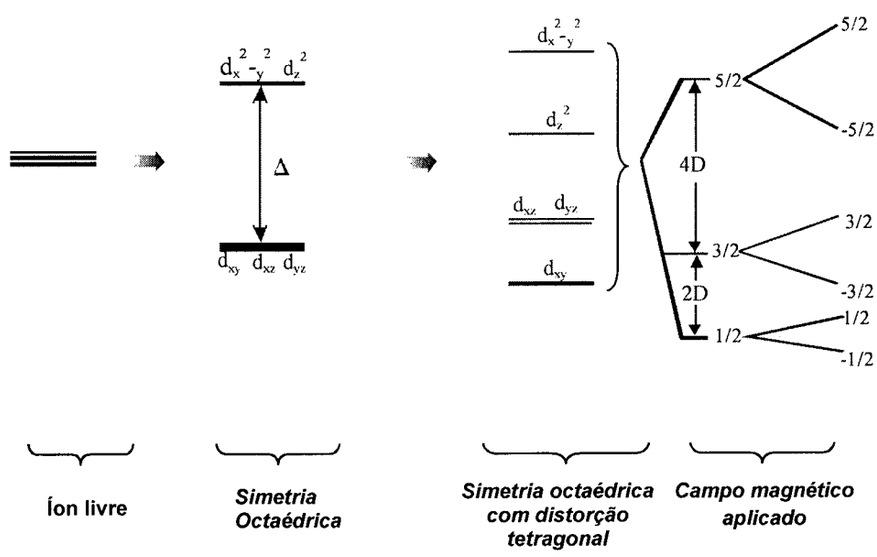


Figura 6: Níveis de energia do íon Fe^{3+} com S = 5/2 em um campo cristalino axial. Vale mencionar que, a escala não representa um sistema real.

I.1.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-Vis

A espectroscopia por absorção de radiação eletromagnética no intervalo entre o ultravioleta e o visível é um método de grande aplicabilidade devido à sua simplicidade e acessibilidade na maioria dos laboratórios. Essa técnica consiste na aplicação de um feixe de luz que atravessa a solução, sendo que parte é absorvida e outra parte é transmitida.

A absorção de radiação ultravioleta ou visível geralmente resulta da excitação de elétrons que estão no estado fundamental, para um estado de maior energia. Como conseqüência, os comprimentos de onda dos picos nos espectros de UV-Vis podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo. Além disso, é possível obter informações relacionadas ao campo ligante visto pelo íon de ferro e seu estado de spin.

De maneira geral, um espectro de absorção eletrônica de porfirina é caracterizado por uma banda Soret (também conhecida como banda B) próxima a 400 nm, duas bandas na região do visível Q_0 (origem eletrônica) e Q_v (origem vibracional), também chamadas de alfa e beta, localizadas entre 580 nm e 500 nm. A intensidade da banda Q_v é atribuída a um acoplamento vibrônico muito intenso com a banda Soret, já a banda Q_0 é menos intensa. No caso das ferroporfirinas no estado de alto spin além dessas bandas também surge uma banda de transferência de carga (CT) próxima a 600 nm (Gouterman, 1978, Owens & Connor, 1998).

Para ferroporfirinas no estado de spin baixo ocorre um deslocamento das bandas observadas no estado de spin para o vermelho e não surge a banda em 620 nm. Porém, quando os ligantes são bons aceitadores π como o cianeto e

imidazol, a banda Q_v é tão intensa que a banda Q_0 pode não ser visível ou aparecer como um ombro do pico Q_v. É digno de nota que as bandas Q dependem da força do campo ligante dos ligantes axiais do ferro hemínico, que aproximam ou distanciam os níveis de energia. No estado de spin baixo, a banda Soret pode apresentar um ombro no lado de maior energia do espectro, denominada banda N. Além disso, a banda Soret pode também apresentar pequenos deslocamentos dependendo do ligante da sexta coordenação e por conseqüência do estado de spin do ferro hemínico.

I.1.4. Dicroísmo Circular (CD)

O dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) é observado em moléculas oticamente ativas que apresentam diferenças na absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. A técnica de dicroísmo circular é particularmente útil para o estudo de proteínas, pois essas possuem centros assimétricos (carbonos α) distribuídos ao longo de sua cadeia principal. Nesse contexto, com a espectroscopia de CD é possível caracterizar e quantificar diferentes tipos de estrutura secundária destas macromoléculas, tais como: hélice α, folhas β (paralelas e antiparalelas), entre outras. Além disso, o CD é também muito empregado para observar mudanças conformacionais induzidas por interações da proteína com ligantes específicos e solventes (Cantor & Schimmel, 1980).

A técnica de CD consiste na aplicação de um feixe de luz circularmente polarizado à direita, D, e um circularmente polarizado à esquerda, E, (Figura 7).

$\mathbf{E}_d = 1/2[\mathbf{i}\ E_o sen(wt) + \mathbf{j}\ E_o cos(wt)]$ $\mathbf{E}_e = 1/2[\mathbf{i}\ E_o sen(wt) - \mathbf{j}\ E_o cos(wt)]$ (2)

Figura 7: Representação esquemática da componente do campo elétrico da luz circularmente polarizada (A) direita e (B) esquerda.

Após passar através da amostra, as componentes do campo elétrico da luz polarizada não são absorvidas igualmente. Desse modo, o raio do círculo traçado pelo vetor campo elétrico de cada componente é diferente. Quando essas duas componentes em sentidos opostos atravessam a amostra e são combinadas, o resultado é uma luz elipticamente polarizada (Figura 8). Assim, o dicroísmo circular mede a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda (ΔA).

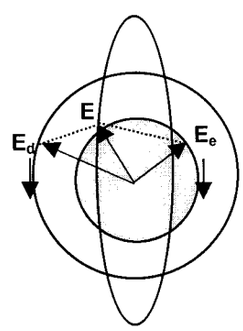


Figura 8: Origem do efeito do dicroísmo circular. Decomposição do feixe plano polarizado em duas componentes circulares à esquerda (E), e à direita (D) e depois de passar pela amostra. $E = E_d - E_e$

A definição da absorbância A e dada pela lei de Lambert-Beer:

$$A = \log(I_0 / I) \tag{3}$$

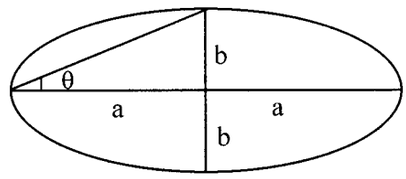
Sendo I_0 a intensidade da luz incidente na amostra e I a intensidade da luz após passar pela amostra. Aplicando a lei para ambos os feixes, temos:

$$A_e = \log(I_0 / I_e) \qquad A_d = \log(I_0 / I_d) \tag{4}$$

Sendo, A_e a absorbância medida da luz circularmente polarizada à esquerda e A_d a absorbância da luz circularmente polarizada à direita. Sendo assim, ΔA é dado por:

$$\Delta A = A_e - A_d = \log(I_e / I_d) \tag{5}$$

Como já foi dito anteriormente, a luz resultante ao passar pela amostra é elipticamente polarizada. Quando os vetores campo elétrico das duas componentes circulares estão na mesma direção sua soma resulta no semi-eixo maior da elipse, e quando estão em direções opostas sua soma resulta no semi-eixo menor. Logo, o CD é caracterizado pela razão entre os dois semi-eixos, ou seja, pela tangente do ângulo θ, denominado elipticidade (Figura 9). Sendo θ um ângulo muito pequeno, a tangente de θ pode ser aproximada para θ.



$$\text{tg}\ \theta = a/b \Rightarrow \theta = \text{arctg}(a/b) \quad (6)$$

$$\theta \textbf{ vs. } \lambda \Rightarrow \textbf{CD}$$

Figura 9: Representação da luz elipticamente polarizada após passar pela amostra.

Existe uma relação numérica entre ΔA e θ que é dada por:

$$\Theta = 2.303\ (A_e - A_d)180/4\pi \quad (7)$$

As medidas de CD também podem ser expressas em elipticidade molar Θ por aminoácido, utilizando a seguinte relação:

$$\Theta = \frac{100.10^{-6}N}{C.l}\theta \quad (8)$$

Onde N é a massa molar média de um resíduo de aminoácido (~ 115 daltons), C é a concentração da proteína em mg/ml e *l* é o caminho ótico em cm. Por razões históricas, a concentração era medida em g/100 cm^3, por esta razão aparece o fator 100 na equação acima. Portanto, a elipticidade molar, é expressa em grau.cm^2.$dmol^{-1}$.10^3.

Devemos notar que se a amostra tem transições eletrônicas intensas a forma do espectro de CD é análoga à da banda de absorção (efeito Cotton). Fora da região de absorção $\theta = 0$ e isto é razoável uma vez que $\theta \propto A_e - A_d$ e ambos são nulos. Apesar de ter a mesma forma da absorção o espectro de CD tanto pode ser

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMACAO

positivo quanto negativo (efeito Cotton positivo e negativo) dependendo de quem predomina, A_e ou A_d. Sendo assim, o espectro de CD dá duas informações adicionais em comparação a absorção, se a amostra é assimétrica (dicroíca) e se A_e é maior ou menor que A_d .

Com o intuito de analisar os dados de CD, utilizou-se um método denominado "*Convex Constraint Analysis*" (CCA), proposto por Perczel e colaboradores (1992), o qual foi aplicado para estimar o número de espécies no equilíbrio em função do pH. CCA é um método geral de decomposição de espectros que utiliza o algoritmo simplex, o qual calcula um número de variáveis funcionais f_i linearmente independente de dimensão p, tal que as funções f_j (espectros experimentais) dadas como pertencentes a esse conjunto são reproduzidas como uma combinação linear das funções f_i cujos coeficientes C_{ij} representam as porcentagens de contribuição de cada função f_i:

$$f_j = \sum_{i=1}^{p} C_{ij} \cdot f_i \qquad (9)$$

São consideradas três restrições nesses coeficientes: (1) a soma dos coeficientes é unitária para cada valor de j, $\sum C_{ij} = 1$, onde a soma vai de i = 1 a p, j = 1,2,....,N, onde N é o número de funções experimentais nas analises (N > p); (2) todos os coeficientes são positivos, isto é, C_{ij} >0; (3) os pontos correspondentes a C_{ij} obedecem ao espaço simplex Euclidiano de dimensão p com volume mínimo (dimensão da base). A discussão de mais detalhes deste procedimento pode ser encontrada nas refs. (Gandini *et al.*, 1998; Yushmanov *et al.*, 1996; Gandini *et al.*, 2001).

I.1.5. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) CW

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) originou-se em meados de 1945 e, desde então, houve um extenso e contínuo progresso neste campo. Com essa técnica é possível obter informações sobre reações de transferência de elétrons, determinação da simetria na qual o sítio paramagnético está envolvido, indicação de radicais produzidos durante reações de oxi-redução e em mecanismos de atividades enzimáticas, entre outras (Feher, 1969).

Uma forma simples de explicar o funcionamento do espectrômetro de RPE consiste na incidência de radiação eletromagnética, com freqüência de microondas, em uma amostra submetida a um campo magnético estático. A amostra absorve a microondas mudando as propriedades magnéticas e provocando assim uma reflexão de microondas que é medida por um detector. Para a aquisição de um espectro de RPE a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante cujas dimensões são ajustadas à freqüência de microondas utilizada, desse modo é impossível variar esta freqüência sem variar as dimensões da cavidade (Knowles *et al.*, 1976).

Com o espectro de RPE de um sistema biológico é possível identificar complexos metálicos paramagnéticos e radicais livres contidos na amostra, freqüentemente comparando com substâncias já caracterizadas. Além disso, a técnica permite determinar interações spin-spin entre elétrons de espécies diferentes. É importante ressaltar que substâncias não paramagnéticas (não possuem spins desemparelhados) não podem ser detectadas. Nesse caso, faz-se

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

necessário a introdução de substâncias paramagnéticas ao sistema a ser estudado como marcadores paramagnéticos.

De maneira geral, a identificação das espécies paramagnéticas é fornecida por um parâmetro adimensional denominado fator *g* efetivo, o qual é obtido diretamente no espectro ou através de simulações deste espectro com o auxílio de métodos computacionais. Para a determinação dos valores de *g* de um íon metálico, utiliza-se como referência o valor 2,0023, correspondente ao fator *g* de um elétron em um meio esfericamente simétrico, isto é, momento orbital igual a zero. Quando há uma significativa contribuição deste momento angular orbital ao momento magnético total do elétron desemparelhado o valor de *g* poderá desviar significativamente do fator *g* para o elétron livre.

Nas hemoproteínas, o espectro típico do íon Fe^{3+} no estado de spin alto é caracterizado por duas linhas, uma muito intensa em campo baixo ($g_x = g_y = g_\perp = 6$) e outra de pequena intensidade em campo alto ($g_{//} = 2$), característico de uma simetria axial de campo cristalino fraco. Já o sinal de spin baixo, cujo espectro corresponde a uma simetria rômbica, apresenta três valores de g menores que 4. Mudanças nesses espectros podem ser utilizadas para descrever variações de simetria e de intensidade de campo cristalino na região onde o íon ferro está inserido na proteína (Feher, 1969).

I.1.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica Pulsada

Os primeiros estudos utilizando a técnica de ressonância paramagnética pulsada ocorreram em meados de 1960 feitos por Mims e colaboradores (1961) nos laboratórios da Bell. Por uma década as pesquisas não avançaram muito. O desenvolvimento da técnica pulsada em RPE exigiu muito tempo, quando comparada com o NMR (ressonância magnética nuclear), por causa da necessidade do uso de uma eletrônica suficientemente rápida para o processamento de sinais com escala temporal da ordem de dezenas ou centenas de nanosegundos. Somente em 1982 foi construído o primeiro RPE pulsado comercial (Schweiger & Jeschke, 2001).

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica pulsada (RPE) é uma técnica espectroscópica extremamente valiosa, pois permite obter informações sobre as interações hiperfinas anisotrópicas fracas, que na maioria dos casos não estão resolvidas nos espectros CW alargados não homogeneamente, tempo de relaxação spin-spin e spin-rede, entre outras.

Para uma melhor compreensão dos métodos da técnica de RPE pulsada, inicialmente faremos uma breve explicação de largura de linha espectral.

I.1.6.1. Largura de Linha

Linhas espectrais são geralmente classificadas como alargadas homogeneamente ou não homogeneamente (Abragam & Bleaney. 1970; Atherton, 1993). Quanto às linhas alargadas homogeneamente, pode-se dizer que os spins experimentam o mesmo campo local. Nesse caso, a forma da linha para cada dipolo individual é usualmente Lorentziana, e possui uma dependência com o inverso do tempo de relaxação transversal T_2^{hom}.

A constante de tempo T_2 em modelos microscópicos surge de processos onde partículas próximas trocam seus spins via interação dipolar (processo spin-spin flip-flop). Isto conduz à propagação de magnetização através da rede, a qual é chamada de difusão de spin. Outra forma de troca de spins ocorre durante processos de colisões, onde momentos de spins são reorientados.

Em geral, T_2^{hom} pode ser considerado como um processo irreversível de perda de fase. Uma ilustração do alargamento das linhas é dada na Figura 10.

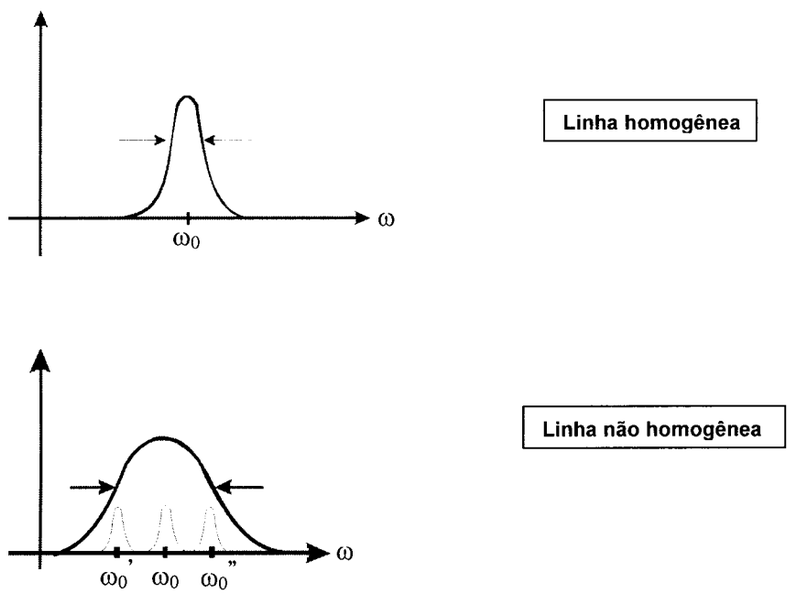


Figura 10: Ilustração da largura linha homogênea e não homogênea.

No caso das linhas alargadas não homogeneamente, pode-se dizer que os elétrons desemparelhados na amostra não experimentam o mesmo campo magnético local. Assim sendo, a linha observada é a soma das transições de ressonância dos vários pacotes de spins, os quais podem ser considerados como unidades pseudo-homogêneas e levemente deslocados. Geralmente, a linha resultante tem a forma Gaussiana.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Enquanto linhas homogêneas e não homogêneas podem parecer muito similares, existe uma diferença física fundamental entre elas, a qual é usada para diferenciá-las. A linha homogênea é saturada como um todo, enquanto uma linha não homogênea é saturada somente em parte, isto é, os pacotes de spins em ressonância saturam e criam um buraco na linha. Esse buraco possui uma largura que está relacionada com a largura da linha homogênea dos pacotes de spins individuais. A terminologia apropriada para o tempo de relaxação associado aos sólidos é denominada tempo de memória de fase, T_m.

I.1.6.2. Eco de spins

Imaginemos que uma amostra seja colocada no espectrômetro e esteja sujeita a um campo magnético estático H_0 orientado na direção z. Nessa situação um torque é exercido nos spins eletrônicos da amostra fazendo com que eles façam um movimento de precessão em torno do campo magnético com freqüência angular denominada freqüência de Larmor (ω_0). Os experimentos de RPE são usualmente executados incidindo uma radiação de microondas linearmente polarizada, a qual produz um campo magnético H_1, perpendicular ao campo magnético produzido pelo eletroímã H_0 (Figura 11).

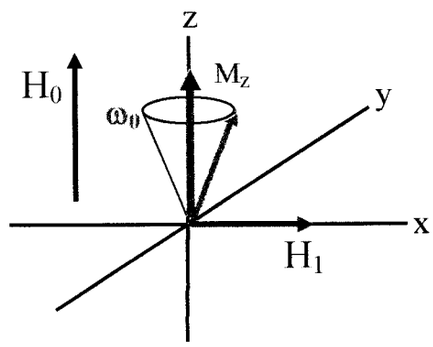


Figura 11: Ilustração do movimento dos spins desemparelhados em torno do campo magnético H_0 ao longo do eixo z. O campo magnético H_1 de microondas está orientado ao longo do eixo x e em ressonância oscila nessa direção com freqüência de Larmor.

A técnica de RPE pulsado consiste na medida do *free induction decay* (FID) "decaimento livre de indução" e do eco de spins que são gerados após a aplicação de pulsos de microonda de alta potência e curta duração (1kW, 10 ns). O FID é observado, depois da aplicação de um pulso de microondas ($\pi/2$), quando os spins eletrônicos interagindo entre si (interação spin-spin) perdem a magnetização no plano x-y (Figura 12). Esse tempo de decaimento do FID é denominado de "tempo de relaxação spin-spin" (T_2), e é de aproximadamente 50 ns. Porém, é inviável a medida do FID, pois o tempo morto do nosso espectrômetro é de 80 ns.

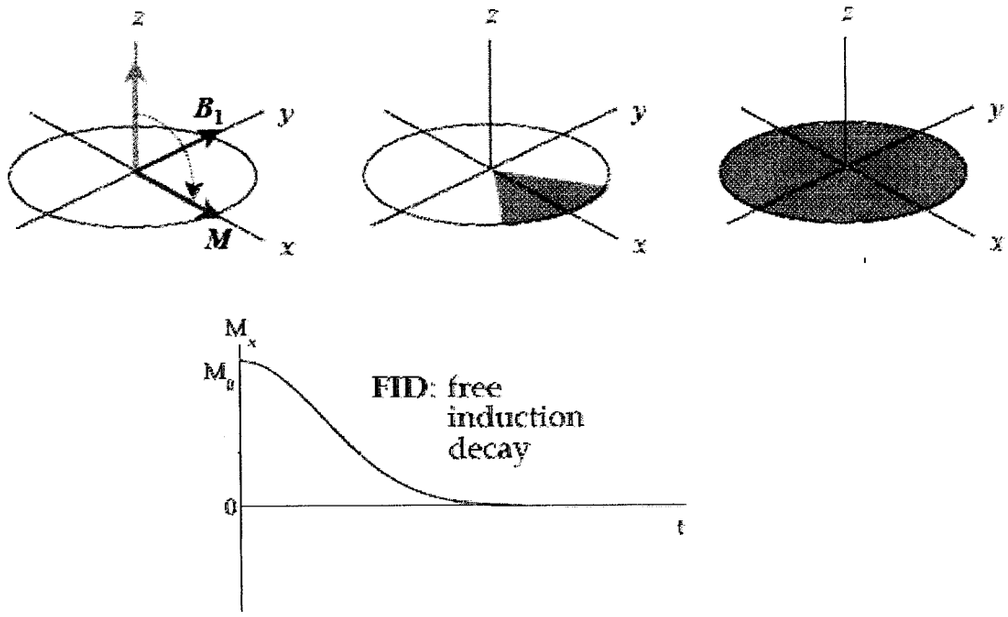


Figura 12: Ilustra a diminuição da magnetização transversal (T_2)

Já o eco de spins é gerado á partir de dois pulsos de microondas separados por um intervalo de tempo τ. É importante mencionar que o eco surge a uma distância 2τ do primeiro pulso. A Figura 13 ilustra o experimento.

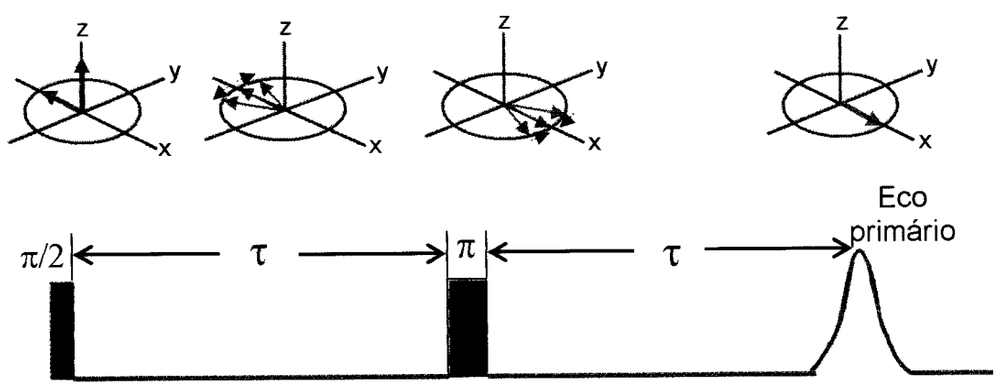


Figura 13: Ilustração da formação do eco primário

Inicialmente aplica-se um pulso de $\pi/2$ colocando os spins no eixo –x, logo após o primeiro pulso os spins defasam no plano x-y devido às interações spin-spin. O segundo pulso tem por objetivo apenas refletir a magnetização no plano transversal (-x para x). Como o sentido de precessão dos pacotes de spins não muda, a refocalização da magnetização dos pacotes de spins produz o eco primário.

O eco mede a magnetização dos spins em um dado tempo. Em geral, a intensidade do eco decai no tempo com o incremento dado na separação entre os pulsos. Nos casos mais simples, aumentando a distância entre os dois pulsos (τ) a intensidade do eco diminui exponencialmente, sendo esse decaimento denominado de "tempo de memória" ou T_m. Vale ressaltar que T_2 é o tempo de relaxação associado à largura de linha total, ou seja, contribuições homogêneas e não homogêneas, já T_m representa apenas a contribuição dos mecanismos irreversíveis.

O eco de spins foi descoberto em ressonância magnética nuclear por Hahn, daí a denominação eco Hahn. No seu primeiro trabalho (Hahn, 1950) ele já registrou a observação da modulação nuclear de ecos de spins refletida por acoplamento spin-spin entre diferentes núcleos. Esse assunto será abordado posteriormente na seção de ESEEM.

Algumas das vantagens na medida do eco de spins é a medida direta de T_m e T_1 (tempo de relaxação spin rede, descreve o retorno do alinhamento da magnetização com o eixo z) de espécies paramagnéticas, pois permitem separar os espectros individuais que aparecem sobrepostos no espectro CW e detectar radicais paramagnéticos livres de vida curta.

É importante observar que a programação de pulsos pode ser realizada por uma tabela de eventos que gera apenas seqüências de pulsos simples ou por uma linguagem específica, chamada *PulseSpel* no sistema da Bruker. A linguagem

preenche automaticamente as tabelas de pulsos simplificando a inserção de experimentos complexos.

I.1.6.3. Eco com Varredura de Campo (Echo Field Sweep)

O *echo field sweep* resulta da medida da intensidade do eco em função do campo magnético (Schweiger & Jeschke, 2001). Essa técnica possui aplicações nos casos em que a linha de absorção não é homogeneamente alargada e é mais larga que a largura espectral do pulso de microonda. Além disso, com a linha de ressonância é possível escolher as posições de campo apropriadas para medidas de T_m e T_1.

I.1.6.4. ESEEM

Em 1965, Rowan, Hahn e Mims (Rowan *et al.*, 1965) observaram que o decaimento do eco não era uma exponencial, mas caracterizava modulações superpostas com freqüências que correspondiam a freqüências nucleares e suas combinações (diferenças e somas). Mais tarde, em 1972, Mims (1972) desenvolveu uma teoria para o efeito da modulação nuclear, denominando-a de ESEEM "*electron spin echo envelope modulation*".

Espectroscopia de ESEEM é uma técnica de RPE pulsada que fornece informações acerca da estrutura dos ligantes em torno do centro paramagnético. Estas informações incluem os parâmetros de acoplamento magnético, a identidade dos ligantes, o número de núcleos envolvidos, as orientações relativas do sistema

de eixos principais do acoplamento elétron-núcleo que são fracas para serem resolvidas pelo RPE convencional CW. Em alguns casos, pode-se determinar o tensor de acoplamento quadrupolar do núcleo com relação aos eixos principais do tensor-g do centro paramagnético. Além disso, esse método possui algumas vantagens com respeito ao menor esforço técnico quando comparado com a técnica de ENDOR; uma detecção sensível das freqüências abaixo de 5 MHz, e a excitação de uma faixa larga de excitação de transições nucleares os quais simplificam o desenvolvimento de experimentos de correlação e a separação de interações. A única desvantagem é que a intensidade da modulação depende fortemente do acoplamento hiperfino ou superhiperfino.

ESEEM em banda X é bem conveniente para estudar o estado de spin baixo do ferro no heme, porque a magnitude da interação hiperfina para ambos ligantes nitrogênio pirrólicos e axiais em muitos complexos está dentro do intervalo sensível pela técnica. Além disso, simulações computacionais dos espectros baseadas na Hamiltoniana de spin que incorporam: interação de quadrupolo nuclear do nitrogênio, a qual é descrita por um parâmetro assimétrico η e por uma constante de acoplamento dada por, e^2Qq, sendo e a carga do elétron, Q o momento de quadrupolo escalar e q o gradiente do campo elétrico. Ambos dependem das características eletrônicas da valência do ^{14}N, e por fim a interação hiperfina anisotrópica, cujos parâmetros relevantes são a_{iso} (termo hiperfino isotrópico) e A_z, A_y e A_x (termos hiperfinos anisotrópicos). Todas essas interações podem fornecer parâmetros associados com a ligação sigma entre os nitrogênios proximais do imidazol e o átomo de ferro (Cornelius *et al.*, 1990; Magliozzo & Peisach, 1992).

A técnica de RPE pulsado, ESEEM, que sonda diretamente as interações entre elétrons desemparelhados e núcleos vizinhos de ligantes contendo ^{14}N vem sendo usada na investigação dos ligantes axiais em vários complexos de hemoproteínas no estado de spin baixo (Peisach *et al.*, 1979). As freqüências e as

intensidades das linhas nos espectros de ESEEM dependem da magnitude das interações Zeeman, hiperfina e quadrupolo, bem como do sistema de orientação dos eixos principais do tensor hiperfino e quadrupolo com respeito ao tensor *g*. É digno de nota que os nitrogênios distantes como do imidazol são difíceis de serem detectados porque eles são fracamente acoplados para contribuir em qualquer modulação (Magliozzo & Peisach, 1992).

I.1.6.4.1. ESEEM 2 pulsos

O ESEEM dois pulsos consiste em medir o decaimento do eco primário em função do espaçamento entre o primeiro e o segundo pulso, como está ilustrado na Figura 14. T_m é obtido ajustando o decaimento máximo do eco com uma função exponencial ou biexponencial, as quais podem indicar a existência de espécies paramagnéticas distintas. A transformada de Fourier da subtração do T_m com a função apropriada fornece o espectro de freqüência das modulações induzidas pelos núcleos vizinhos.

O experimento de ESEEM 2 pulsos possui a desvantagem dos espectros serem mais complicados devido à ocorrência de freqüências dobradas.

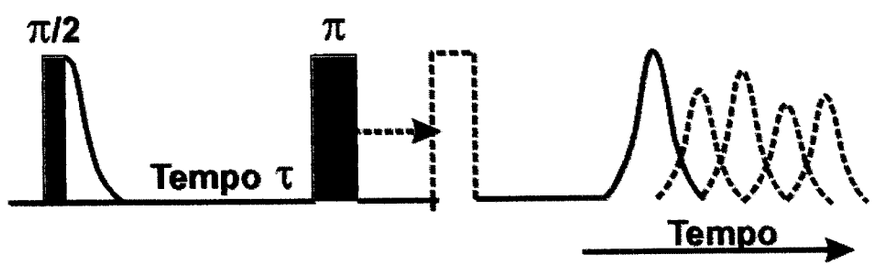


Figura 14: Ilustração de uma seqüência de ESEEM dois pulsos e o comportamento dos pacotes de spins durante a evolução do tempo τ.

1 I.1.6.4.2. ESEEM 3 pulsos

A modulação do eco também pode ser observada no eco estimulado originado pelo experimento de ESEEM três pulsos, quando o tempo entre os segundo e terceiro pulso é incrementado como está mostrado na Figura 15. O decaimento desta modulação origina linhas mais estreitas na transformada de Fourier e, portanto as transições de spins nucleares NMR são melhor resolvidas.

Visto que o eco estimulado é somente a metade do eco Hahn, a amplitude do ESEEM três pulsos também será metade do tamanho do ESEEM dois pulsos.

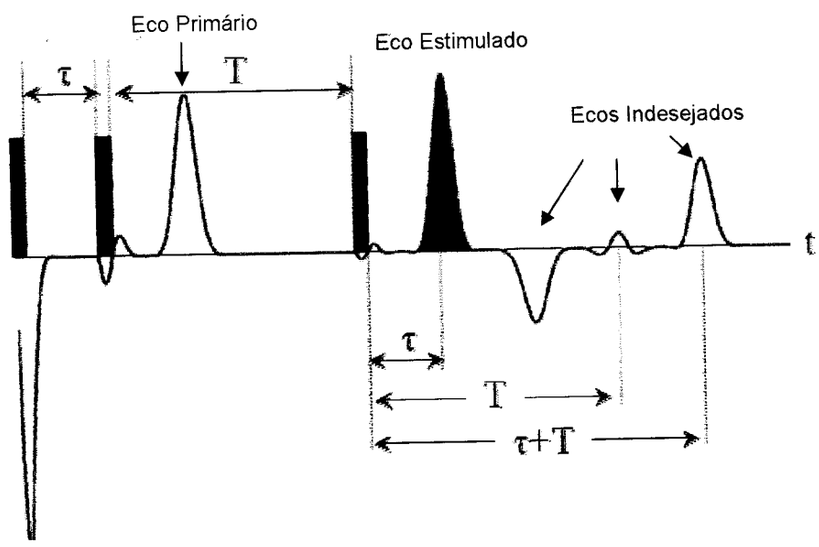


Figura 15: Ilustração de uma seqüência de ESEEM três pulsos separados por intervalo de tempo τ fixo e T incrementado. O eco estimulado é observado em um tempo τ depois do terceiro pulso de microonda.

O experimento de ESEEM três pulsos permite uma melhor aquisição das modulações e, por conseqüência, uma maior resolução nas linhas, porque as informações de fase induzidas na magnetização longitudinais se perdem com os processos de relaxação spin-rede, muito mais lentos, que aqueles relacionados à

relaxação transversal ou spin-spin. Além disso, não produz linhas adicionais com freqüências duplicadas. Dessa forma, diminui a superposição de linhas em baixa freqüência, principalmente em freqüência menores que 10 MHz, nas quais a largura das linhas é da ordem da separação entre a linha original e sua replica (Ribeiro, 2002).

I.1.6.6. Tempo de Relaxação Spin-rede T_1

O processo de relaxação envolve a emissão ou absorção de um quantum de energia pelo sistema de spin. Em todas as formas de espectroscopia existe pelo menos um processo de relaxação conectando dois ou mais níveis de energia que estão sendo excitados. Para o caso da ressonância magnética um dos processos de relaxação é chamado relaxação spin rede, T_1, o qual consiste na conversão da energia absorvida pelo sistema de spin em energia térmica dentro da amostra.

O estudo do processo de relaxação spin rede, em sólidos, fornece informações sobre a estrutura dos fônons na região da freqüência de RPE e a interação entre o spin eletrônico e as vibrações da rede.

Com o intuito de encontrar a relação entre o tempo de relaxação spin-rede, faremos uma descrição microscópica utilizando, em lugar de equações de Bloch, o método chamado "*rate equations*" (Kevan & Swartz, 1979).

Suponhamos um sistema de spin com dois níveis de energia *a* e *b*, sendo *a* o nível de mais baixa energia e *b* o nível de alta energia. As populações de equilíbrio nestes níveis N_a e N_b estão relacionados entre si pela Lei de Boltzmann $N_b/N_a=\exp(-\hbar\omega/kT)$. A diferença de população no equilíbrio é $n_e=N_a-N_b$. As

populações instantâneas dos dois níveis são chamadas de n_a e n_b, com diferença instantânea n_e. O número total de spins no sistema é $N = N_a + N_b = n_a + n_b$.

A probabilidade de transição na ausência de campo magnético de microonda entre os níveis a e b é W_{ab} e a razão inversa é W_{ba}. Para um sistema de spin em sólido cujos fônons e campos de radiação eletromagnética podem ser descritos pela temperatura T, a relação entre W_{ab} e W_{ba} é $W_{ba}/W_{ab} = \exp(\hbar\omega/kT)$ (Kevan & Swartz, 1979). A taxa de mudança nas populações nos níveis a e b é:

$$\frac{dn_a}{dt} = -\frac{dn_b}{dt} = -W_{ab}n_a + W_{ba}n_b \tag{10}$$

Esta equação pode ser reescrita de forma mais conveniente como se segue,

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dn_a}{dt} - \frac{dn_b}{dt} = 2(-W_{ab}n_a + W_{ba}n_b) \tag{11}$$

Como está demonstrado em Abragam & Bleaney (1970), obtemos a seguinte expressão:

$$\frac{dn}{dt} = (n_e - n_0)(W_{ab} + W_{ba}) \tag{12}$$

A resolução da equação diferencial para a diferença de população é:

$$n(t) = \left[n_0 - n_{(t=0)}\right]\exp-\left(\frac{t}{T_1}\right) \tag{13}$$

onde

$$T_1 = \left[W_{ab} + W_{ba}\right]^{-1} \tag{14}$$

Experimentalmente, o tempo de relaxação spin-rede, T_1, é obtido com a criação de uma população de spins não equilibrada ao longo do eixo z, e mede-se o decaimento no equilíbrio. A seqüência de pulsos utilizada para medir T_1 está ilustrada abaixo: (π)-τ-$(\pi/2)$-t-(π). Esse experimento é chamado "Inversão-Recuperação" e está ilustrado na Figura 16.

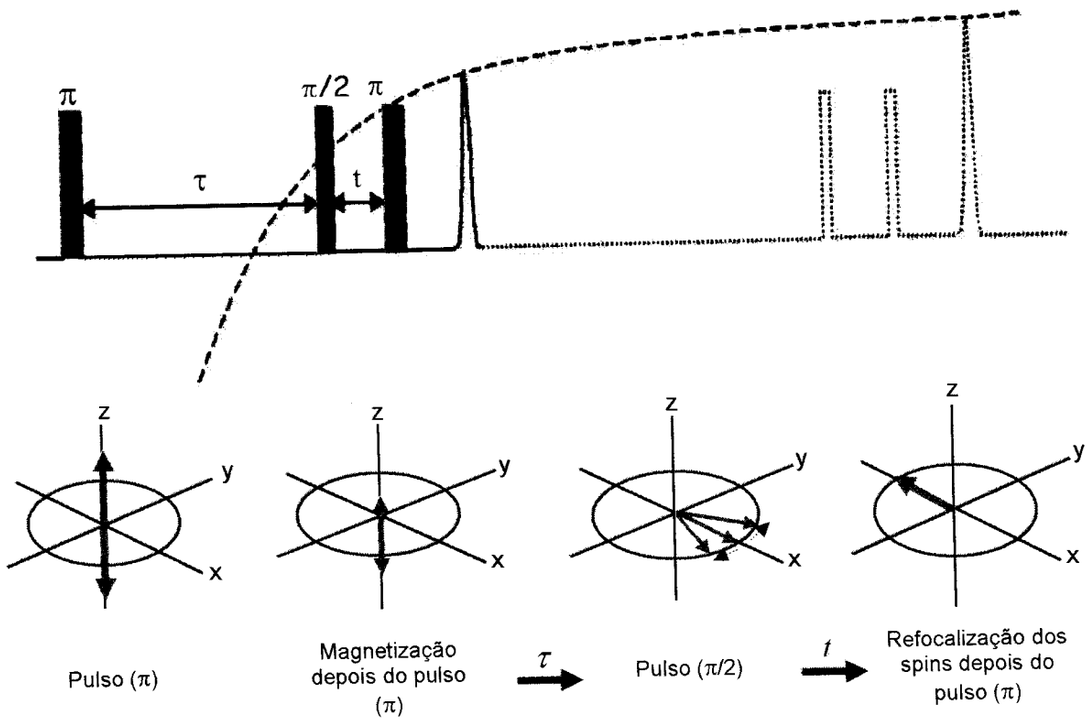


Figura 16: Ilustração do experimento de inversão-recuperação. T_1 é obtido com uma seqüência de três pulsos (π)-τ-$(\pi/2)$-t-(π), onde a amplitude do eco é medida em função de τ e o intervalo de tempo *t* entre o segundo e o terceiro pulso é mantido fixo (Ribeiro, 2002).

O objetivo do primeiro pulso π é inverter a magnetização longitudinal e criar uma população não equilibrada no eixo -z, entretanto, os spins tendem a voltar para o eixo z com tempo de relaxação T_1. Depois de um tempo τ aplica-se um pulso de

$\pi/2$ colocando os spins no eixo x, esses spins defasam no plano x-y devido às interações spin-spin. Após um tempo *t* aplica-se um outro pulso de π que inverte a magnetização para o eixo -x, como o sentido de precessão dos spins não muda ocorre a formação do eco. A amplitude do eco, a qual monitora a recuperação da população de spins no equilíbrio térmico, é medida em função de τ. Já o intervalo de tempo *t* entre o segundo e o terceiro pulso é mantido fixo. Considerando que o detector esteja no eixo x a amplitude inicial do eco é negativa.

Uma vez que a magnetização da amostra é conhecida, a determinação do tempo de relaxação spin rede não é muito difícil. É digno de nota que T_1 é extraído de um ajuste exponencial. Caso haja uma superposição de diferentes espécies na amostra a curva inversão-recuperação será ajustada por múltiplas exponenciais, indicando os vários processos de relaxação.

Processos de relaxação

Existem três processos mais importantes de relaxação spin-rede, nos quais as transições entre os estados são induzidas pelas vibrações da rede cristalina são eles: processo Direto, Raman e Orbach. A seguir faremos uma breve descrição de cada um.

Processo direto: consiste na absorção de um fóton de microondas para colocar o spin eletrônico no estado excitado E_2. Posteriormente, esse spin relaxa para o estado fundamental E_1 emitindo um fônon de mesma energia do fóton (Figura 17). Em baixas temperaturas (alguns graus Kelvin), o processo direto é dominante e prevê-se uma dependência do tempo de relaxação spin-rede T_1, em função do campo magnético externo H_0 e da temperatura T, da seguinte maneira:

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

$$T_1^{-1} \propto AH_0^2T \qquad (15)$$

Onde o fator A depende da forma do acoplamento spin-rede e independe da temperatura.

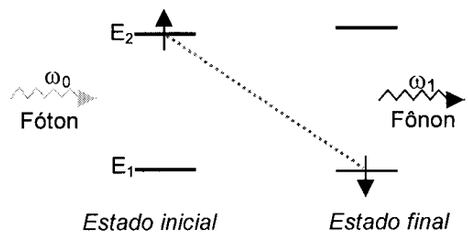


Figura 17: Representação esquemática do processo de relaxação direto (Abragam & Bleaney,1970).

Processo Raman: a Figura 18 apresenta o processo *Raman*, no qual o spin eletrônico absorve um fóton de microondas e passa para o estado excitado E_2. Esse spin eletrônico por sua vez absorve um fônon (ω_1), emitido pela vibração da rede, e passa para um estado virtual, se esse estado virtual não degenerado (íons não Kramers), o processo é chamado de processo Raman de primeira ordem. Caso o estado virtual é degenerado (íons Kramers) o processo é chamado de segunda ordem. Em seguida, esse spin relaxa para o estado fundamental E_1 emitindo um outro fônon (ω_2), de modo que $\omega_2 - \omega_1 = E_2 - E_1$. A razão pela qual ocorre uma transição virtual deve-se ao fato do estado virtual estar fora do contínuo de freqüências de fônons permitidas.

Nesse caso, a dependência de T_1 com a temperatura para o processo de primeira ordem é dada por:

$$T_1^{-1} \propto T^7 \tag{16}$$

Já o processo de segunda ordem a dependência de T_1 com a temperatura é dada por:

$$T_1^{-1} \propto T^9$$

O processo Raman domina o processo direto para todas as temperaturas exceto as mais baixas.

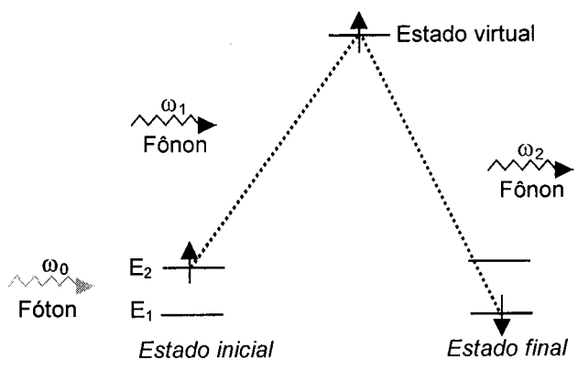


Figura 18: Representação esquemática do processo de relaxação Raman (Abragam & Bleaney,1970).

Processo Orbach: Nesse processo o centro paramagnético também absorve um fóton de microonda e passa para o estado excitado E_2. Porém, o spin passa para um estado real E_3, por absorção de um fônon ω_1, e decai para o estado E_1 por emissão de um fônon ω_2 (Figura 19). Este processo leva a uma dependência exponencial do tipo,

$$T_1^{-1} \propto e^{-(E_3-E_1)/T} \tag{17}$$

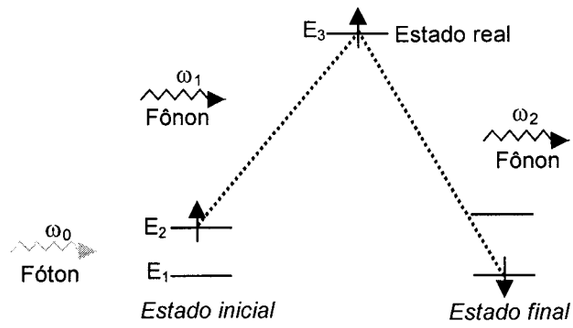


Figura 19: Representação esquemática do processo de relaxação Orbach (Abragam & Bleaney,1970).

CAPÍTULO I.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1. Preparação das Amostras

As soluções estoques das microperoxidases-8 e 9 (MP-8 e MP-9) ambas Sigma e *N*-AcMP-9 foram diluídas em água Milli Q.

A titulação da MP-8, *N*-AcMP-9 e MP-9 foi executada com amostras diluídas em tampões fosfato e carbonato 30 mM. O pH das soluções foram medidos com um medidor de pH Beckman 250.

A N-Acetylmetionina (Sigma) foi diluída em tampão fosfato 50 mM e o pH 7,4 acertado com NaOH.

O imidazol, obtido da Aldrich, foi diluído em água Milli Q e o pH acertado com ácido clorídrico concentrado.

I.2.2. Processo para N-acetilação da MP-9

O processo de *N*-acetilação consiste em bloquear os nitrogênios aminas como ligantes para o íon férrico. Para tanto, um hidrogênio, do grupo amina, é substituído por um grupo acetil (Carraway *et al.,* 1996), como está ilustrado na Figura 30.

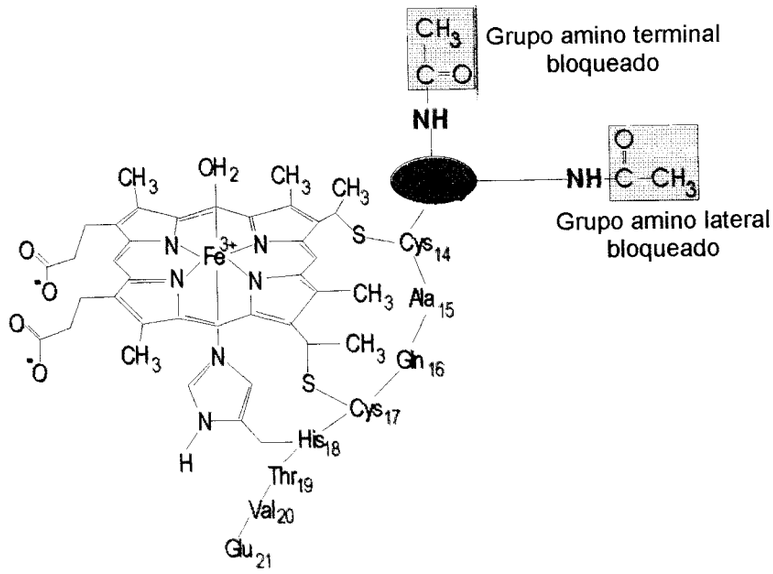


Figura 30: Representação esquemática da estrutura proposta para Microperoxidase-9 *N*-acetilada (*N*-AcMP-9). Os grupos dos aminoácidos que foram *N*-acetilados estão indicados nas caixas. A numeração dos aminoácidos refere à seqüência de aminoácidos do citocromo *c*, do qual a molécula é derivada.

N-AcMP-9 foi preparada usando MP-9, seguindo o método descrito previamente por Munro e colaboradores (1996). Acetilação foi executada dissolvendo (~ 3 mg) de MP-9 em 740 μL de tampão carbonato de sódio 0,2 M pH 9,3. A solução foi colocada a uma temperatura de 4 ^{0}C e injetamos gradativamente 500 molar de anidrido acético (Merck), agitando a solução durante todo período. Depois colocamo-la em um banho com temperatura igual a 30 ^{0}C por 3 horas. Em seguida, adicionamos lentamente sulfato de amônio saturado (43,47 g/100 ml de água) até atingir um volume de 1,5 ml. A solução foi colocada em uma centrifuga durante 40 min com 6000 rpm. Descartamos o sobrenadante e diluímos o precipitado em NaOH (~10^{-5} M) para corrigir o pH, visto que a produção de ácido acético durante a acetilação muda o pH para aproximadamente 4. A solução foi então novamente centrifugada com o objetivo de certificar se todo o precipitado havia sido dissolvido. Retiramos o sal da solução em uma célula Ultrafiltration (25 mL) usando uma membrana YM1 Millipore.

A concentração da *N*-AcMP9 foi medida espectroscopicamente usando ε_{397} = 1.56 x 10^5 M^{-1} cm^{-1}.

I.2.3. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

As medidas de HPLC foram executadas em uma coluna analítica *watters* C_{18} (250 x 4,6 mm) usando um HPLC-2800 BioRad. 20 μL de amostra foram injetados na coluna em equilíbrio uma composição inicial de 80 % de tampão fosfato (A) 50 mM pH 6,75. A eluição foi efetuada em 1 mL min^{-1} com o gradiente linear em 30 % (A) and 70 % acetonitrila (B) em t = 25 min. Este gradiente se manteve durante 4 min, em seguida retornamos a condição inicial.

I.2.4. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-Vis

Nesta etapa, os espectros de absorção eletrônica UV-Vis foram obtidos na região 200 a 800 nm, em temperatura ambiente, utilizando um espectrofotômetro Multispec – 1501 – Shimadzu.

I.2.5. Dicroísmo Circular (CD)

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos na região 300-500 nm, a temperatura ambiente, utilizando um espectropolarímetro Jasco J-720. Em todos os espectros de CD foram subtraídas as linhas de bases respectivas. Para analisar os espectros de CD utilizamos o método "*convex constraint analysis*" (CCA) proposto por Perczel e colaboradores (1992).

I.2.6. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) CW e Pulsada

O espectrômetro (CW e pulsado) é controlado por um computador do tipo *Workstation Silicon Graphics* O_2, em ambiente UNIX.

As medidas de RPE foram realizadas no espectrômetro Bruker-ELEXSYS que opera tanto em modo de onda contínua (CW) quanto pulsada (PW) e equipado com ponte de microonda em banda X (9,5 GHz). Para as medidas desse trabalho utilizamos uma cavidade retangular (CW) e uma cilíndrica (PW). O controle de temperatura foi realizado através do sistema criogênico Oxford, modelo ITC503, que permitiu a realização de experimentos a temperaturas da ordem de até 4 K.

Em todos os experimentos, as amostras foram colocadas em um tubo de quartzo, congeladas previamente em um "dewar" contendo nitrogênio líquido e somente então usadas nas medidas de RPE. É importante mencionar que a linha de base contendo somente o tampão de cada pH foi registrada e subtraída dos espectros de MP-8, *N*-AcMP-9 and MP-9. Os parâmetros experimentais foram: freqüência de microonda, 9,5 GHz, potência da microonda, 8 mW, varredura do campo magnético, 40-540 mT, e amplitude de modulação, 1 mT.

Os espectros de RPE foram analisados usando o programa QPOW (Belford & Nilges, 1979; Maurice, 1979) para estimar o número de espécies no equilíbrio como função do pH. Este programa é amplamente usado para simular espectros de RPE e inclui ambas as formas de linha Gaussiana e Lorentziana.

I.2.7. Simulação de MD

Simulação de *molecular dynamics* (MD) da MP9 em água (Berendsen *et al.*, 1981; Ferguson, 1995) foi executada usando o programa GROMACS (Lindahl *et al.*, 2001), com campo de força GROMOS96 (Van Gunsteren *et al.*, 1996). As coordenadas iniciais para MP-9 foram obtidas do fragmento correspondente da estrutura do citocromo c 1AKK, do banco de dados de proteínas. O potencial eletrostático de longo alcance foi calculado através do método *reaction field* (Gargallo *et al.*, 2000) com ε=54 e 14 Å de raio de corte. Para o potencial de curto alcance o raio de corte utilizado foi 12 Å. Temperatura e pressão foram mantidas constantes em 295 K e 1 bar usando o algoritmo de acoplamento de calor e pressão proposto por Berendsen (1984). Uma simulação típica da molécula de MP-9, utilizando as coordenadas iniciais incluindo para microperoxidase no estado protonado, tem cerca de 3800 moléculas de água e poucos íons de Na^+ para manter a carga líquida do sistema nula. Diferentes corridas do programa de cálculo foram levadas a efeito usando a MP-9 tanto com o grupo N-terminal da Lys13 e o grupo ε-amino nas condições protonado e desprotonado. Este cálculo foi realizado por Dr. Cláudio S. Shida da Universidade de Mogi das Cruzes, SP.

CAPÍTULO I.3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

I.3.1. – Acetylação da MP9

A Figura 21 mostra a análise por HPLC da *N*-AcMP-9 obtidos em pH 6,75 usando o método proposto por Munro & Marques (1996), o qual está descrito na sessão I.3.2. Observa-se na Figura 21 (a) a presença de duas espécies, uma com tempo de retenção em 9,7 min atribuída a conversão de MP-9 para *N*-AcMP-9 (86,3 %), e a outra espécie com tempo de retenção em 11 min, a qual é conferida à MP-9 não acetilada (16,7 %). A curva (b) ilustra a análise por HPLC da MP-9 original.

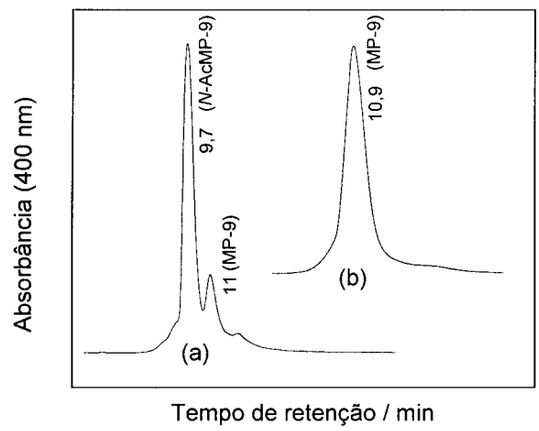


Figura 21: (a) Análise por HPLC em pH 6,75 da amostra *N*-AcMP-9 (83,3 %) produzida usando o método descrito por Munro & Marques (1996). O produto com retenção em 11 min é atribuído a MP-9 que não foi *N*-acetilada (16,7 %). (b) Análise por HPLC da MP-9 obtida da sigma em pH 6,75.

I.3.2. Espectroscopia de Absorção Eletrônica: UV-Vis

Os espectros de UV-Vis da MP-8 em soluções tamponadas em diversos pHs está mostrado na Figura 22. Observa-se uma diminuição (hipocromismo) da banda Soret (λ_{max} ~ 397 nm) acompanhada pelo aumento (hipercromismo) da banda N (~ 340 nm) quando o pH é aumentado de 7 para 12.

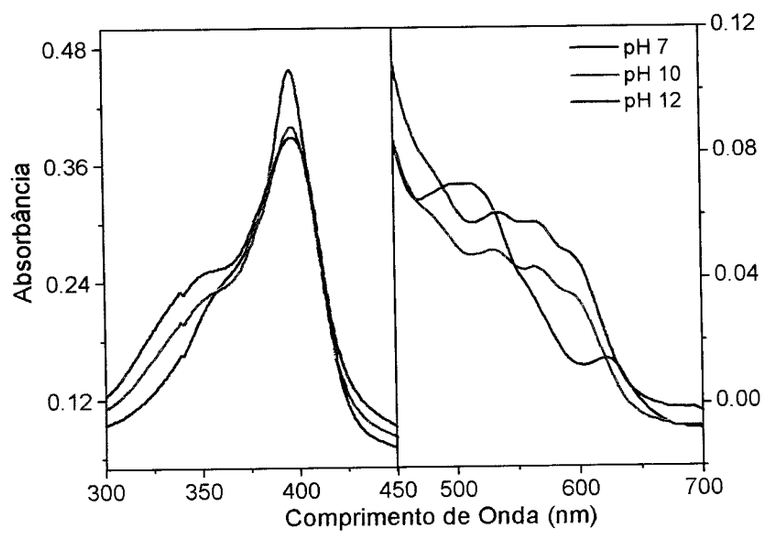


Figura 22: Espectros de UV-Vis da MP-8 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha), pH 12 (linha azul), em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM) a temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

As medidas foram executadas utilizando altas concentrações, com o intuito de promover uma agregação mais intensa. As mudanças espectrais são consistentes com a agregação da molécula MP-8, a qual pode ser atribuída a coordenação inter-cadeia entre o ferro hemínico de uma MP-8 e o grupo amino

terminal da cisteína de uma MP-8 vizinha. Nesse caso, o grupo amino da MP-8 vizinha desloca a molécula de água da sexta coordenação que se encontra em valores de pH baixo. A mudança do sexto ligante do ferro produzida pelo aumento de pH causará a conversão do ferro hemínico do estado de spin alto para o estado spin baixo.

Uma outra evidência da alteração nos ligantes axiais do ferro em pHs altos é observada através de mudanças espectrais das bandas na região visível. Nesse caso, as bandas Q e de transferência de carga (CT) com picos em torno de 540 e 620 nm, respectivamente, são deslocadas para o vermelho (conversão do estado de spin 5/2 para spin ½). Para *N*-AcMP-8, em pH alto, a conversão do estado de spin alto para spin baixo ocorre devido a desprotonação da molécula de água, a qual está localizada na sexta coordenação do ferro hemínico (Munro & Marques, 1996).

Ao contrário da *N*-AcMP-8, o equilíbrio entre S = 5/2 e S = ½, observados em torno de pH 10 para MP-8 (Figura 22), deve ser favorecido pelo deslocamento da água, como sexto ligante, pelo grupo amino terminal desprotonado da cisteína da MP-8 vizinha. Esta proposta está consiste com o hipercromismo da banda N e hipocromismo da banda Soret, ambas indicando a agregação da MP-8 (Urry & Pettegrew, 1967). As mudanças espectrais de pH 10 para 12 também sugerem que a MP-8 está agregada. Além disso, nessas condições, se observa um claro aparecimento da ligação de OH^- na sexta coordenação, a qual é caracterizada pelas quatro bandas na região do espectro acima de 450 nm.

Procurando investigar o possível estado de agregação da MP-8 em pH 12, a Figura 23 ilustra espectros de UV-Vis da MP-8 em diferentes concentrações: 0,5 μM (linha preta), 10 μM (linha vermelha), 25 μM (linha verde) e 50 μM (linha azul). O espectro em 0,5 μM corresponde à forma monomérica da MP-8, exibindo OH^- na sexta coordenação do ferro hemínico. Esta proposta está apoiada no fato de que

em pH 12, a lei de Beer é obedecida somente até 0,75 μM (inserção da Figura 23). Acima de 0,75 μM, observa-se a violação da lei de Beer, comprovando que a MP-8 em concentrações mais altas encontra-se na forma de agregados. Além disso, em pH 12, o deslocamento para o azul da banda Soret com o aumento da concentração, sugere que o estado de spin alto também foi favorecido em condições semelhantes.

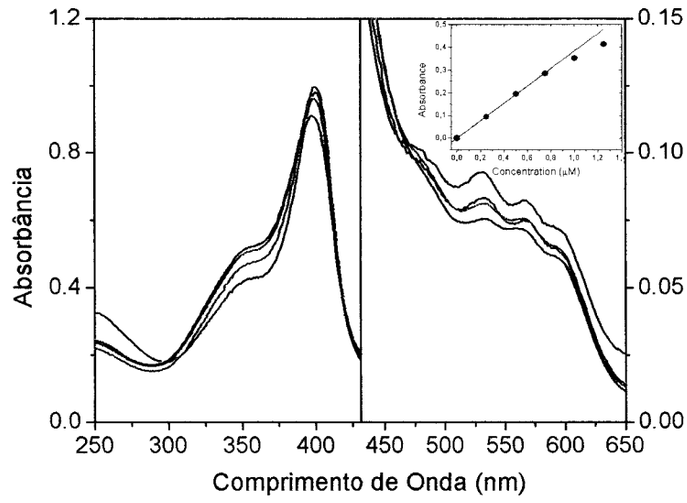


Figura 23: Espectros de UV-Vis da MP-8 em diferentes concentrações: 0,5 μM (linha preta), 10 μM (linha vermelha), 25 μM (linha verde) e 50 μM (linha azul). A inserção mostra a dependência da concentração (0 a 1,25 μM) na intensidade da banda Soret (401 nm) obtido em pH 12. O ajuste linear ilustra a violação da lei de Beer a partir de 0,75 μM. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

A Figura 24 ilustra os espectros da *N*-AcMP-9 em soluções tamponadas em diversos pHs à temperatura ambiente. Nota-se que conforme o pH é aumentado, um deslocamento da banda Soret para o vermelho e o desaparecimento gradativo da banda em 620 nm, banda essa que é característica do estado de spin alto do ferro hemínico (Owens *et al.*, 1988). É digno de nota que as mudanças nos espectros de UV-Vis para *N*-AcMP-9 são similares àquelas descritas para *N*-AcMP-

8 (Munro & Marques, 1996), onde a conversão do estado de spin alto para o estado de spin baixo ocorre sem agregação das moléculas.

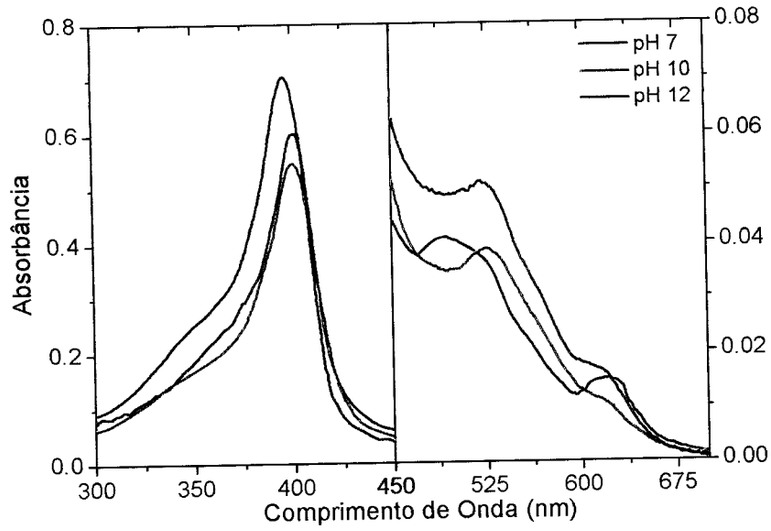


Figura 24: Espectros de UV-Vis da *N*-AcMP-9 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha), pH 12 (linha azul), em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM) a temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

A Figura 25 mostra os espectros de UV-Vis da MP-9 não N-acetilada em soluções tamponadas em diversos pHs. Nota-se, conforme o pH é acrescido, um deslocamento da banda Soret para o vermelho ($\lambda_{max,pH7}$ = 398 nm, $\lambda_{max,pH12}$ = 406,5 nm) e o desaparecimento da banda em 620 nm (característica de S = 5/2), associadas com a intensificação da bandas Q_o (~ 573 nm) e Q_v (~ 535 nm). Essas mudanças eletrônicas são compatíveis com a conversão do estado de spin alto para o spin baixo. Entretanto, a diminuição (hipocromismo) da banda N e o aumento (hipercromismo) da banda Soret são indicativos do estado de não agregação da MP-9 em valores de pH altos, diferentemente da MP-8 nas mesmas condições (Figura 22).

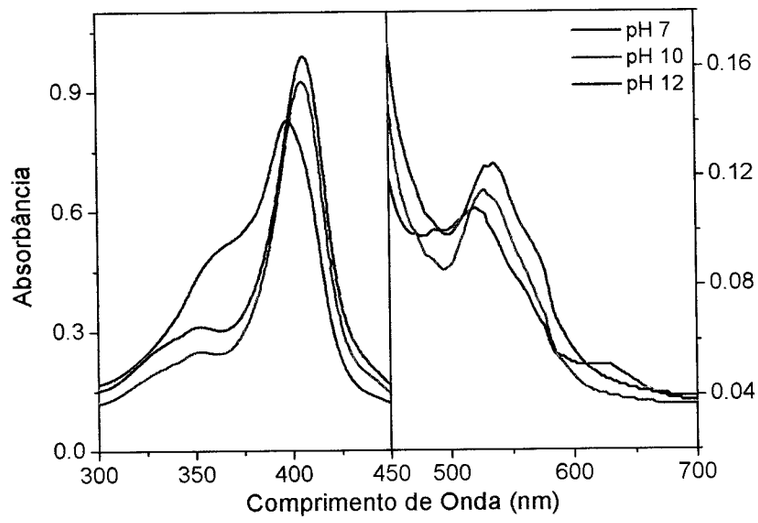


Figura 25: Espectros de UV-Vis da MP-9 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha), pH 12 (linha azul), em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM) a temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

Para a *N*-AcMP-8 (Munro & Marques, 1996) e *N*-AcMP-9, em pH próximo de 10, o estado spin baixo é obtido somente pela presença de OH^- na sexta coordenação do ferro, e consequentemente não exibe agregação. No caso da MP-9, considerando que os grupos ε- e α-amino da Lys13 estão disponíveis para coordenação em valores altos de pH, um estado de spin baixo (não agregado) somente poderia ser obtido pela coordenação intra-cadeia, ou seja, o grupo ε-amino da cadeia lateral da lisina ocupando a sexta coordenação do ferro hemínico.

Objetivando investigar a possível coordenação intra-cadeia pelo grupo ε-amino da Lys13, a Figura 26 mostra espectros de UV-Vis da MP-9 em função da concentração: 0,5 μM (linha preta) e 50 μM (linha vermelha) em tampão fosfato pH 7. Com o aumento da concentração de 0,5 μM para 50 μM verifica-se o surgimento da banda N (340 nm) e a diminuição da intensidade da banda Soret, mudanças essas que são características do estado de agregação da MP-9 em pH 7. A

inserção da Figura 26 também comprova que a MP-9 está agregada em pH 7 com violação da lei de Beer.

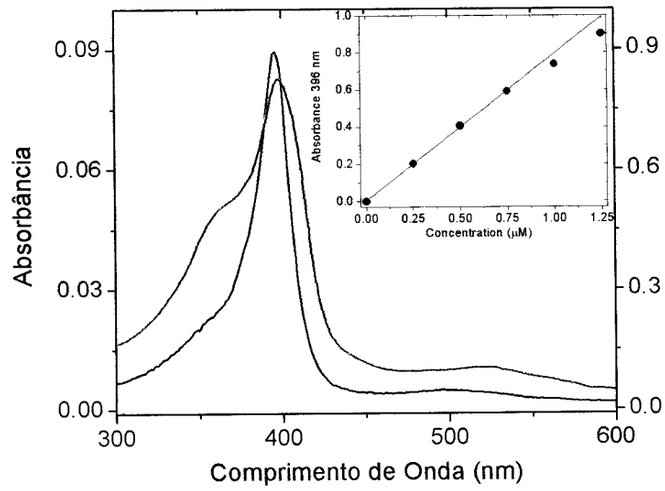


Figura 26: Espectros de UV-Vis da MP-9 obtido com 0,5 μM (linha preta) e 50 μM (linha vermelha) em tampão fosfato (30 mM) pH 7, a temperatura ambiente. A inserção mostra a dependência da concentração (0 a 1,25 μM) na intensidade da banda Soret (396 nm). Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

Continuando a investigação da coordenação intra-cadeia pelo grupo ε-amino da Lys13 da MP-9, fizemos novamente o experimento da Figura 26, mas agora em pH 10 (Figura 27). Nota-se espectros quase idênticos para MP-9 em função da concentração em pH 10, sem a ocorrência da banda N e hipercromismo da banda Soret. Além disso, diferentemente da MP-8, a MP-9 não exibiu desvios na lei de Beer (inserção Figura 27), sugerindo que em pH 10 a MP-9 não está no estado agregado.

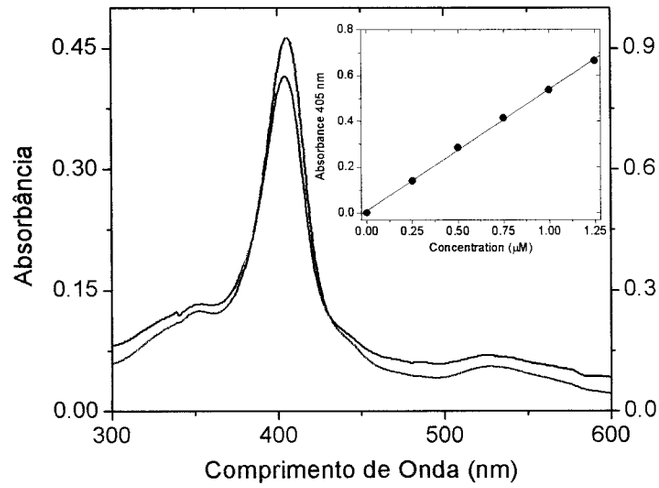


Figura 27: Espectros de UV-Vis da MP-9 obtido com 0,5 μM (linha preta) e 50 μM (linha vermelha) em tampão carbonato de sódio pH 10. A inserção mostra a dependência da concentração (0 a 1,25 μM) na intensidade da banda Soret (405 nm). Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

Considerando que a MP-9 pode exibir coordenação intra-cadeia, diferentes estruturas de MPs foram esperadas para estados de spin baixo em valores altos de pH, e serão investigadas pela técnica de dicroísmo circular (CD).

I.3.3. Dicroísmo Circular (CD)

Na Figura 28 estão representados os espectros de dicroísmo circular (CD) da MP-8 em solução tamponadas em diversos pHs à temperatura ambiente. Em pH 7 e 10, os espectros possuem efeitos Cotton positivo e negativo. Já em pH 12, duas bandas positivas sobrepõem-se compondo o espectro de CD. É importante mencionar que os espectros foram medidos variando-se o pH entre 6 a 13 de 0,5 em 0,5 (resultados não mostrados).

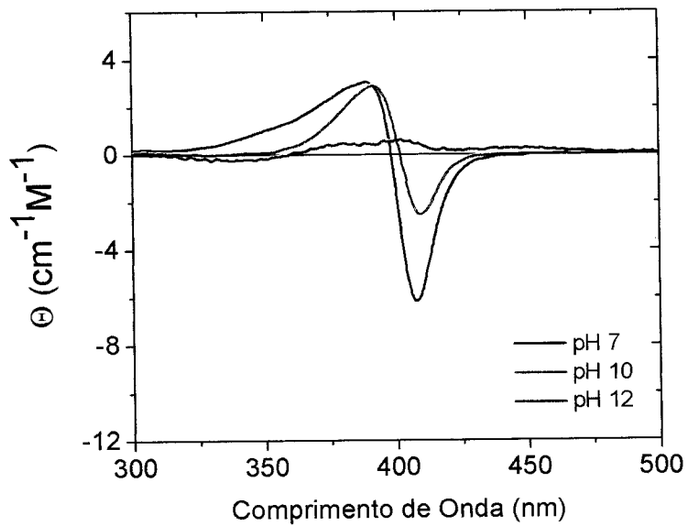


Figura 28: Espectros de CD da MP-8 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha) e pH 12 (linha azul) em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM), a temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

Quanto aos espectros de CD da *N*-AcMP-9, esses exibiram funções aproximadamente Gaussianas em todo o intervalo de pH investigado (Figura 29). Com o aumento do pH observou-se um deslocamento para o vermelho da banda Soret.

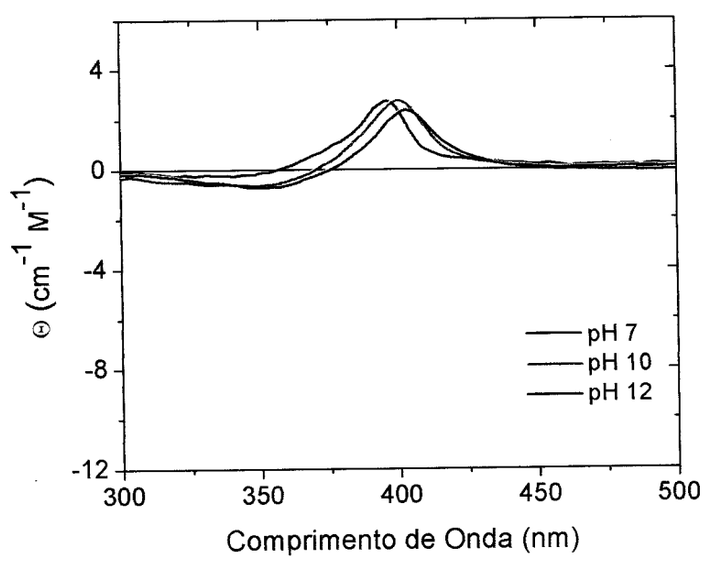


Figura 29: Espectros de CD da *N*-AcMP-9 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha) e pH 12 (linha azul) em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM), à temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm.

A Figura 30 ilustra os espectros de CD da MP-9. Em pH 7, o espectro de CD é similar ao obtido para MP-8 (Figura 28). Tanto os espectros de CD e UV-Vis da MP-9, obtidos em pH 7, sugerem que agregados similares podem estar presentes nestas condições. Entretanto, em valores de pH mais alto, os espectros de CD da MP-9 diferem dramaticamente daqueles exibidos pela MP-8.

Os espectros de dicroísmo circular de hemoproteínas na região 400 nm são fortemente dependentes das vizinhanças do heme produzidas pelo peptídeo a ele associado (Blauer *et al.*, 1993). Para o citocromo *c* o sinal em 420 nm está relacionado à coordenação do ferro com o enxofre da Met-80 (Nantes *et al.*, 2001; Zucchi *et al.*, 2003). Logo, para microperoxidases este sinal reflete o sexto ligante do ferro. Em estudos prévios, interações da MP-8 têm sido correlacionada com um aumento na complexidade do efeito Soret/Cotton nessa região (Urry & Pettegrew, 1967).

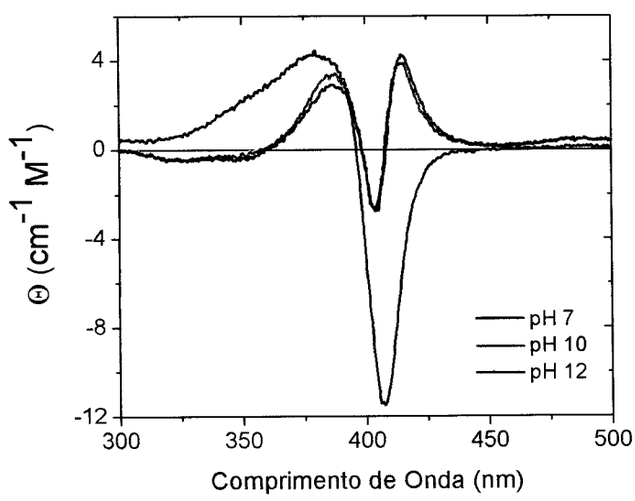


Figura 30: Espectros de CD da MP-9 (50 μM) obtido em pH 7 (linha preta), pH 10 (linha vermelha) e pH 12 (linha azul) em tampão fosfato e carbonato de sódio (30 mM), à temperatura ambiente. Utilizou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1mm.

Considerando que os espectros de CD das microperoxidases obtidos em diferentes valores de pH é uma mistura de espectros, foi necessário executar uma

decomposição dos mesmos para obtermos os espectros de CD das diferentes contribuições de espécies (ver Materiais e Métodos). A Figura 31 (quadro esquerdo) mostra três espectros de CD calculados de acordo com a equação 9. Estes são os espectros que contribuíram em diferentes proporções para a combinação dos espectros de CD da MP-8 entre o intervalo de pH 6-13, e estão presentes no quadro esquerdo para valores de pH 7, 10 e 12 (f_i). O quadro direito da Fig. 31 mostra as contribuições relativas (C_{ij}) espectrais calculadas das três espécies da MP-8 obtidas em diferentes valores de pH com um intervalo de 0,5 unidades.

Na faixa de pH 6 a 7,5 ocorreu uma combinação dos espectros experimentais resultando em aproximadamente 65 % de espécies I (Fig. 31, linha preta) e aproximadamente 35 % de espécies II (Fig. 31, linha vermelha). Vale mencionar que na decomposição ocorreu um erro de aproximadamente 5 %. O espectro de CD calculado para a espécie I assemelha-se com o espectro de CD da MP-8 (1,7 mM) agregada (pH 7) com máximos (efeito Cotton positivo e negativo) nos comprimentos de onda 382 e 408 nm, respectivamente (Urry & Pettegrew, 1967). Este sinal é interpretado por Urry *et al.,* (1967) como agregação da MP-8 devido às interações entre as porfirinas do heme na conformação de empilhamento.

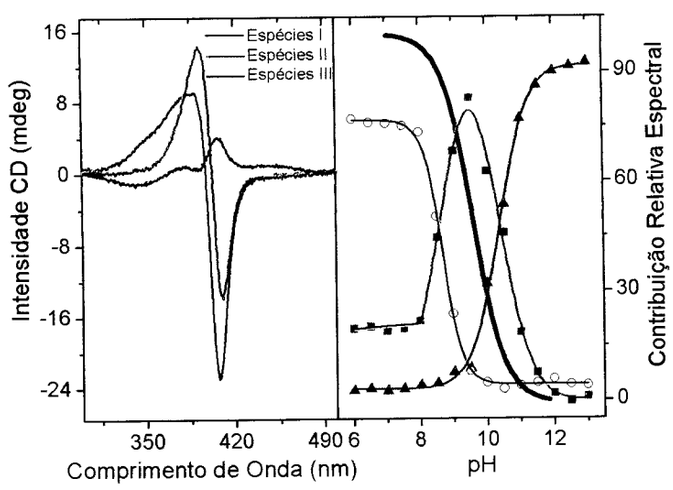


Figura 31: Espectros das espécies da MP-8 envolvidas no equilíbrio (quadro esquerdo). Contribuições relativas espectrais das espécies em função do pH (quadro direito). Linha preta grossa (quadro direito) representa a curva de titulação de pH da *N*-AcMP-8 (Munro & Marques,1996).

Quanto à espécie II da MP-8 que obteve a máxima contribuição espectral em aproximadamente pH 9,5, não assemelhou-se com qualquer espectro de CD da MP-8 agregada (Urry & Pettegrew, 1967) em pH 7. Esta espécie II deve resultar da coordenação do grupo N-terminal desprotonado de uma MP-8 vizinha com o ferro hemínico de outra MP-8. A curva de pH para o desaparecimento da espécie I vai em paralelo, mas não equiparada (pK_a diferentes) com a curva da *N*-AcMP-8 (linha preta grossa, quadro direito). A curva de pH da *N*-AcMP-8 revela a conversão do estado de spin alto para spin baixo devido à desprotonação da água posicionada na sexta coordenação. Isto sugere que uma conversão similar deve estar ocorrendo, mas exibindo diferentes valores de pK_a (8,53 e 9,50, respectivamente) já que o sexto ligante do ferro que desloca uma molécula de água é diferente. O pK_a = 8,53 é mais baixo do que o esperado para o grupo α-amino da cisteína (o grupo *N*-terminal da MP-8), o qual é 10,28 (Nelson & Cox, 2000). A redução dos valores intrínsecos do pK_a para a coordenação do grupo amino era esperado uma vez que o íon (Fe^{3+}) compete com os prótons para este grupo.

A segunda transição alcalina com pK_a = 10,37 corresponde à conversão da espécie II da MP-8 para espécie III, na qual provavelmente o grupo *N*-terminal da cisteína na sexta coordenação do ferro foi deslocado pelo grupo OH^-. Neste caso, uma proporção maior da MP-8 na forma de monômeros poderia ser esperada. Porém, estudos anteriores demonstraram que agregados de MP-8 (Urry & Pettegrew, 1967) e MP-11 (Urry, 1967) formaram-se em torno de pH 7 e apresentam bandas de CD complexas e largas, enquanto sua forma monomérica exibe bandas simples de amplitudes menores. A Fig. 31 mostra, no quadro esquerdo que as espécies III exibiram um espectro com uma simples Gaussiana com um pico em torno de 406 nm, o que poderia indicar a ausência de agregados. Entretanto, o espectro de UV-Vis das espécies III indicou que os agregados estão

presentes, visto que o hipocromismo da banda Soret e o hipercromismo da banda N ocorreram nessas condições.

A Fig. 32 mostra a decomposição dos espectros de CD da *N*-AcMP-9 obtidos no pH 6-13. O espectro predominante de CD entre a variação de pH 6-9 (linha preta) deve corresponder a *N*-AcMP-9 na forma monomérica e no estado de spin alto, uma vez que o espectro da espécie I da *N*-AcMP-9 aproxima-se de uma função Gaussiana com pico em 397 nm. Já a espécie II deve ter na sexta coordenação do ferro hemínico um grupo OH^- (linha vermelha). É interessante que o valor do pK_a = 9,6 obtido para a conversão das espécies na *N*-AcMP-9 é o mesmo determinado para a conversão de espécies equivalentes da *N*-AcMP-8 (Munro & Marques, 1996).

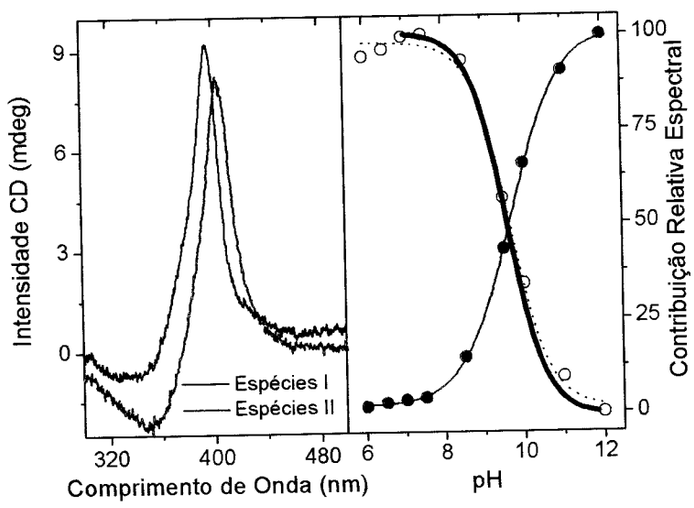


Figura 32: Espectros das espécies da N-AcMP-9 envolvidas no equilíbrio (quadro esquerdo). Contribuições relativas espectrais das espécies em função do pH (quadro direito). Linha preta grossa representa a curva de titulação de pH da N-AcMP-8 (Munro & Marques, 1996).

A Figura 33 ilustra a decomposição dos espectros de CD da MP-9 obtidos no intervalo de pH 6-13. No quadro esquerdo da Figura 33 estão mostrados os espectros de CD das cinco espécies da MP-9, calculados de acordo com a equação 9, que contribuem em diferentes proporções para a composição dos espectros de

CD. O quadro direito mostra a contribuição espectral relativa das cinco espécies nos diferentes valores de pH.

Em pH 6, os espectros experimentais da MP-9 resultaram em quase 100% de espécie I (Figura 33 linha preta). Esta espécie exibiu um espectro com efeito Cotton com bandas em 378 e 407 nm, e pode ser atribuída à água ocupando a sexta coordenação do ferro hemínico. A conversão da espécie I em II ocorreu em pK_a = 7. Como o grupo N-terminal α-amino da Lys da MP-9 exibe um pK_a = 8,95 intrínseco, é razoável considerar que a espécie II pode ser formada quando a molécula de água é deslocada pelo grupo *N*-terminal de uma MP-9 vizinha. Neste caso o pK_a deve diminuir devido à proximidade com o íon metálico.

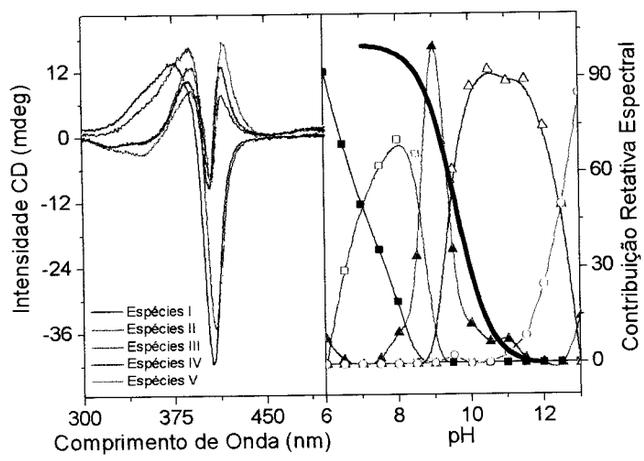


Figura 33: Espectros das espécies da MP-9 envolvidas no equilíbrio (quadro esquerdo). Contribuições relativas espectrais das espécies em função do pH (quadro direito). Linha preta grossa representa a curva de titulação de pH da *N*-AcMP-8 (Munro & Marques, 1996).

Um espectro complexo de CD acompanhou a conversão da espécie II para III da MP-9. O espectro da espécie III (Figura 33, linha verde) resultou do aumento da contribuição das bandas positivas em torno de 410 nm. A análise do espectro de

UV-Vis (Fig. 25) sugere que a espécie III não está na forma agregada, visto que, a banda N quase desapareceu e a banda Soret exibiu um hipercromismo. O pK_a = 8,5 obtido para transições das espécies II e III está de acordo com a diminuição do valor do pK_a 10,53 para o grupo ε-amino da Lys. Desse modo, a espécie III pode ter o grupo amino lateral (ε-amino) da Lys como sexto ligante do ferro hemínico. Assim sendo, a ausência de agregação pode ser explicada somente pela coordenação intra-cadeia.

Uma nova espécie (espécie IV) surge predominantemente acima de pH = 9,4 (Figura 33, linha azul). Este valor está próximo do pK_a para a desprotonação da água (Figura 33, linha sólida grossa), sugerindo a presença do OH^- como um ligante nestas espécies. Acima do pH 12,5, foi registrada uma quinta espécie (Figura 30, linha rosa) para MP-9. Essa espécie pode envolver a presença de um histidinato como o quinto ligante, uma vez que este valor de pK_a é igual ao previamente registrado para a histidina coordenada com o Co(II) (Munro & Marques, 1996). Além disso, o pK_a está próximo do determinado para espécie similar da *N*-AcMP-8.

Se a suposição de que a espécie III da MP-9 foi formada pelo estabelecimento da coordenação intra-cadeia está correta, pode-se presumir que a influência da concentração na agregação da MP-9 deveria ser diminuída pelo aumento de pH 7 (pH mais favorável para espécie II) para pH 9 (pH mais favorável para espécie III). Procurando investigar tal afirmação, monitorou-se através da técnica de UV-Vis a intensidade da banda N (357 nm) em função da concentração (Fig. 34). Vale relembrar que essa banda é atribuída à agregação. Na Fig. 35 é possível observar que a formação da MP-9 agregada aumenta a banda N em 357 nm com o aumento da concentração da MP-9, exibindo uma inclinação 35 % mais baixa daquela obtida em pH 9. Como já era esperado, esse resultado mostra que o grupo N-terminal da Lys vizinha da MP-9 não consegue deslocar o ligante intra-

cadeia (grupo ε-amino Lys13), que é o ligante do ferro competidor em pH 9. Em pH 7,6 a molécula de água é o ligante mais disponível para a sexta coordenação do ferro hemínico. O aumento da banda N no espectro de UV-Vis da MP-9 em altas concentrações sugeriu um aumento da razão espécies II/III nestas condições. Os espectros de CD inseridos na Fig. 34, obtidos em pH 9, mostram claramente que o aumento da concentração da MP-9 concomitantemente exibiu uma contribuição mais significativa da espécie II da MP-9 (compare com Fig. 30 e 33).

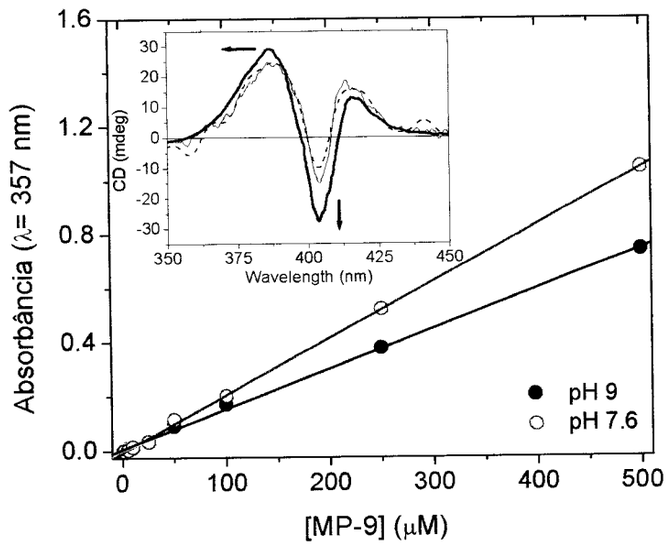


Figura 34: Dependência com a concentração da absorção eletrônica da banda N (357 nm) da MP-9 em pH 7,6 e 9 em tampão fosfato e carbonato (30 mM). A inserção mostra os espectros de CD da MP-9 como função da concentração em pH 9. As concentrações usadas foram 2 μM (linha fina sólida), 10 μM (linha tracejada) e 250 μM (linha grossa).

I.3.4. RPE por Onda Contínua (CW)

Como o ferro hemínico (Fe^{3+}) das microperoxidases é uma espécie paramagnética, utilizou-se a técnica de RPE para melhor investigar o estado de spin das espécies de MPs em diferentes valores de pH. É digno de nota que as medidas de RPE requerem altas concentrações para obter uma melhor razão sinal/ruído. Para estabelecer uma concentração mínima das microperoxidases necessárias para obter um bom sinal de RPE, medidas foram executadas com 100 μM, 200 μM e 300 μM. O melhor sinal foi obtido com 300 μM. Além disso, comparando-se os espectros obtidos com as três concentrações, observou-se um aumento da contribuição da espécie no estado de spin baixo S = ½ sobre o sinal de spin alto S = 5/2. Este resultado indica claramente que a agregação depende da concentração das microperoxidases.

A Figura 35 mostra os espectros de RPE da MP-8 a 4 K. Observa-se que o espectro em pH 7 possui predominantemente duas espécies, uma no estado de spin alto com simetria quase-axial (espécie I, g_1 = 6.030, g_2 = 5.780 e g_3 = 2.005), e uma outra espécie no estado de spin baixo com simetria rômbica (espécie II, g_1 = 3.180, g_2 = 2.140 e g_3 = 1.340). Vale mencionar que todos os parâmetros *g* (Tabela 1) foram obtidos através de simulação espectral utilizando o programa Qpow. O sinal de spin baixo (espécie II) pode ser explicado com a substituição da água que ocupa a sexta coordenação do ferro pelo grupo terminal α-amino da cisteína formando dímeros e/ou agregados maiores. Aumentando o pH de 7 para 9 nota-se nos espectros uma diminuição do sinal do estado de spin alto com concomitante aumento do sinal de spin baixo. Este resultado indica que uma maior quantidade de terminais aminas da cisteínas ficam disponíveis para fazer um número maior de dímeros, provavelmente do tipo Fe(III) S = 5/2 (água e histidina) com a molécula vizinha Fe(III) S = ½ (α-amino terminal e histidina).

Em pH 10 observa-se uma diminuição da intensidade do sinal de S = ½. Uma análise mais cuidadosa da largura de linha desse espectro mostra um

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

alargamento de linha da ordem de 10 %, sugerindo uma interação spin-spin entre os íons de ferro do grupo heme. Isso é possível se houver no processo de agregação um caminho químico entre os íons de ferro para estabelecer um mecanismo de super intercambio (super exchange) (Costa, *et. al.,* 2004). Este resultado sugere que as aminas desprotonadas neste pH devem promover agregados maiores, favorecendo a interação spin-spin entre os íons de Fe(III) spin S = 1/2 entre si. É importante mencionar que, esse fenômeno é observado em agregados com três ou mais íons de ferro.

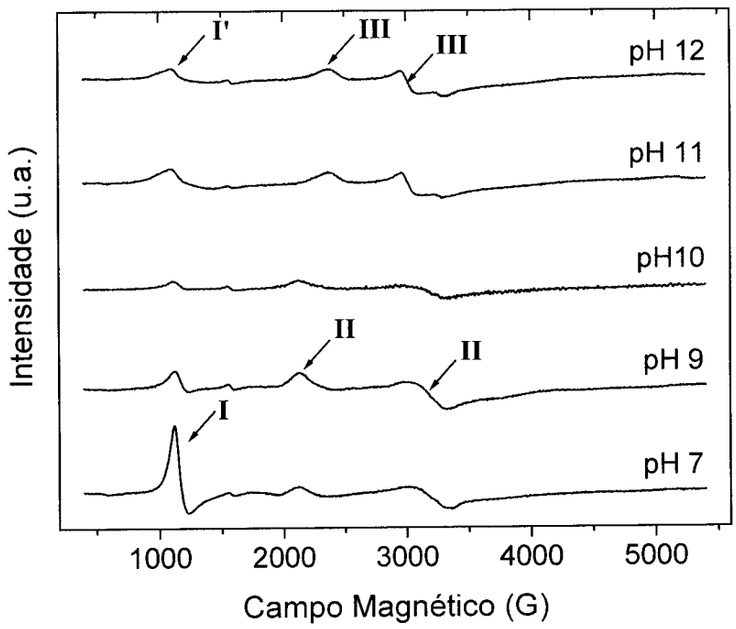


Figura 35: Espectros de RPE da titulação de pH da MP-8 (300 μM) a 4 K em tampão fosfato e carbonato (30 mM).

Em pH acima de 10 surgem novos estados de alto e spin baixo (Figura 35). Wang e colaboradores (1992) descreveram este estado de spin alto para *N*-AcMP-

8, atribuindo-o ao ferro penta-coordenado, onde a grande quantidade de íons OH^- desloca a His18 desprotonada (histidinato) da quinta coordenação e esse resíduo remove a água da sexta coordenação da MP-8 vizinha. A remoção da histidina da quinta coordenação do ferro hemínico é possível devido a grande repulsão eletrostática entre o histidinato e os resíduos ionizados periféricos do anel porfirínico. Resultados similares foram obtidos com o sistema *N*-AcMP8/3-CNPy (complexo de *N*-AcMP-8 com 3-cianopiridina na sexta coordenação do ferro hemínico) (Munro & Marques 1996). Partindo desses resultados, a nossa proposta atribui o estado de spin alto (espécie I'), em soluções alcalinas, à formação de agregados com a MP-8 penta-coordenada. Esses agregados são formados com o deslocamento do grupo amino da cisteína na sexta coordenação pelo histidinato, que por sua vez coordena a MP-8 vizinha. Como o histidinato é um ligante forte, o ferro é deslocado para fora do anel porfirínico, impedindo que a quinta coordenação seja ocupada. Dessa forma, a MP-8 torna-se pentacoordenada com spin alto.

Quanto à nova espécie de spin 1/2 observada no espectro de RPE da MP-8 em pH 11 e 12 (espécie III, g_1 = 2.875, g_2 = 2.240 e g_3 = 1.685), ela pode ser atribuída à permanência do grupo amino *N*-terminal da cisteína como sexto ligante e OH^- na quinta coordenação. Em ambos os tipos de agregados da MP-8 uma extremidade exibe um íon hidróxido na quinta e sexta coordenação do ferro (Figura 36). A aparente ausência do sinal de EPR das espécies coordenadas com bis-OH^- ainda precisa ser elucidada. É importante mencionar que quanto maiores os agregados, menor a contribuição do sinal de suas extremidades. Estas suposições estão consistentes com a presença de agregados da MP-8 em valores altos de pH, visto que em ambos os modelos propostos, OH^- deslocaria o ligante intra-cadeia (histidina) sem diminuir a ocorrência da coordenação inter-cadeia. Essas conclusões estão esquematizadas na Figura 36.

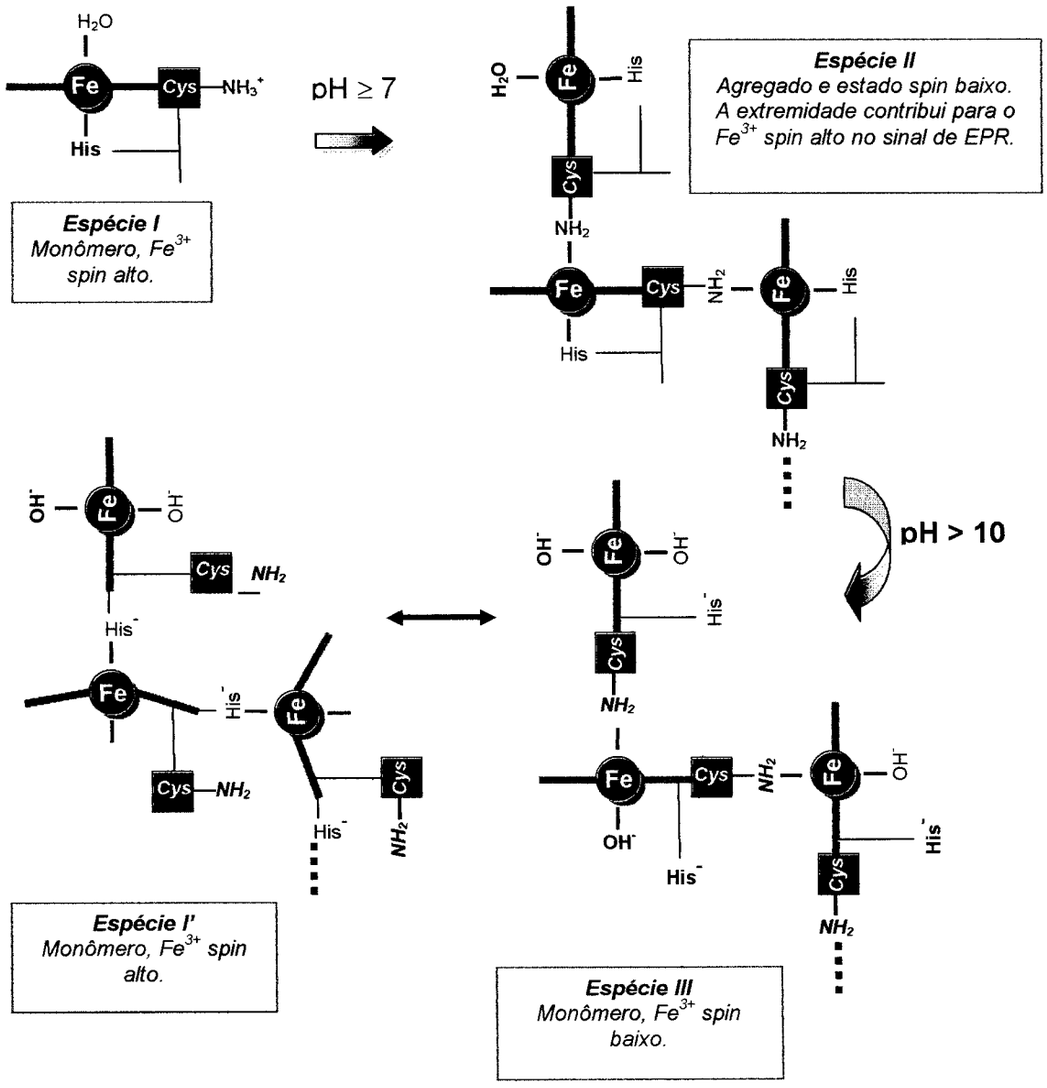


Figura 36: Representação esquemática da distribuição das espécies como função de pH para MP-8 em solução tampão.

Quanto à *N*-AcMP-9, o espectro de RPE à 4K (Figura 37) em pH 7 apresenta-se predominantemente no estado de spin alto com simetria axial (espécie I, g_1 = 5.990, g_2 = 5.780 e g_3 = 2.005, Tabela 1). Com o aumento do pH ocorre a conversão do estado spin alto para o spin baixo com g_1 = 3.380, g_2 = 2.070

e g_3 = 1.500 (espécie II, Tabela 1). Esses resultados são compatíveis com a desprotonação da molécula de água situada na sexta coordenação do ferro hemínico. Em pH 12 uma nova espécie surge, exibindo g_1 = 2,990, g_2 = 2,206 e g_3 = 1,590 (espécie III, Tabela 1). Este sinal de RPE pode ser atribuído à ocupação do grupo OH^- na quinta e na sexta coordenação do ferro hemínico, formando um complexo bis-OH^- (S = ½) (Bell *et al.*, 1990, Gandini *et al.*, 2003, Baldwin *et. al.*, 1986) . Para sintetizar estes resultados um esquema de conversão e formação das espécies citadas está mostrado na Figura 38.

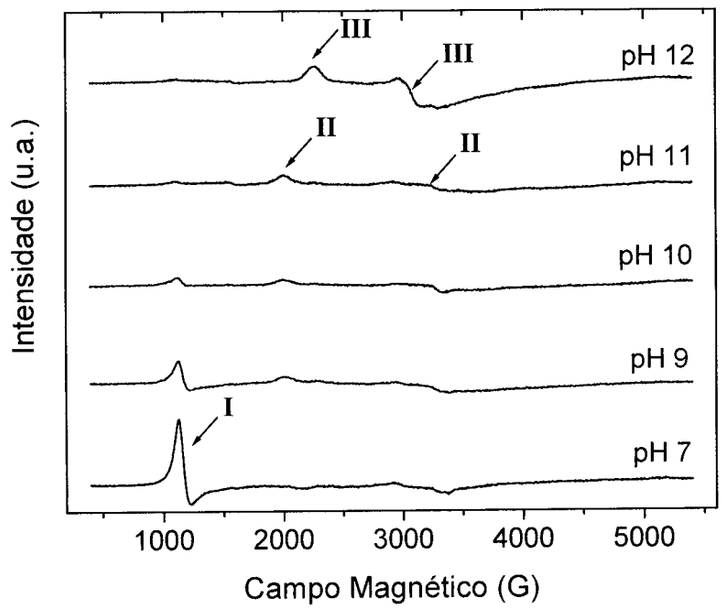


Figura 37: Espectros de RPE da titulação de pH da *N*-AcMP-9 (200 μM) a 4 K em tampão fosfato e carbonato (30 mM).

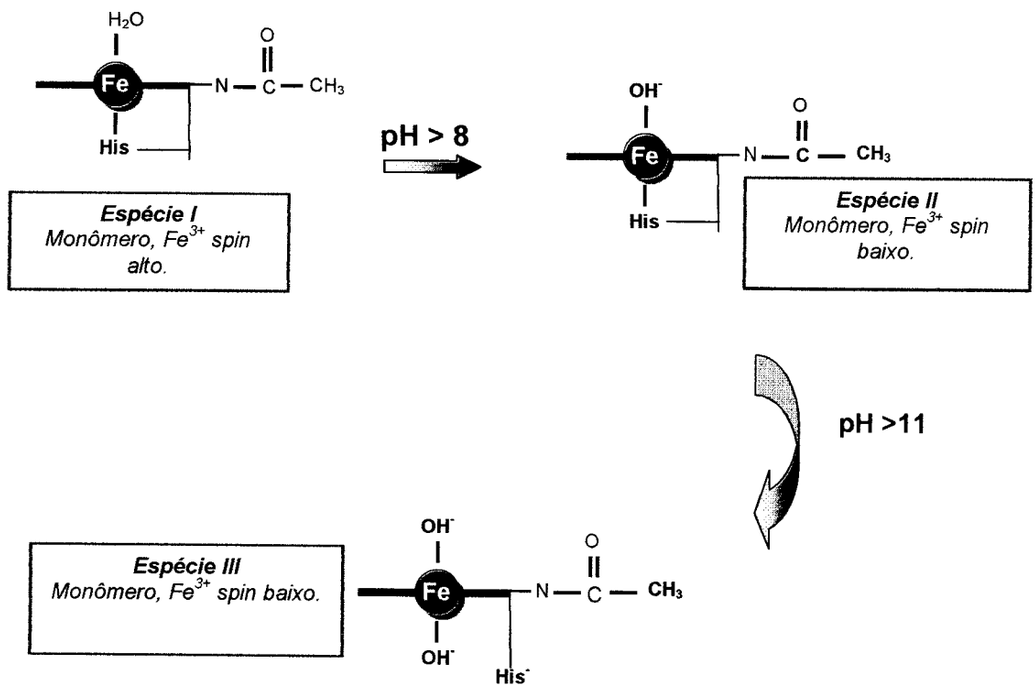


Figura 38: Representação esquemática da distribuição das espécies em função do pH para *N*-AcMP-9 em solução tampão.

A Figura 39 mostra o sinal de RPE da MP-9 obtidos em diferentes valores de pH. Cinco espécies foram detectadas para MP-9, as quais são compatíveis com a decomposição dos espectros de CD.

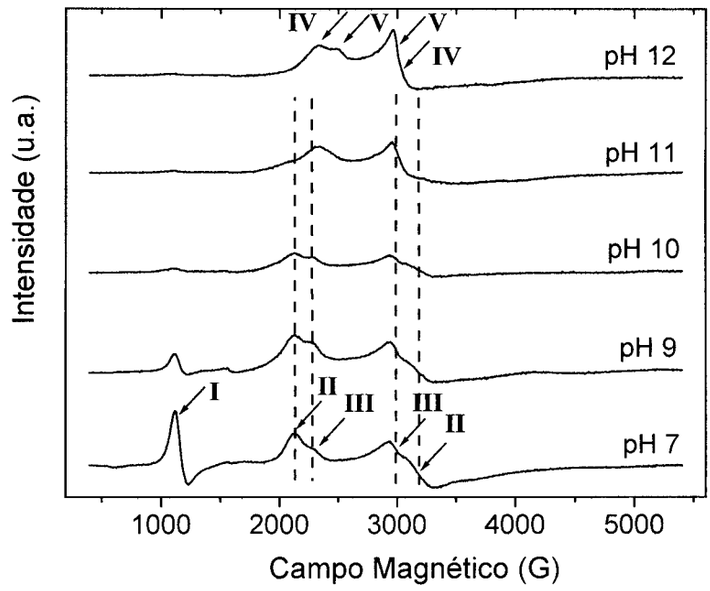


Figura 39: Espectros de RPE da titulação de pH da MP-9 (300 μM) a 4 K em tampão fosfato e carbonato (30 mM).

Em pH 7 além do estado spin alto (espécie I, g_1 = 6,051, g_2 = 5,775 e g_3 = 2,010, obtidos por simulação espectral, Tabela 1) também surgiu uma quantidade significativa de duas espécies de S = ½ (espécie II, g_1 = 3,193, g_2 = 2,125 e g_3 = 1,380 e espécie III, g_1 = 2,982, g_2 = 2,258 e g_3 = 1,800), provavelmente produzidas pela coordenação inter-cadeia e intra-cadeia, com predominância da primeira. Aumentando o pH gradativamente o estado de spin alto vai desaparecendo e vão mudando a quantidade relativa das espécies II e III. Em pH acima de 11 surgem duas novas espécies no estado de spin baixo (espécie IV, g_1 = 2,919, g_2 = 2,230 e g_3 = 1,725 e espécie V, g_1 = 2,715, g_2 = 2,234 e g_3 = 1,905). Estas espécies poderão exibir OH^- ou imidazolato na quinta coordenação, enquanto o grupo ε-amino Lys13 coordena intra-cadeia na sexta posição. A Figura 40 mostra em um esquema os mecanismos de formação destas espécies.

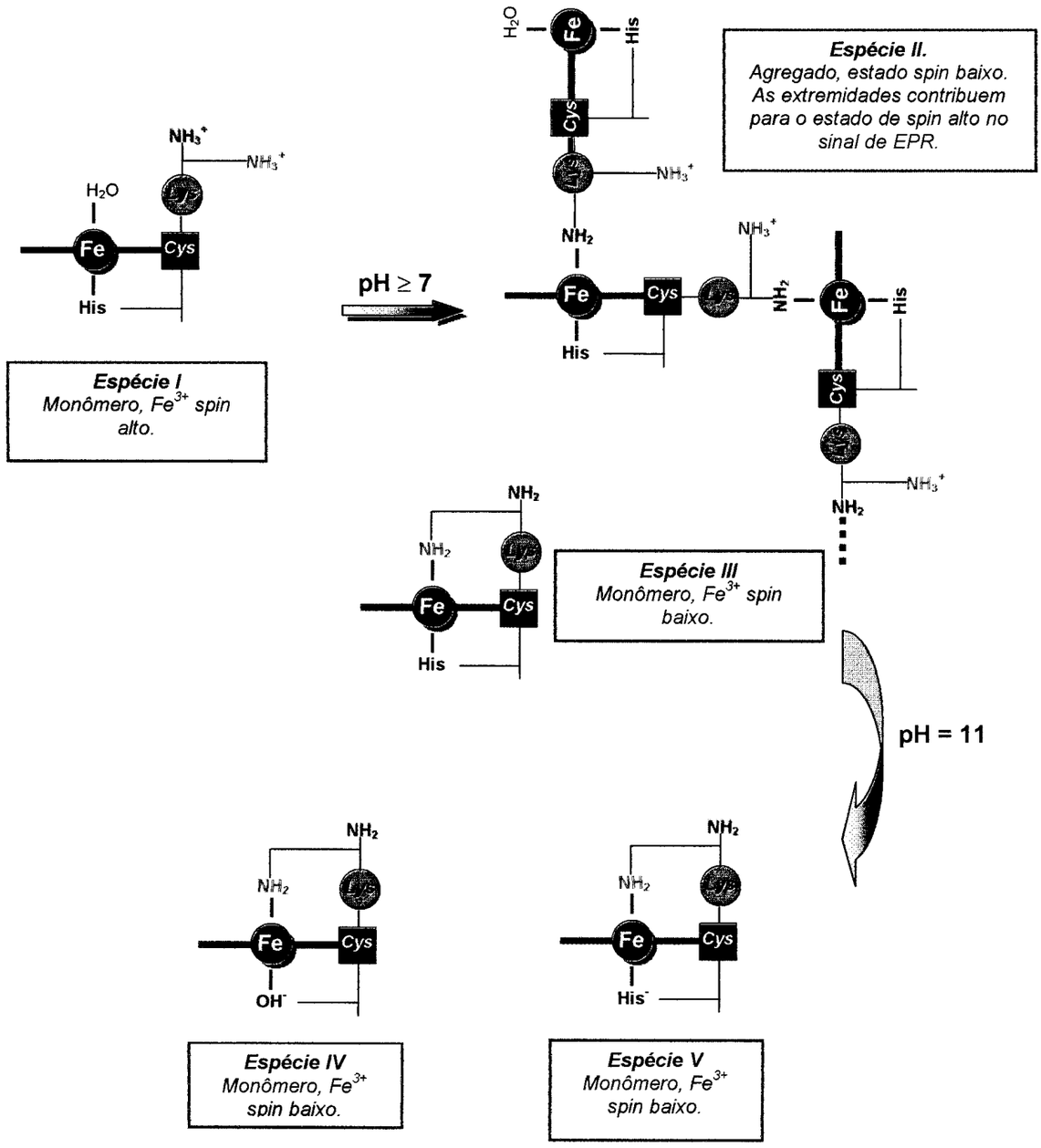


Figura 40: Representação esquemática da distribuição das espécies como função de pH para MP-9 em solução tampão.

Amostras	g				
	Spin 5/2	Spin 1/2			
	Espécie I	Espécie II	Espécie III	Espécie IV	EspécieV
MP-8	6.030 5.780 2.005	3.180 2.140 1.340	2.875 2.240 1.685		
N-AcMP-9	5.990 5.780 2.005	3.380 2.070 1.500	2.990 2.206 1.590		
MP-9	6.051 5.775 2.010	3.193 2.125 1.380	2.982 2.258 1.800	2.919 2.230 1.725	2.715 2.234 1.905

Tabela 1: Valores de g obtidos através da simulação dos espectros experimentais de RPE utilizando o programa QPOW.

I.3.5. – *Modelagem da coordenação intra-cadeia do ferro da MP-9 coordenada pela simulação MD*

A hipótese que o grupo ε-amino da MP-9 pode coordenar o ferro na sexta posição através da coordenação intra-cadeia foi testada pela simulação de MD. Simulações de 20 ns da MP-9 mostraram que a distância entre o grupo ε-amino da Lys13 e o ferro hemínico pode ser menor do que 4 Å, algumas vezes entre 3,2 e 3,4 Å. A MP-9 pode assumir essas distâncias entre grupo ε-amino da Lys13 e o ferro hemínico somente se a ligação dissulfeto Cys14 (ligações em amarelo, Figura 41) é girado para o lado oposto da Cys17 e His18, considerando o plano do anel porfírinico como referência. Para essas distâncias entre ε-amino da Lys13 e o ferro,

a sexta coordenação não é possível, mas assumindo uma rotação do plano da Lys C^{δ} - C^{ε} através do grupo ε-amino, a distância encontrada é 2,0-2,1 Å, a qual pode ser estabelecida para a coordenação intra-cadeia. Para duas destas conformações obtidas e rotações exibidas do plano da Lys C^{δ} - C^{ε} através do grupo ε-amino a sexta coordenação foi fixada, assumindo os parâmetros da força de campo da estrutura da MP-9 pentacoordenada. Após a energia de minimização, 10 ns de simulações de MD foram executadas para as duas conformações rotacionadas da MP-9 que mantiveram estruturalmente estáveis durante toda simulação e não apresentaram tensão em qualquer parte da molécula. Uma conformação típica da MP-9 coordenada pelo grupo ε-amino da Lys depois de 8 ns de simulação MD está mostrado na Figura 41. As conformações encontradas com a simulação de MD indicam que a MP-9 está coordenada intra-cadeia. Este cálculo foi realizado por Dr. Cláudio S. Shida da Universidade de Mogi das Cruzes, SP.

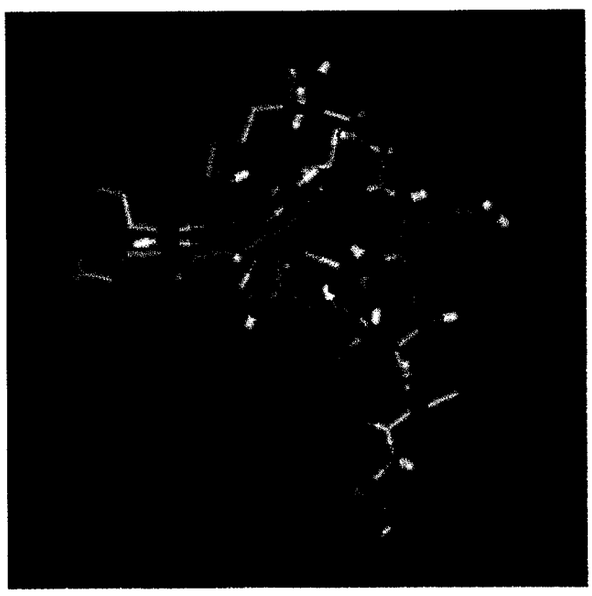


Figura 41: A Figura mostra uma conformação típica da MP-9 com coordenação intra-cadeia depois de 8 ns de simulação de MD. O ferro é representado pela bola verde, o nitrogênio do grupo ε-amino da Lys em azul sobre o átomo de ferro, e a ligação dissulfeto em amarelo. A figura foi gerada usando um pacote de visualização VMD de acordo com Humphrey *et al.*, 1996.

I.3.6. RPE Pulsada

Objetivando encontrar um ligante que se comporte da mesma forma que a metionina 80 no citocromo *c*, testamos vários ligantes para ocupação da sexta coordenação do ferro hemínico das microperoxidases. Logo, selecionamos apenas as microperoxidases com estado de spin baixo e valência 3+. Obtivemos resultados relevantes com o imidazol. Essa amostra apresentou uma formação acentuada de espécies de spin S = ½ e ausência de espécies S = 5/2 (Figura 42 A).

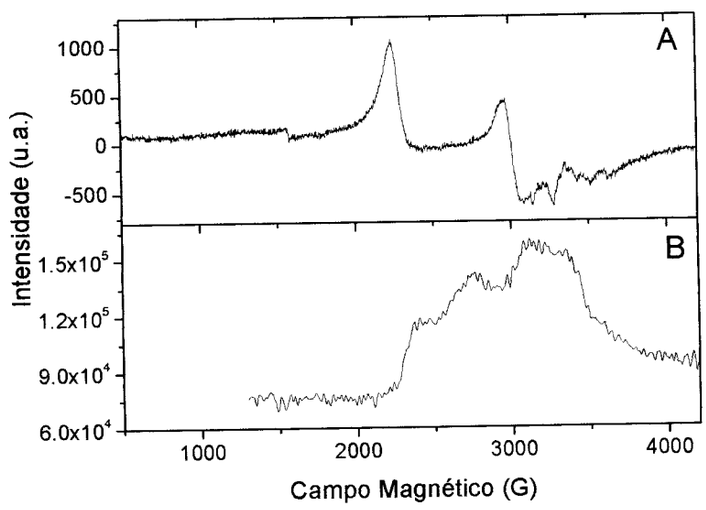


Figura 42: Espectro de RPE da MP-9 (150 μM) com Imidazol (1 M) pH = 7,5. **A)** CW banda X obtidos na temperatura de 11,5 K. Condições: amplitude de modulação, 10; 2400 gauss; constante de tempo, 20,48 s. **B)** Pulsada obtido por *echo field sweep*. Condições: pulsos: 16 e 24; distância entre pulsos: 270; shot per point: 500; shot rep. time: 3000; campo: 3300 G; temperatura 11,5 K

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA INFORMAÇÃO

A Figura 42 (A) mostra um espectro de RPE CW da MP-9 com imidazol obtido em pH 7,5 e a temperatura de 11,5 K. Observa-se que o espectro apresenta espécies de spin S = ½, as quais são atribuídas à coordenação do ligante com o ferro hemínico na sexta coordenação. É importante comentar que a intensidade do sinal de spin ½ depende fortemente da temperatura, como ocorre com o citocromo *c* férrico. A Figura 42 (B) ilustra a medida do eco com varredura de campo magnético. Essa medida foi realizada utilizando-se uma tabela de eventos. Esse resultado mostra que a espécie que produz o eco é a espécie de spin S = ½ observada nas medidas de CW. Além disso, essa medida será utilizada para escolher o campo magnético central apropriado para as medidas de ESEEM, as quais serão apresentadas a seguir.

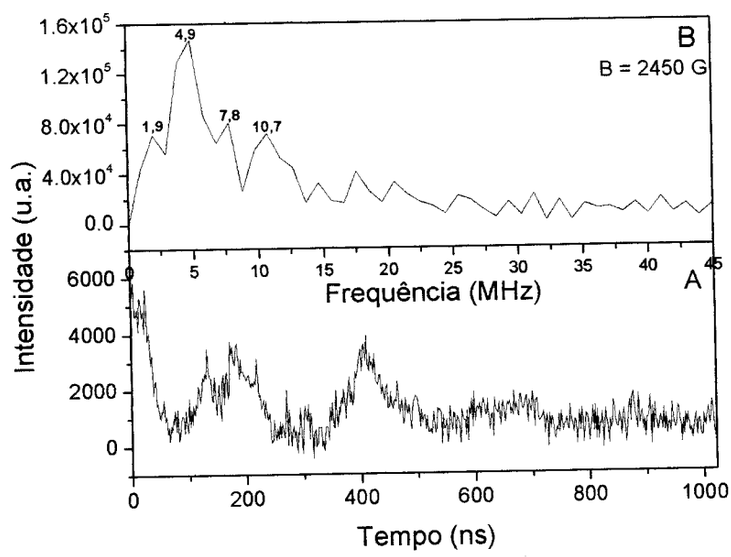


Figura 43: Espectros de RPE pulsada da MP-9 (150 μM) com Imidazol (1 M). (A) Decaimento do eco no experimento de dois pulsos. (B) Espectro de Fourier da modulação do eco de spins. Condições: pulsos: 16 e 24; distância entre pulsos: 270; médias: 1000; shot rep. time: 3000; campo: 2450 G; temperatura 11 K.

A Figura 43 apresenta o experimento de dois pulsos, via *PulseSpel* da MP-9 com imidazol. Verifica-se na Figura 43 (A) a modulação do eco primário em função do espaçamento entre o primeiro e o segundo pulso. O espectro em freqüência (Figura 43 B), obtido através da transformada de Fourier dessas modulações, mostra que se trata de modulações induzidas por núcleos de nitrogênios do anel do imidazol (4,9 MHz). Quanto às outras freqüências, não foi possível fazer atribuições, pois não conseguimos distinguir o sinal da amostra do ruído. Nesse caso, a relação sinal/ruído do espectro de ESEEM é muito baixa, porque a intensidade do eco é muito pequena. É importante mencionar que a intensidade do eco depende fortemente da concentração da amostra e as microperoxidases agregam nessa condição, impedindo que o ligante coordene o ferro hemínico.

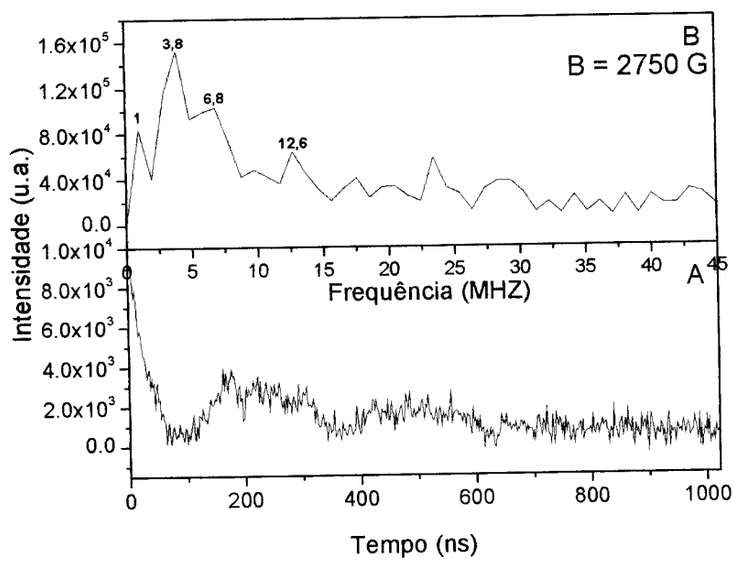


Figura 44: Espectros de RPE pulsada da MP-9 (150 μM) com Imidazol (1 M). (A) Decaimento do eco no experimento de dois pulsos. (B) Espectro de Fourier da modulação do eco de spins. Condições: pulsos: 16 e 24; distância entre pulsos: 270; médias: 1000; shot rep. time: 3000; campo: 2750 G; temperatura 11 K.

Os espectros da Figura 44 foram obtidos utilizando-se os mesmos parâmetros da Figura 43, apenas mudamos o valor do campo para 2750 G. O espectro em freqüência mostra modulações induzidas por núcleos de nitrogênios do anel do imidazol (1 MHz) e possivelmente dos nitrogênios do anel porfirínico (3,8 MHz) (Prisner *et al.*, 2001).

É importante ressaltar que também fizemos medidas de RPE pulsado da MP-8 com imidazol, mas não apresentamos aqui porque os espectros de TM também são muito ruidosos, dificultando a interpretação dos espectros de ESEEM. Isso ocorre porque a MP-8 agrega em concentrações altas, impedindo dessa forma a preparação de uma amostra com sinal (eco) suficiente para analisá-las utilizando a técnica de RPE pulsada.

Além do estudo da microperoxidase-8 e -9 com imidazol, também preparamos a *N*-AcMP-9 com *N*-Acetylmetionina (*N*-AcMet) em tampão fosfato pH 7 (Figura 45), com o intuito de obter uma amostra que possua características muito próximas às do citocromo *c*. Como foi apresentado anteriormente, a MP-8 e 9 agregam em pH 7, e por esse motivo optamos pela *N*-AcMP-9 para garantir que a sexta coordenação seria ocupada pelo enxofre da *N*-Acetylmetionina. Vale mencionar que necessitávamos de uma concentração que permitisse uma relação *N*-AcMet/N-AcMP-9 (amostra/ligante) em torno de 6500. Inúmeras tentativas foram realizadas, porém não conseguimos solubilizá-la na concentração acima de 1,3 M.

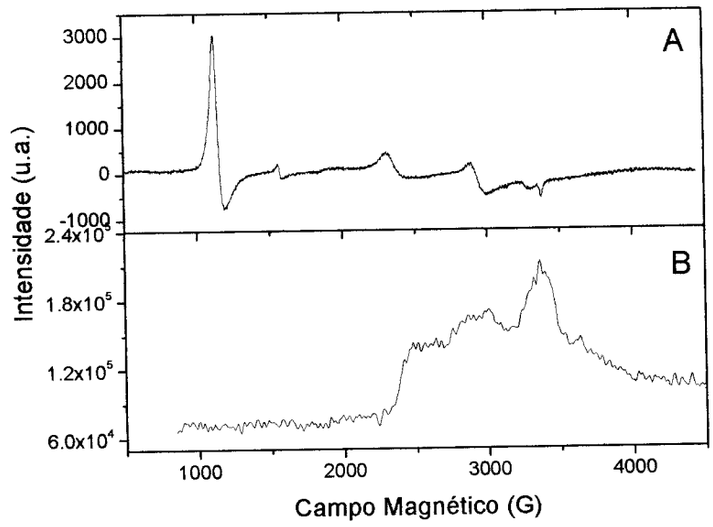


Figura 45: Espectro de RPE da *N*-AcMP-9 (200 μM) com *N*-Acetylmetionina (1,28 M) em tampão fosfato (50 mM) pH 7. **A)** CW banda X obtidos na temperatura de 11,5 K **B)** Pulsada obtido por *echo field sweep*. Condições: pulsos: 16 e 24; distância entre pulsos: 250; médias: 500; shot rep. time: 5000; campo: 3346 G; temperatura 8,4 K.

Na Figura 45 (A) está ilustrado o espectro de RPE (CW) da *N*-AcMP-9 com *N*-Acetylmetionina. Verifica-se a presença de espécies com sinal de S = 5/2 e spin S = ½. As espécies de sinal de spin 5/2 surgem da ocupação da sexta coordenação do ferro hemínico pela água. Já as espécies de spin ½ com parâmetros g_1 = 2,93 e g_2 = 2,30 aparecem pela ocupação da sexta coordenação do ferro pelo enxofre da *N*-Acetylmetionina. Esses parâmetros são consistentes com o encontrado para o citocromo *c* livre, correspondente ao Fe^{3+}, spin 1/2 (g_1 = 3,075, g_2 = 2,238) (Brautigan *et al.*, 1977) e também aquele encontrado para citocromo *c* em vesículas lípidicas (g_1 = 2,902, g_2 = 2,225), o qual foi atribuído por Zucchi e colaboradores (2003) como spin S = 1/2 alternativo. Além disso, outra evidência que o enxofre está coordenando o ferro é o fato que a intensidade do espectro de RPE das espécies de sinal spin S = ½ serem dependentes da temperatura, pois em 4 K o sinal de RPE mostrou-se menor do que em 11 K (resultados não mostrados), como ocorre no citocromo *c*.

A Figura 45 (B) mostra a medida do eco com varredura de campo. Essa medida permite a obtenção de toda a linha de ressonância e, por conseqüência, a escolha do campo apropriada para experimentos de ESEEM e medidas de T_m (Figura 46). Vale mencionar que, a programação de pulsos foi realizada utilizando-se uma tabela de eventos. Esse resultado mostra que a espécie que produz o eco é a espécie de spin ½ observada nas medidas de CW. Fica claro a partir desse espectro o não aparecimento da espécie de spin 5/2, claramente visto no espectro CW.

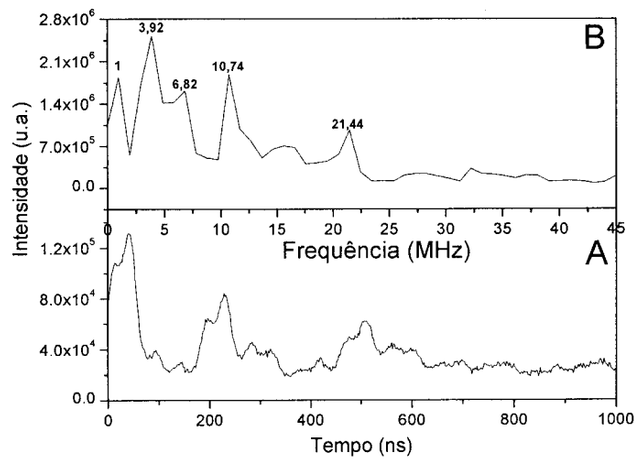


Figura 46: Espectros de RPE pulsada da *N*-AcMP-9 (200 μM) com *N*-Acetylmetionina (1,28 M). (A) Decaimento do eco no experimento de dois pulsos. (B) Espectro de Fourier da modulação do eco de spins. Condições: pulsos: 16 e 24; distância entre pulsos: 250; médias: 500; shot rep. time: 5000; campo: 2500 G; temperatura 8,2 K.

A *N*-AcMP-9 com *N*-AcMet foi submetida a um experimento de dois pulsos, usando a programação via *PulseSpel*. O decaimento do eco primário em função do espaçamento entre o primeiro e o segundo pulso está mostrado na Figura 46 (A). É possível observar a modulação presente no decaimento. O espectro em freqüência dessas modulações mostra (Figura 46 B) que se trata de modulações

induzidas por núcleos de N^{14} (1 MHz e 3,92 MHz) nitrogênios presentes no anel da histidina e 6,82 MHz poderia ser atribuída aos nitrogênios do anel porfirínico (Prisner *et al.*, 2001). As outras freqüências podem ser geradas por combinações de freqüências que ocorrem em experimentos de dois pulsos. Os experimentos de três pulsos que eliminariam essas combinações ficaram muito ruidosos (resultados não mostrados).

É importante ressaltar que também realizamos medidas de RPE da MP-8 e MP-11 com *N*-Acetylmetionina (resultados não mostrados). Porém, não obtivemos um resultado com boa relação sinal/ ruído para MP-8, porque não foi possível preparar a *N*-Acetylmetionina em altíssima concentração e por conseqüência, limitou-se a concentração da MP-8, como já foi mencionado anteriormente, impossibilitando dessa forma a medida de RPE pulsado. Quanto à MP-11, observamos que o enxofre da *N*-Acetylmetionina não ocupou a sexta coordenação do ferro hemínico, pois o espectro de UV-Vis não apresentou a banda em 695 nm característica dessa ligação (Tezcan *et al.*, 1998).

Os resultados obtidos para as microperoxidases com a técnica de RPE pulsada não foram muito informativos devido aos seguintes fatores:

- ✓ A intensidade do sinal (eco) depende da concentração e as microperoxidases agregam em concentrações altas, desse modo, torna-se difícil investigá-las por RPE pulsada.
- ✓ A presença dos nitrogênios N^{14} é outro fator que dificulta a análise dos espectros de ESEEM, uma vez que cada N^{14} dá origem a três linhas espectrais. Como as microperoxidases possuem cinco nitrogênios N^{14} próximos ao ferro hemínico, ocorre uma sobreposição das linhas espectrais, tornando-se impossível distinguí-las. Uma das soluções para

esse problema seria a troca dos nitrogênios N^{14} por N^{15}, porém essa mudança necessita de química aprimorada.

- ✓ Os resultados de ESEEM, os quais são encontrados através da transformada de Fourier, se o sinal é muito ruidoso pode produzir artefatos produzindo picos no espectro que não são da amostra. Para sanar esse problema é preciso lançar mão de métodos mais aprimorados que ainda não estão disponíveis no nosso grupo.
- ✓ Uma outra forma para distinguir os N^{14} contidos na amostra, além da substituição dos N^{15}, é encontrada com a simulação dos espectros experimentais, a qual pode ser realizada pelo programa *Easyspin*. A manipulação do programa *Easyspin* não é nada trivial, pois para cada situação é necessário escrever um programa que envolve a Hamiltoniana de spin apropriada.

CARACTERIZAÇÃO DO CITOCROMO-C EM SOLUÇÃO TAMPÃO E SDS POR RPE PULSADA

CAPÍTULO II.1 - *MATERIAIS*

II.1.1. Preparação das Amostras

Citocromo-*c* (Cit-*c*) foi obtido da Sigma e diluído em tampão hepes 100 mM pH 7.

O detergente *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) também foi obtido da Sigma. A solução micelar foi preparada dissolvendo SDS sólido em tampão hepes 80 mM pH 7,4.

A cardiolipina (CL) foi obtida da Sigma. As vesículas foram preparadas dissolvendo a cardiolipina em clorofórmio, e em seguida, fizemos um filme evaporando o solvente com gás de N_2. Adicionamos tampão hepes pH 7,4 no filme e agitamos a solução no vortex. A amostra foi sonicada utilizando um equipamento de ultra-som a fim de obter vesículas unilamelares de dimensões menores possíveis. A sonicação foi realizada por 30 s, com intervalos de 1 min. Por último, centrifugamos a amostra para retirar possíveis resíduos deixados pela ponteira do sonicador.

CAPÍTULO II.2 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

II.2.1. – *Eco com varredura de campo (Echo field sweep)*

Para dar início aos experimentos de RPE pulsado, é necessário à aquisição de um espectro de RPE-CW. Como já foi dito anteriormente, para o sistema do Fe^{3+}, spin baixo, em uma simetria rômbica há três linhas no espectro de RPE-CW com três valores de *g* diferentes. No caso do citocromo *c* livre, os valores dos parâmetros g são: g_1= 3,075, g_2=2.238 e g_3=1,270 (Brautigan *et al.*, 1977). Porém, esses valores são alterados quando o citocromo *c* interage com membranas. Para o citocromo *c* em SDS temos g_1= 2,97, g_2= 2,31 e g_3= 1,52. Nesse caso, ocorre uma menor distorção rômbica comparada com o sinal do citocromo *c* livre, e essa espécie é denominada na literatura de spin *½ alternativo* (Zucchi, 2003).

Através da técnica de RPE pulsado (*echo field sweep)* é possível obter um espectro de absorção medindo-se as intensidades do eco com variação do campo magnético. *O echo field sweep* possui aplicações nos casos em que a linha de absorção não é homogeneamente alargada e é mais larga que a largura espectral do pulso de microonda. Além disso, com o espectro de absorção é possível escolher as posições de campo apropriadas para medidas de T_m e T_1. A Figura 47 ilustra o espectro de absorção CW (*continuous wave*) (**A**), obtido através da integração numérica do espectro experimental, e a medida do eco com varredura

de campo (**B**) para o citocromo *c* em tampão hepes pH 7. Essa medida foi realizada através da montagem de uma tabela de eventos onde se programa a seqüência de pulsos utilizados.

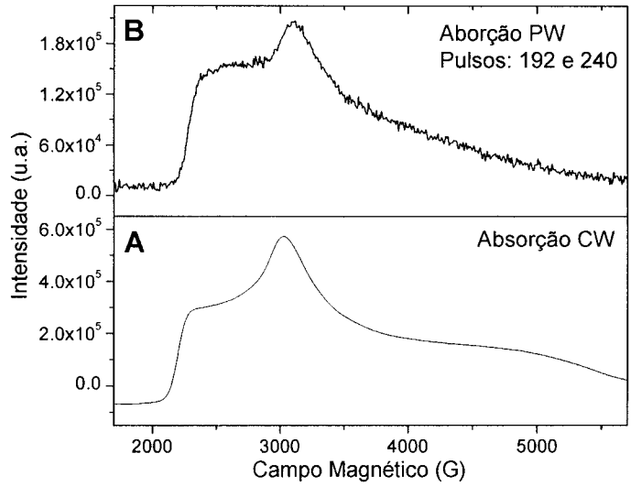


Figura 47: (**A**) Espectro de absorção do citocromo *c* medido através da técnica Onda Contínua (CW). (**B**) Espectro de absorção do citocromo *c* através da técnica de RPE pulsada, obtido por *echo field sweep*. Condições: pulsos: 192 e 240, temperatura 11 K. O citocromo *c* foi diluído em tampão hepes pH 7.

Esse resultado mostra que a espécie que produz o eco é a espécie de spin ½ observada nas medidas de CW. Além disso, está evidente o não aparecimento da espécie de spin 5/2.

Ao realizar essa medida percebemos que a largura dos pulsos interferia no espectro de RPE pulsado obtido por *echo field sweep*, como está mostrado na Figura 48. Observa-se que, para pulsos curtos (12 e 16 ns) surgem novas linhas que não aparecem para o experimento com pulsos longos (192 e 240 ns), o qual reproduz o espectro de absorção CW. Esse fato está intimamente ligado à modulação do decaimento do eco, como está em evidencia nos gráficos inseridos na Figura 48. Para obter um espectro correto de absorção por *echo field sweep* é necessário procurar inicialmente uma seqüência de pulsos que elimine

completamente a modulação do decaimento do eco, para então executar a medida (Braunschweiler *et al.*, 1985). Esse procedimento foi um avanço para o nosso grupo na compreensão das medidas de *echo field sweep*, porque até então estava obscura a razão do espectro de absorção pulsado algumas vezes não reproduzir o espectro de absorção CW.

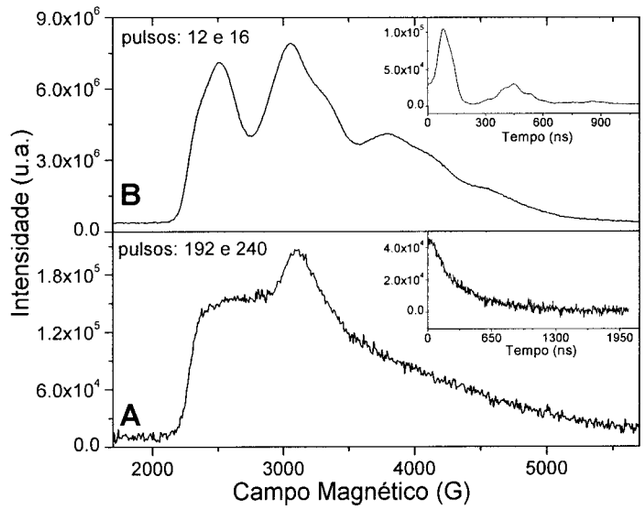


Figura 48: Espectros de absorção RPE pulsada obtido por *echo field sweep* do citocromo *c* (3 mM) diluído em tampão hepes (100 mM) pH 7. (**A**) pulsos: 192 e 240; distância entre pulsos: 250. (**B**) pulsos: 12 e 16; distância entre pulsos: 290. Condições: shot per point: 1000; shot rep. time: 1000; scan: 4; campo: 3700 G, temperatura 11K. As inserções mostram o decaimento do eco para as condições citadas acima.

Procurando investigar o comportamento do espectro de absorção por *echo field sweep* variando a largura dos pulsos para o citocromo *c* em tampão hepes pH 7, realizamos uma série de medidas, como mostra a Figura 49.

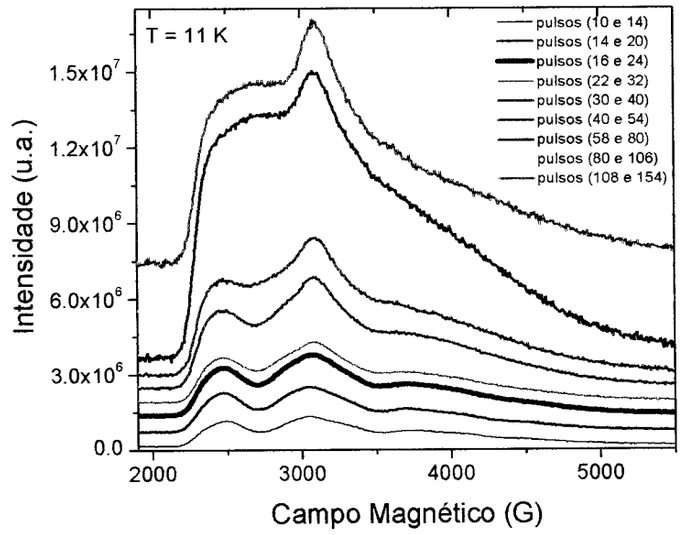


Figura 49: Espectros de absorção RPE pulsada obtido por *echo field sweep* do citocromo *c* (3 mM) diluído em tampão hepes (100 mM) pH 7 variando a largura dos pulsos.

Entretanto, ficou ainda em aberto o entendimento das linhas adicionais nos espectros de absorção obtidos por *echo field sweep* com pulsos curtos, a ser explorados em trabalhos futuros.

Na Figura 50 está mostrada espectro de absorção CW e espectros de absorção PW obtidos por *echo field sweep,* variando-se a largura dos pulsos para o citocromo *c* em SDS diluído em tampão hepes pH 7,4. Nesse caso, pode-se observar que a largura dos pulsos também influencia nos espectros de absorção PW.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

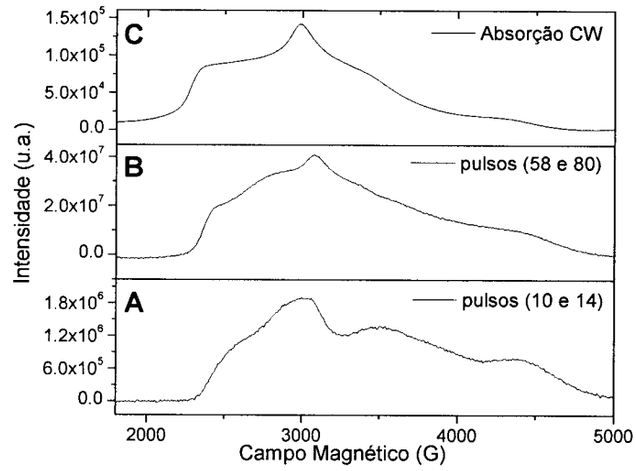


Figura 50: Espectros de RPE do citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) diluído em tampão hepes (80 mM) pH 7,4, T = 11 K. (**A**) Espectro de absorção do citocromo *c* medido através da técnica de RPE Pulsado (PW), obtido por *echo field sweep,* com pulsos 10 e 14. (**B**) Espectro de absorção do citocromo *c* através da técnica de RPE Pulsado (PW), obtido por *echo field sweep, com pulsos 58 e 80.* (**C**) Espectro de absorção do citocromo *c* através da técnica Onda Contínua (CW).

II.2.2. ESEEM

Na Figura 51 está mostrado o decaimento do eco em função do campo magnético no experimento de dois pulsos via *PulseSpel* para o citocromo *c* em tampão hepes pH 7. Ao lado do gráfico, a legenda de cores representa as intensidades dos espectros de T_m, onde o vermelho representa intensidade máxima e o azul petróleo a intensidade mínima.

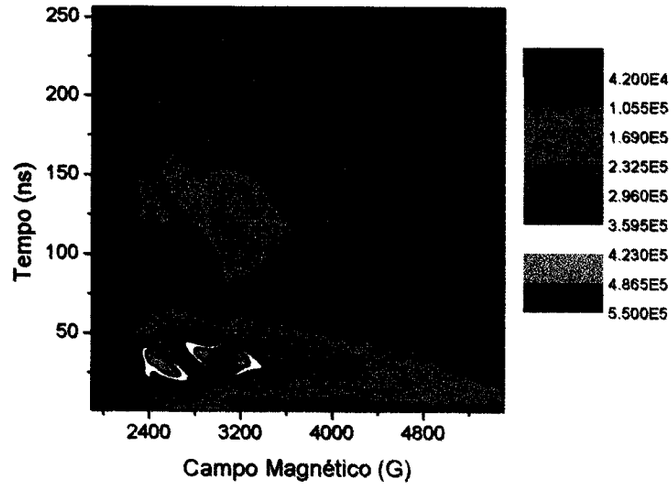


Figura 51: Espectro de RPE pulsada 2D do citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. O decaimento de eco no experimento de dois pulsos em função do campo magnético. Condições: pulsos: 10 e 14, distância entre pulsos: 230, shot. Rep. Time: 1000, temperatura = 11K.

A Figura 52 mostra espectros de freqüência em função do campo magnético no experimento de dois pulsos. Esse espectro foi obtido com a transformada de Fourier do decaimento do eco de spins (Figura 51). Observa-se que as distribuições das intensidades formam linhas nodais que estão relacionados com o fator γ nuclear do núcleo ressonante próximo do íon ferro. A partir da inclinação das linhas de distribuição de intensidades, como está esquematizado na Figura 52, é possível obter o parâmetro gama dos núcleos dos elementos interagentes na amostra. Porém, a qualidade da relação sinal/ruído e da resolução das linhas obtidas através da transformada de Fourier é determinante na obtenção deste parâmetro. No nosso caso, não foi possível fazer essa determinação, porque a transformada de Fourier produz artefatos quando uma parte significativa das oscilações da modulação do eco de spins encontra-se dentro do tempo morto do espectrômetro.

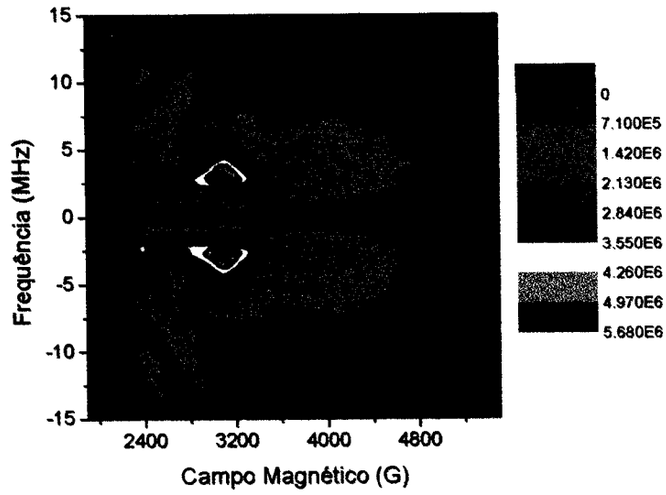


Figura 52: Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de dois pulsos em função do campo magnético para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. Condições: pulsos: 10 e 14, distância entre pulsos: 230, shot. Rep. Time: 1000, temperatura = 11K.

Com o intuito de descobrir as possíveis coordenações do ferro hemínico, o espectro de freqüência da Figura 53 foi obtido utilizando-se os mesmos parâmetros da Figura 52, com o campo magnético centrado em 3089 G. O espectro de freqüência mostra modulações induzidas provavelmente por núcleos de ^{14}N (0,8; 2,7; 4,9 e 6,4 MHz) (Peisach *et al.*, 1979).

Como já está determinado na literatura, o acoplamento hiperfino nuclear para os nitrogênios pirrólicos em MbCN e MbN_3 foram registrados próximos a 6 MHz no estudo de ENDOR (Mulks *et al.*, 1979). Para o citocromo *c* no estado de spin baixo, em um experimento de três pulsos com o campo centrado 3300 G, Peisach e colaboradores (1979) obtiveram modulações com períodos curtos, e freqüências 3,1 MHz e 6,3 MHz.

É importante ressaltar que cada núcleo de ^{14}N é representado por três linhas espectrais. Como o citocromo *c* possui cinco núcleos de nitrogênios próximos ao átomo de ferro (Deligiannakis *et al.*, 2000), o espectro obtido consiste da

sobreposição das linhas de cada nitrogênio, e por esse motivo obtivemos um espectro com um pico largo entre 1 a 7 MHz. Desse modo, torna-se impossível distinguir os nitrogênios sem a simulação dos espectros ou a substituição dos nitrogênios ^{14}N do anel pirrólico por ^{15}N.

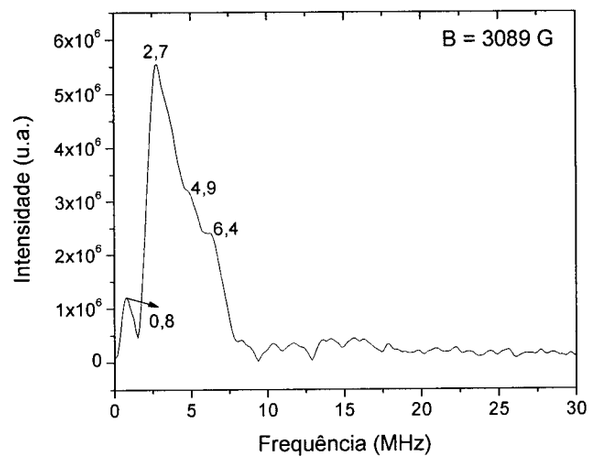


Figura 53: Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de dois pulsos para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. Condições: pulsos: 10 e 14, distância entre pulsos: 230, shot. Rep. Time: 1000 e campo: 3089 G.

Como no experimento de ESEEM com 2 pulsos surgem freqüências dobradas, as quais aparecem por causa da excitação parcial das transições proibidas (Magliozzo e Peisach, 1992) causando batimento nas oscilações induzidas, faz-se necessário a realização do experimento de ESEEM utilizando três pulsos (Figura 54) para eliminar esse batimento. A vantagem do experimento de ESEEM com três pulsos consiste no fato de não produzir linhas adicionais com freqüências duplicadas, o que diminui a superposição de linhas em baixa freqüência, principalmente em freqüências menores que 10 MHz. No entanto, como na obtenção do ESEEM com 3 pulsos, devido ao tempo adicional incluído pelo terceiro pulso, o eco formado tem intensidade menor por causa da relaxação, e isto pode comprometer a relação sinal/ruído do espectro obtido.

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

É importante mencionar que realizamos também o experimento de ESEEM com 2 pulsos para o citocromo *c* em SDS (resultados não mostrados). Esse resultado não foi apresentado nesse trabalho porque observamos a sobreposição das linhas no espectro de freqüência como o ocorrido para o citocromo *c* em tampão hepes, dificultando dessa forma sua análise. Sendo assim, optamos por apresentar apenas o espectro de Fourier da modulação do eco de spins para o citocromo em SDS obtido no experimento de três pulsos (Figura 54 B).

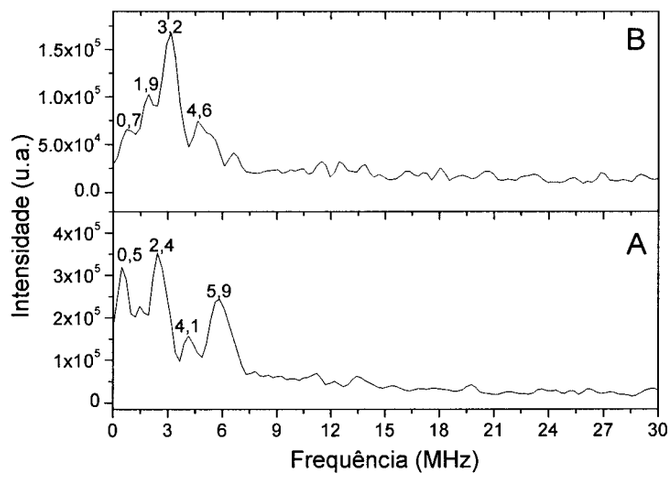


Figura 54: Espectro de Fourier da modulação do eco de spins no experimento de três pulsos. (**A**) citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. Condições: pulsos: 10, 10 e 10, distância entre pulsos: 230e 230, shot. Rep. Time: 1000, campo: 3177 G e T = 11K. (**B**) citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) diluído em tampão hepes (80 mM) pH 7,4. Condições: pulsos: 10, 10 e 10, distância entre pulsos: 200 e 250, shot. Rep. Time: 250 e campo: 3233 G e T = 11 K.

A Figura 54 mostra o espectro de freqüência obtido com o experimento de ESEEM-3p para o citocromo *c* em tampão hepes com o campo magnético centrado em 3177 G (Figura 54 A) e para o citocromo *c* em SDS diluído em tampão hepes pH 7,4 com o campo magnético centrado em 3233 G (Figura 54 B). Observa-se que no espectro de freqüência (**A**) modulações induzidas por núcleos de 2,4 MHz, 4,1 e 5,9 MHz podem ser atribuídas aos nitrogênios ^{14}N presentes. Quanto à freqüência 0,5 MHz não podemos fazer nenhuma atribuição precisa até o momento. Esses

resultados são coerentes com os obtidos por Peisach e colaboradores (1979). Para o citocromo *c* com SDS (Figura 54 B), verifica-se o aparecimento de freqüências 1,9, 3,2 e 4,6 MHz, as quais também podem ser atribuídas aos nitrogênios presentes. Comparando as Figuras 53 e 54, nota-se que o espectro obtido com o experimento de ESEEM-3p apresentou picos mais resolvidos, ao contrário do obtido para o ESEEM-2p o qual mostrou uma linha larga. Entretanto, a relação sinal/ruído do espectro com ESEEM-3p é menor do que no caso do obtido com ESEEM-2p, sendo esse um dos fatores que dificultam a interpretação dos resultados. Apesar do padrão de freqüências serem diferentes é difícil fazer alguma atribuição no sentido de diferenciar a mudança de simetria do heme nessas duas espécies.

Como já foi mencionado anteriormente, para simplificar a determinação dos ligantes axiais de uma molécula que contenha um grupo heme, seria desejável a substituição dos nitrogênios pirrólicos ^{14}N por ^{15}N, porque esses dão sinais fracos no espectro de ESEEM (Magliozzo & Peisach, 1992).

A simulação dos espectros de ESEEM também seria uma outra ferramenta para distinguir os nitrogênios ^{14}N, a qual pode ser realizada com a utilização do programa *Easyspin*.

II.2.3. Tempo de relaxação spin-rede T_1

A Figura 55 A ilustra a curva de inversão recuperação do eco de spins com o campo magnético centrado em 3120 G, além disso, está mostrado o ajuste com uma exponencial, o qual fornece os valores de T_1 que foram obtidos do decaimento do eco de spins, utilizando-se o programa *Origin*. Figura 55 B representa o inverso dos tempos de relaxação spin-rede, ($1/T_1$), obtidos para o citocromo *c* em tampão

hepes pH 7 em função da temperatura em três diferentes posições de campo, 2500, 3120 e 3900 G (em torno dos valores g_1, g_2 e g_3)..

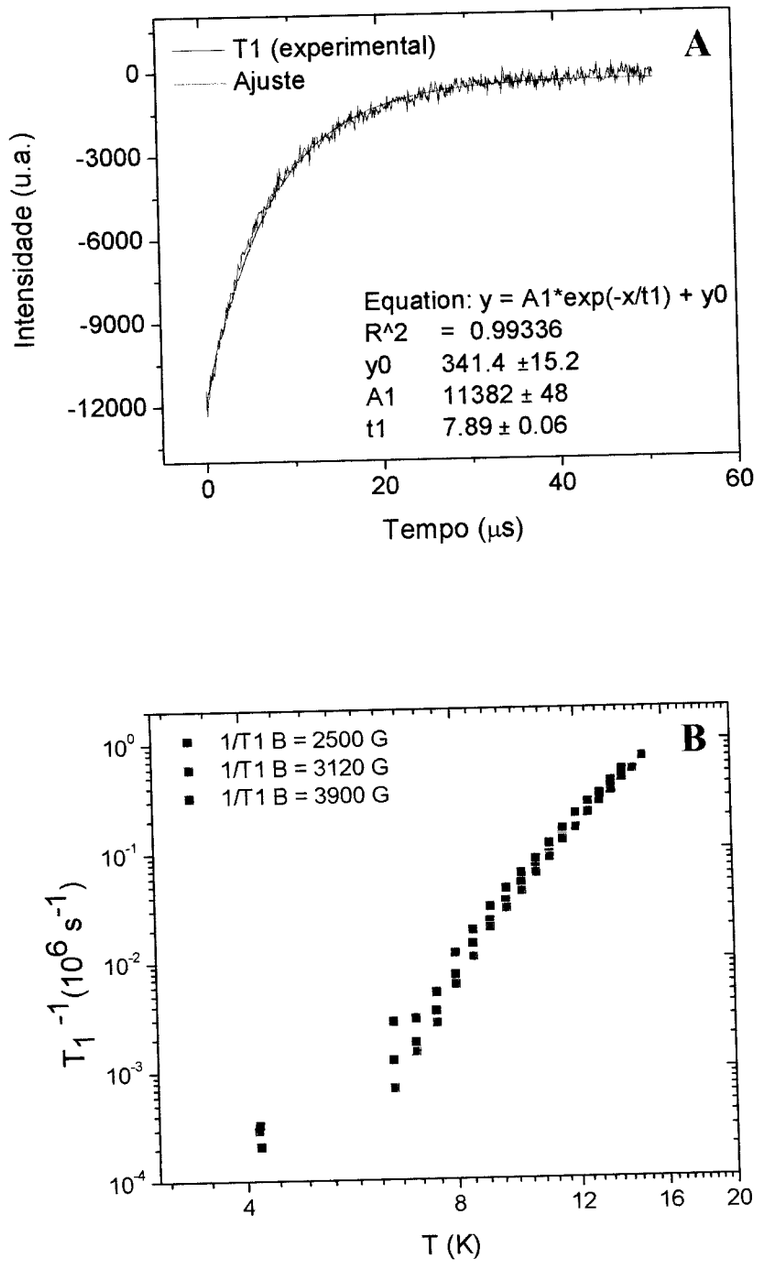


Figura 55: (A) Curva de inversão-recuperação com o campo centrado em 3120 G a 11,5 K. A curva em vermelho representa o ajuste exponencial. (**B**) Taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) versus a temperatura, para o citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. Condições: pulsos: 14, 10 e 14, distância entre pulsos: 290 e 290, shot. Rep. Time: 10000.

Observa-se que não ocorreram mudanças significativas nos valores de T_1 para os diferentes valores de campo magnético (Figura 55), sendo assim, analisaremos o resultado obtido para o campo centrado em 3120 G. Os tempos de relaxação para o citocromo *c* livre serão os parâmetros de referência para comparação da mesma molécula interagindo com SDS e cardiolipina como está demonstrado na Figura 56.

É digno de nota que não foram realizadas medidas no intervalo de temperatura entre 4,5 e 6,5 K, porque nessas condições a cavidade cilíndrica, na qual estava a amostra, encontrava-se cheia de hélio líquido. O borbulhamento do hélio dificultou a estabilização da temperatura e sintonia do espectrômetro.

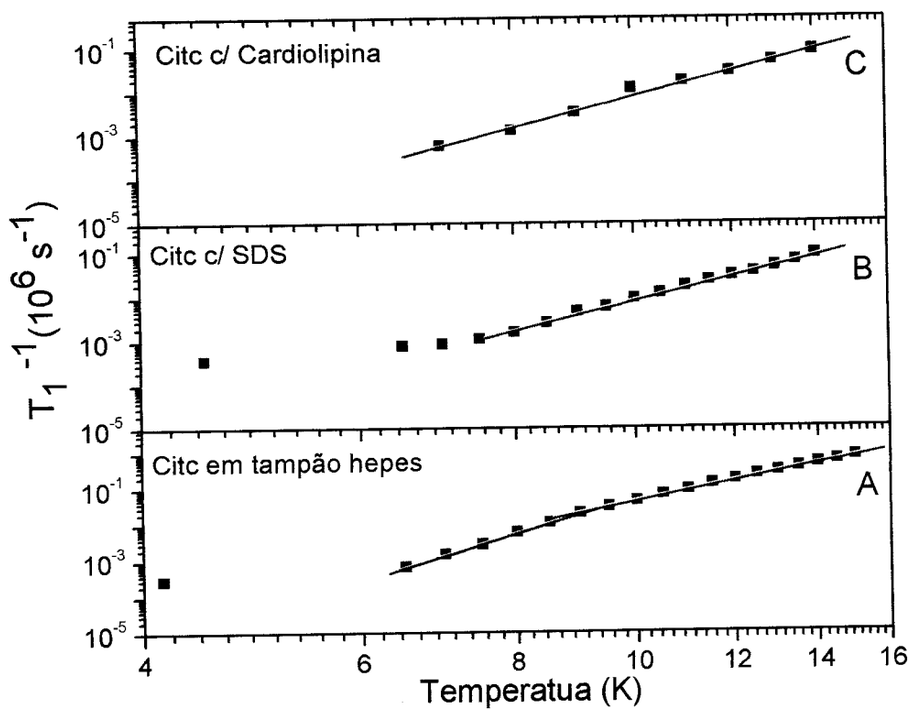


Figura 56: Taxa de relaxação longitudinal ($1/T_1$) versus a temperatura. (**A**) citocromo *c* (3 mM) em tampão hepes pH 7. Condições: pulsos: 14, 10 e 14, distância entre pulsos: 290 e 290, shot. Rep. Time: 10000. (**B**) Citocromo *c* (1 mM) em SDS (70 mM) diluído em tampão hepes pH 7,4. Condições: pulsos: 14, 10 e 14, distância entre pulsos: 290 e 290, shot. Rep. Time: 10000 e B = 3000 G (**C**) Citocromo *c* (500 μM) com cardiolipina (36 mM) em tampão hepes pH 7,4. Condições: pulsos: 16, 10 e 16, distância entre pulsos: 500 e 770, shot. Rep. Time: 5000 e B = 3000 G

A Figura 56 apresenta a taxa de relaxação longitudinal, ($1/T_1$), em função da temperatura para o citocromo *c* em tampão hepes com campo magnético centrado em 3120 G (**A**), para o citocromo *c* em SDS com campo em 3000 G (**B**) e para o citocromo *c* com cardiolipina com campo também em 3000 G (**C**). Os valores de T_1 foram obtidos com ajuste exponencial do decaimento do eco de spins, utilizando-se o programa *Origin*. As retas representam o ajuste da variação de $1/T_1$ utilizando a equação $y = A.T^n$. Esta equação representa a hipótese de que o mecanismo nesta faixa de temperatura é governado pelo processo Raman como descrito no capítulo I.2.

Os parâmetros obtidos no ajuste da taxa de variação do tempo de relaxação para o citocromo *c* em tampão, com SDS e cardiolipina estão apresentados na tabela 2.

	Log(A)	n
Citocromo em tampão hepes	-8,32 ± 0,09 -11,59 ± 0,17	6,96 ± 0,08 10,36 ± 0,19
Citocromo com SDS	-8,99 ± 0,14	6,91 ± 0,13
Citocromo com cardiolipina	-9,39 ± 0,31	7,3 ± 0,30

Tabela 2: Parâmetros do ajuste da taxa de variação do tempo de relaxação.

Verifica-se para o citocromo *c* em tampão hepes que a taxa de variação do tempo de relaxação foi ajustada com duas retas. Esse resultado implica na ocorrência de dois processos de relaxação diferentes, os quais podem ser atribuídos ao processo de relaxação Raman de primeira e segunda ordem. No processo de primeira ordem, como foi discutido anteriormente, $1/T_1$ possui uma dependência com a temperatura T^7, já no processo de segunda ordem o expoente

IFSC-USP SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO

da temperatura é em torno de 9 (Abragam & Bleaney, 1970). Além disso, o processo de relaxação direto pode ser o predominante em temperaturas mais baixa que 6,5 K.

Para o citocromo *c* com SDS e cardiolipina obtivemos valores para os expoentes em torno de 7, isto indica que o processo de relaxação é também Raman. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Blum & Ohnishi (1980). Os autores usando a técnica de saturação contínua mostraram que o mecanismo de relaxação para o citocromo *c* livre é compatível com processo de relaxação Raman com T^7. Os desvios dos valores de n do expoente 7 foram reinterpretados por Allen *et al.*, (1982) com base nos modelos fractais.

Vale dizer que também fizemos medidas com citocromo *c* em diferentes membranas, como DOPS. Entretanto, como os experimentos de pulsado necessitam de amostras muito concentradas, não foi possível preparar vesículas em altas concentrações, pois essas precipitavam nessas condições. Sendo assim, não conseguimos obter o ferro hemínico no estado de *spin baixo alternativo*.

CAPÍTULO III – CONCLUSÕES

O estudo apresentado na primeira parte desse trabalho mostrou que as microperoxidases -8 e -9 realmente formam agregados como sugerido na literatura. Entretanto nenhum estudo sistemático foi realizado com o propósito de identificar claramente os possíveis agregados propostos. O nosso trabalho teve por objetivo uma caracterização completa dos agregados das microperoxidases-8 e -9 em altas concentrações. Observamos que o estado de spin baixo pela coordenação inter-cadeia, inclui o grupo α-amino desprotonado do *N*-terminal do resíduo do aminoácido cisteína e da lisina na MP-8 e -9, respectivamente. A MP-9 exibe também coordenação intra-cadeia com o resíduo do grupo amino lateral da Lys13 e, neste caso apresenta-se predominantemente na forma monomérica acima de pH 8,5.

Os seguintes resultados colaboraram para a proposta da coordenação intra-cadeia da MP-9:

i) Os espectros de UV-vis da MP-9 obtidos em altas concentrações e altos valores de pH não diferem significamente dos espectros de UV-vis obtidos em baixas concentrações nos mesmos valores de pH. Em ambas as condições (concentrações altas e baixas) os espectros da MP-9 não exibem hipercromismo da banda N e hipocromismo da banda Soret;

ii) Encontramos resultados contrários quando os espectros da MP-9 foram obtidos em pH 7. Nesta condição de pH os espectros de UV-vis obtidos em

concentrações altas e baixas deferiram entre si. Com o aumento da concentração, observaram-se o surgimento da banda N (340 nm) e a diminuição da intensidade da banda Soret, mudanças essas que são características do estado de agregação. Além disso, observou-se a violação da lei de Beer em pH 7.

iii) Em valores de pH alto a MP-9 obedece a lei de Beer, porém o mesmo não foi observado para a MP-8 nas mesmas condições;

iv) Os espectros de RPE e CD obtidos para MP-8 em valores de pH altos diferem completamente daqueles obtidos nas mesmas condições. Somente para MP-9 a desconvolução dos espectros de CD em diferentes valores de pH mostra a contribuição de cinco espécies diferentes, compatíveis com a ocorrência da coordenação inter e intra-cadeia, corroborada pelas espécies paramagnéticas detectadas por RPE. Os resultados para MP-9 em pH acima de 7 mostram claramente a interação do grupo ε-amino da Lys13 como o ligante intra-cadeia explicando seu estado monomérico e a modelagem molecular confirma esta espécie na MP-9. Este resultado é uma contribuição importante deste trabalho.

Os resultados apresentados nesse trabalho são fundamentais para o estudo com a coordenação de ligantes externos que poderiam ter acesso a sexta coordenação do íon ferro no heme das microperoxidases-8 e -9. Claramente esses ligantes externos terão que competir com as possíveis coordenações inter e intra-cadeias.

As investigações da segunda parte desse trabalho mostraram uma caracterização do citocromo *c* utilizando a técnica de RPE pulsado. Nesse estudo descobrimos que a largura dos pulsos no experimento de *echo field sweep* interferia na forma da linha do espectro. Com isso foi possível compreender resultados obtidos pelo grupo que até então estavam obscuros.

Os resultados obtidos com os experimentos de ESEEM não permitiram uma identificação clara das contribuições vindas dos spins nucleares de cada nitrogênio

^{14}N vizinhos ao íon de ferro. Entretanto é importante ressaltar que tivemos avanços substanciais com relação ao manuseio da máquina de RPE pulsado e estratégias de uso das facilidades do equipamento do laboratório. Por exemplo, o experimento 2D que permite a visualização dos parâmetros gama nuclear dos núcleos vizinhos ao spin eletrônico do ferro. Essa técnica é muito nova para o grupo e cada passo possui uma grande relevância para trabalhos futuros.

Os espectros de ESEEM de hemoproteínas são complexos porque essas proteínas possuem vários nitrogênios ^{14}N acoplados no sistema de spin. Como cada núcleo de ^{14}N é representado por três linhas espectrais o espectro obtido consiste da sobreposição das linhas de cada nitrogênio, sendo assim, a identificação da contribuição da cada nitrogênio individualmente torna-se uma tarefa não trivial. Uma alternativa para distinguir o nitrogênio axial dos pirrólicos no citocromo *c* seria a substituição isotópica dos nitrogênios ^{14}N do anel pirrólico por ^{15}N, uma vez que o ultimo apresenta sinal pouco intenso no espectro de ESEEM. Porém, não possuímos no momento recursos para tal procedimento.

A simulação dos espectros de ESEEM também poderia ajudar a interpretar os resultados obtidos, porém, a manipulação do programa *Easyspin* ainda não é de uso freqüente no nosso laboratório. Para cada sistema é necessário escrever um programa que envolva a Hamiltoniana de spin apropriada.

Quanto aos resultados relativos às medidas de tempo de relaxação spin-rede observamos para o citocromo *c* em tampão, com SDS e cardiolipina que o mecanismo predominante de relaxação é o processo Raman em temperaturas acima de 6,5 K até 15 K. Para temperaturas mais baixas o processo predominante é o direto, sendo que para o citocromo *c* em tampão hepes uma contribuição do processo Raman de segunda ordem se sobrepõe ao processo direto na faixa de temperatura abaixo de 9 K.

CAPÍTULO IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAGAM, A.; BLEANEY, B. **Electron Paramagnetic Resonance of Transition Íons**. Clarendon Press: Oxford, 1970.

ADAMS, P. A.; BYFIELD, M. P.; GOOLD, R. D.; THUMSER, A. E. Kinetics of heme octapeptide (microperoxidases-8; MP-8) formation studied by high-pressure liquid chromatography (HPLC) monitoring of the peptic and tryptic hydrolysis of horse heart cytochrome-*c*. **J. Inorg. Biochem**. v. 37, p. 55-59, 1989.

ALLEN, J.P.; COLVIN, J.T.; STINSON, D.G.; FLYNN, C.P.; STAPLETON, H.J. Protein conformation from electron spin relaxation data. **Biophys. J.** v. 38, p. 299-310, 1982.

ANTONINI, E.; BRUNOR, M. **Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with ligands**. North-Holland: Amsterdam, 1971.

ARON, J.; BALDWIN, D. A.; MARQUES, H. M.; PRATT, J. M.; ADAMS, P. A. Hemes and hemoproteins. 1: Preparation and Analysis of the heme-containing octapeptide (microperoxidases-8) and identification of the monomeric form in aqueous solution. **J. Inorg. Biochem**. v. 27, p. 227-243, 1986.

ATHERTON, N. M. Principles of electron spin resonance. Ellis Horwood: London, 1993.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química.** Bookman, 2001.

BALDWIN, D. A.; MABUYA, M. B.; MARQUES, H. M. Haems and hemoproteins. Part 4. Preparation, analysis, and solution chemistry of microperoxidase 9 – camparison with microperoxidase 8. **S. Afr. J. Chem**. v. 40, p. 103-110, 1987.

BALDWIN, D. A.; MARQUES, H. M.; PRATT, J. M. Hemes and Hemeproteins, 2: The pH-dependent equilibria of microperoxidases-8 and characterization of the coordination sphere of Fe(III). **J. Inorg. Biochem**. v. 27, p. 245-254, 1986.

BANCI, L.; BERTINI, I.; GRAY, H.B.; LUCHINAT, C.; REDDIG, T.; ROSATO, A.; TURANO, P. Solution structure of oxidized horse heart cytochrome c. **Biochemistry.** v. 36, p. 9867-9877, 1997.

BELFORD, R.L.; NILGES, M.J. **Computer Simulation of Powder Spectra, EPR Symposium,** 21st Rocky Mountain Conference, Denver, CO, 1979.

BELL, S. E. J.; HESTER, R. E.; HILL, J. N.; SHAWCROSS, D. R.; LINDSAY SMITH, J. R. Resonance raman investigation of pH-dependent equilibria of water-soluble iron porphyrins. **J. Chem. Soc. Faraday Trans**. v. 86, p. 4017-4023, 1990.

BERENDSEN, H.J.C.; POSTMA, J.P.M.; DINOLA, A., HAAK, J.R. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys**. v. 81, p. 3684-3690, 1984.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. In: **Intramolecular Forces.** Pullman, B. ed. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, p. 331-342, 1981.

BLAUER, G.; SREERAMA, N; WOODY, R. Optical activity of hemoproteins in the soret region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. **Biochemistry.** v. 32, p. 6674-6679, 1993.

BLUM, H.; OHNISHI, T. Electron spin relaxation of the electron paramagnetic resonance spectra of cytochrome c. **Biochim. Biophy. Acta.** v. 621, p. 9-18, 1980.

BLUMENTHAL, D. C.; KASSNER, R. J. Azide binding to the cytochrome *c* ferric heme octapeptide. **J. Biol. Chem**. v. 254, p. 9617-9620, 1979.

BRAUNSCHWEILER, L.; SCHWEIGER, A.; FAUTH, J.M. E ERNST, R.R. Selective excitation in electron spin-echo modulation experiments. **J. Magn. Reson.** V. 64, p. 160-166, 1985.

BRAUTIGAN, D.L.; FEINBERG, B.A.; HOIFFMAN, B.M.; MARGOLIASH, E. Multiple low spin forms of the cytochrome c ferrihemochrome. **J. Biol. Chem.** v. 25, p. 574-582, 1977.

BUSHNELL, G.W.; LOUIE, G.V.; BRAYER, G.D. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. **J. Mol. Biol.** v. 214, p. 585-595, 1990.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. in: Biolophisical Chemistry. Part II: Techniques for the study of biological structure and function. Chapters 7 and 8. Ed.Freeman, San Francisco, 1980.

CARRAWAY, A. D.; McCOLLUM, M. G.; PETERSON, J. Characterization of N-acetylated heme undecapeptide and some of its derivatives in aqueous media: monomeric model systems for hemoproteins. **J. Inorg. Chem.** v. 35, p. 6885-6891, 1996.

CARRAWAY, A. D.; POVLOCK, S. L.; HOUSTON, M. L.; JOHNSTON, D. S.; PETERSON, J. Monomeric ferric heme peptide derivatives: model systems for hemoproteins. **J. Inorg. Biochem**. v. 60, p. 267-276, 1995.

CHUANG, W.; CHANG, Y.; JENG, W. Kinetic and structural studies of N-acetyl-microperoxidase-5 and microperoxidases-8. **J. Inorg. Biochem**. v. 75, p. 93-97, 1999.

COWLEY, A. B.; LUKAT-RODGERS, G. S.; RODGERS, K. R.; BENSON, D. R. A possible role for the covalent heme-protein linkage in cytochrome *c* revealed via comparison of N-acetylmicroperoxidase-8 and a synthetic monohistidine-coordinated heme peptide. **Biochemistry**. v. 43, p. 1656-1666, 2004.

CORNELIUS, J.; MCCRACKEN, J.; CLARKSON, R.R.; BELFORD, R.L.; PEISACH, J. Electron spin echo envelope modulation angle selection studies of axial pyridine coordination to copper (II) benzoylacetonate. **J. Phys. Chem.** v. 94, p. 6977-6982, 1990.

COSTA, A. J.; NASCIMENTO, O. R.; CALVO, R. Electron paramagnetic resonance study of weak exchange interactions between metal ions in a model system: Cu(II)Gly-Trp. **J. Phys. Chem.** v. 108, p. 9549-9555, 2004.

DELIGIANNAKIS, Y.; LOULOUDI, M.; HADJILIADIS, N. Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as a tool to investigate the coordination environment of metal centers. Coord. Chem. Reviews. v. 204, p. 1-112, 2000.

FEHER, G. **Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology.** New York: Gordon and Breach, 1969.

FERGUSON, D. M. Parameterization and evaluation of a flexible water model. **J. Comp. Chem**. v. 16, p. 501-511, 1995.

GANDINI, S. C. M.; BORISSEVITCH, I. E.; PERUSSI, J. R.; IMASATO, H.; TABAK, M. Aggregation of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin in its free base, Fe(III) and Mn(III) forms due to the interaction with DNA in aqueous solutions: Optical absorption, fluorescence and light scattering studies. **J. Lumin**. v. 78, p. 53-61, 1998.

GANDINI, S. C. M.; VIDOTO, E. A.; NASCIMENTO, O. R.; TABAK, M. Spectroscopic study of a water-soluble iron(III) meso-tetrakis(4-*N*-methylpyridiniumyl) porphyrin in aqueous solution: effects of pH and salt. **J. Inorg. Biochem**. v. 94, p. 127-137, 2003.

GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M. Interaction of Fe(III)- and Zn(II)-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrins with ionic and nonionic surfactants: aggregation and binding. **J. Inorg. Biochem**. v. 85, p. 263-277, 2001.

GARGALLO, R.; OLIVA, B.; QUEROL, E.; AVILES, F. X. Effect of the reaction field electrostatic term on the molecular dynamics simulation of the activation domain of procarboxypeptidase B. **Prot. Eng.** v. 13, p. 21-26, 2000.

GOUTERMAN, M. **The Porphyrins**. New York: Academia Press, 1978, cap1.

HAHN, E. L. **Phys. Rev**. *v*. 80, p. 580-594, 1950]

HARBURY, H. A.; LOACH, P. A. Interaction of nitrogenous ligands with heme peptides from mammalian cytochrome *c*. **J. Biol. Chem**. v. 235, p. 3646-3653, 1960.

HARBURY, H. A.; LOACH, P. A. Linked functions in heme systems: oxidation-reduction potentials and absorption spectra of a heme peptide obtained upon peptic hydrolysis of cytochrome *c*. **Biochemistry.** v. 45, p. 1344-1359, 1959.

HARBURY, H .A.; LOACH, P.A. Oxidation-linked proton functions in heme octa- and undecapeptides from mammalian cytochrome *c*. **J. Biol. Chem**. v. 235, p. 3640-3646, 1960.

KEVAN, L.; SCHWARTZ, R. N. Time Domain Electron Spin Resonance. John Wiley &Sons: New York, 1979.

KNOWLES, P. F.; MARSH, D.; RATTLE, H. W. E. **Magnetic Resonance of Biomolecules**. London: John Wiley & Sons, 1976.

LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J. Mol. Mod**. v. 7, p. 306-317, 2001.
LOW, D. W.; GRAY, H. B.; DUUS, J. O. Paramagnetic NMR spectroscopy of microperoxidases-8. **J. Am. Chem. Soc**. v. 119, p. 1-5, 1997.

LUSHINGTON, G. H.; COWLEY, A. B.; SILCHENKO, S.; LUKAT-RODGERS, G. S.; RODGERS, K. R.; BENSON, D. R. Comparison of thioethers and sulfoxides as axial ligands for *N*-acetylmicroperoxidase-8: implications for oxidation of methionine-80 in cytochrome *c*. **Inorg. Chem**. v. 42, p. 7550-7559, 2003.

MAGLIOZZO, R.S.; PEISACH, J. Electron spin echo envelope modulation spectroscopic study of iron-nitrogen interactions in myoglobin hydroxide and Fe (III) tetraphenylporphyrin models. **Biochemistry**. v. 31, p. 189-199, 1992.

MARQUES, H. M.; CUKROWSKI, I.; VASHI, P. R. Co-ordination of weak field ligands by *N*-acetylmicroperoxidase-8 (NAcMP8), a ferric haempeptide from cytochrome *c*, and the influence of the axial ligand on the reduction potential of complexes of NAcMP8. **J. Chem. Soc., Dalton Trans.** p. 1335- 1342, 2000.
MARQUES, H. M.; MUNRO, O. Q.; MUNRO, T.; MARINA de WET; VASHI, P. R. Coordination of N-donor ligands by the monomeric ferric porphyrin *N*-acetylmicroperoxidase-8. **Inorg. Chem**. v. 38, p. 2312-2319, **1999**.

MARQUES, H.M.; PERRY, C.B. Hemepeptide models for hemoproteins: the behavior of N-acetylmicroperoxidase-11 in aqueous solutions. **J. Inorg. Biochem**. v. 75, p. 281-291, 1999.

MAURICE, A. M. Tese - University of Illinois, Urbana, IL. 1979

MAZUMDAR, S.; MEDHI, O. K.; MITRA, S. Stability and characterization of iron (III) and iron (II) heme peptides encapsulated in aqueous detergent micelles: ^{1}H NMR and UV-Vis spectroscopic studies. **Inorg. Chem**. v. 30, p. 700-705, 1991.

MIMS, W.B. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. **Phys. Rev**. v. 5, p. 2409, 1972.

MIMS, W.B.; NASSAU, K.; McGee, J.D. Spectra Diffusion in Electron Resonance Lines. **Phys. Rev**. v. 123, p. 2059-2070, 1961.

MULKS, C.F.; SHOLES, S.P.; DICKINSON, L.C., LAPIDOT, A. Electron nuclear double resonance from high- and low-spin ferric hemoglobins and myoglobins J. Am. Chem. Soc. v. 101, p. 1645-1654, 1979.

MUNRO, O. Q.; MARINA de WET; POLLAK, H.; JAN VAN WYK; MARQUES, H. M. Haempeptide models for haemoproteins. **J. Chem. Soc., Faraday Trans.** v. 94, p. 1743- 1752, 1998.

MUNRO, O.Q.; MARQUES, H. M. Heme-peptide models for hemoproteins. 1. Solution chemistry of N-acetylmicroperoxidase-8. **Inorg. Chem**. v. 35, p. 3752-3767, 1996.

NANTES, I. L.; ZUCCHI, M. R.; NASCIMENTO, O.R.; FALJONI-ALARIO, A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association witt membrane interfaces - A CD and EPR investigation. **J. Biol. Chem**. v. 276, p. 153-158, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochmeistry**, New York, 2000, p. 118.

NICHOLLS, P. Cytochrome c binding to enzymes and membranes. **Biochem. Biophys. Acta.** v. 346, p. 261-310, 1974.

OWENS, J. W.; O'CONNOR, C. J. Characterization of some Low Spin Complexes of Ferric Hemeoctapeptide from Cytochrome-c. **Inorganica Chimica Acta.** v. 151, p. 107-116, 1998.

PEISACH, J.; MIMS, W.B.; DAVIS, J.L. Studies of the electron-nuclear coupling between Fe(III) and ^{14}N in cytochrome P-450 and in a series of low spin heme compounds. **J. Biol. Chem.** v. 254, p.12379-12389, 1979.

PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm – A pratical guide. **Anal. Biochem**. v. 203, p. 83-93, 1992.

PINHEIRO, T. J. The interaction of horse cytochrome c with phospholipids bilayers. Structural and dynamic effects. **Biochimie**. v. 76, p. 489-500, 1994.

PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L. Microperoxidase-9 Cycle in the Presence of CTAB Micelles. Tert-butyl Hydroperoxide as Both Oxidizing and Reducer Agent. **Prog. Coll. Polym. Sci**. v. 128, 2004, p.193-198.

PRIETO, T.; NASCIMENTO, O. R.; TERSARIOL, I. L. S.; FALJONI-ALARIO, A.; NANTES, I. L. Microperoxidase-8 associated to CTAB micelles: A new catalyst with peroxidase activity. **J. Phys. Chem. B**. v. 108, p. 11124-11132, 2004.

PRISNER, T.; ROHRER, M.; MACMILLAN, F. Pulsed EPR Spectroscopy: Biological Applications. **Annu. Rev. Phys. Chem**. v. 52, p. 259-313, 2001.

RIBEIRO, R.R. **Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Onda Contínua e Pulsada em Poli(o-metoxianilina)**. 2002. Dissertação (Mestre em Ciências: Física básica) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
ROWAN, L.G.; HAHN, E.L.; MIMS, W.B. Electron-Spin-Echo Envelope Modulation. **Phys. Rev.** v. A61, p. 137, 1965.

RYTÖMAA, M.; KINNUNEN, P. K. Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. **J. Biol. Chem**. v. 270, p. 3197-3202, 1995.

SCHWEIGER, A.; JESCHKE, G. **Princples of Pulse Electron Paramagnetic Resonance.** Oxford University Press, 2001.

TEZCAN, F. A.; WINKLER, J. R.; GRAY, H. B. Effects of ligation and folding on reduction potentials of heme proteins. **J. Am. Chem. Soc.** v. 120, p. 13383-13388, 1998.

URRY, D. W. Model systems for interacting heme moieties. I. The heme undecapeptide of cytochrome *c*. **J. Am. Chem. Soc**. v. 2, p. 4190-4196, 1967.

URRY, D. W.; PETTEGREW, J. W. Model systems for interacting heme moieties. II. The ferriheme octapeptide of cytochrome *c*. **J. Am. Chem. Soc**. v. 27, p. 5276-5283, 1967.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HÜNENBERGER, P. H.; KRÜGER, P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 manual and user guide.** Zürich, Switzerland: Hochschulverlag AG der ETH Zürich, 1996.

WANG, J.; TSAI, A.; HELDT. J.; PALMER, G.; VAN WART, H.E. Temperature- and pH-dependent changes in the coordination sphere of the heme c group in the model peroxidase N^{α}-Acetyl microperoxidases-8. **J. Biol. Chem**. v. 267, p. 15310-15318, 1992.

WANG, J. S.; VAN WART, H. E. Resonance Raman characterization of the heme *c* group in *N*-acetyl-microperoxidase-8: A thermal intermediate spin-high spin state mixture. **J. Phys. Chem**. v. 93, p. 7925-7931, 1989.

WUTHRICH, K., AVIRAM, I., SCHEJTER, A. Structural studies of modified cytochrome c by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 253, p. 98-103, 1971.

YANG, E. K.; SAUER, K. in: C. Ho (Ed.), **Electron Transport and Oxygen Utilization, Elsevier-North Holland**, New York, 1982, p. 89-94.
YUSHMANOV, V. E.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; TABAK, M. H-1 NMR and electronic absorption spectroscopy of paramagnetic water-soluble meso-tetraarylsubstituted cationic and anionic metalloporphyrins. **J. Inorg. Biochem.** v. 61, p. 233-250, 1996.

ZUCCHI, M. R.; NASCIMENTO, O.R.; FALJONI-ALARIO, A.; PRIETO, T.; NANTES, I. L. Modulation of cytochrome c spin states by lipid acyl chains: a continuous-wave electron paramagnetic resonance (CW- EPR) study of haem iron. **Biochem. J**. v. 370, p. 671-678, **2003**.