

Alexandre Cesar Dourado Neves

Efeito de Água no Estado Conformacional
Compacto de Citocromo – C



1910000745





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP.

ALEXANDRE CESAR DOURADO NEVES

**EFEITO DE ÁGUA NO ESTADO CONFORMACIONAL
COMPACTO DE CITOCROMO-C**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Física, Área de Concentração em Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

Orientador: São José do Rio Preto - SP *Pescio Colombo*

1996



745/98

9



Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo



Dedico este trabalho

*A Ana Rita Dourado Neves e Waldir Wilson Neves,
meus pais, que me mostraram a alegria de compreender o mundo e a
minha irmã Tânia, em saudosa memória.*

Este trabalho foi realizado no Departamento de Física do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, com auxílio financeiro da **FAPESP**.



Dedico este trabalho

A Ana Rita Dourado Neves e Waldir Wilson Neves,
meus pais, que me mostraram a alegria de compreender o mundo e a
minha irmã *Tânia*, em saudosa memória.

*"A ciência é fundamentada em fatos tal como uma casa é
fundamentada em tijolos, mas um conjunto de fatos não é uma
ciência da mesma maneira que uma pilha de tijolos não é uma
casa".*

Henry Poincaré (1854-1912)

AGRADECIMENTOS

Esta obra somente pôde ser concluída graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que de diferentes formas estiveram envolvidos neste trabalho.

É com carinho especial que agradeço ao Prof.Dr. Márcio Francisco Colombo que, através da orientação deste trabalho, me mostrou os caminhos da ciência e, através de suas palavras, me ensinou a pensar.

“A ciência é fundamentada em fatos tal como uma casa é fundamentada em tijolos, mas um conjunto de fatos não é uma ciência da mesma maneira que uma pilha de tijolos não é uma casa”.

Henry Poincaré (1854-1912)

Ao Prof.Dr. José Roberto Ruggiero, pela admiração de suas noções acadêmicas e pela afetuosa amizade.

Ao Prof.Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues pela amizade e auxílios computacionais prestados.

AGRADECIMENTOS

Esta obra somente pôde ser concluída graças à colaboração, direta ou indireta, de todos aqueles que de diferentes formas estiveram envolvidos neste trabalho.

É com carinho especial que agradeço ao **Prof.Dr. Márcio Francisco Colombo** que, através da orientação deste trabalho, me mostrou os caminhos da ciência e, através de sua postura científica, pude me espelhar.

Ao **Prof.Dr. João Ruggiero Neto**, por sua excepcional colaboração prestativa neste trabalho e por sua amizade

Ao **Prof.Dr. Marcelo Fossey**, pela amizade e contribuições relevantes para a realização deste trabalho.

Ao **Prof.Dr. José Roberto Ruggiero**, pela admiração de suas noções acadêmicas e pela afetuosa amizade.

Ao **Prof.Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues** pela amizade e auxílios computacionais prestados.



Ao **Prof.Dr. Elso Drigo Filho** cujo exemplo de postura científica muito me estimula.

Ao **Prof.Dr. Augusto Agostinho Neto** pela admiração de sua incrível capacidade intelectual que muito me encoraja para que eu possa continuar no caminho do saber.

Recebi críticas construtivas ou outra assistência valiosa de diversas pessoas, especialmente **Prof.DrJonny Rizzieri**, **Prof.DrJorge Chahine**, **Prof.Dr.Marinônio Cornélio**, **Prof.Dr José Ramom Abrego**, **Prof.Dr. Eloi Feitosa**, **Prof.Dr. Richard Ward**, **Prof.Dr. Raguvir Arni**.

Sou grato aos técnicos do departamento de Física, **Paulinho e Barbosa**, cujo auxílio foi de fundamental importância para realização dos experimentos.

Agradeço também a **Ilva**, secretária do departamento de Física, por sua excepcional cooperação

Aos meus pais **Waldir e Ana** que sempre me incentivaram e aos meus irmãos **Kátia, Tânia** (in memorian), **Sandra, Márcia e Rodrigo**, que sempre torceram por mim..

A minha princesa **Magna**, cuja paciência durante os anos de mestrado foi quase costumeira, meus mais profundos agradecimentos.



Aos meus queridos sobrinhos **Danilo, Sabrina e Paula** que fazem renascer a criança que existe dentro de mim.

Aos meus queridos amigos **Adriana, Alexandre Teso, André, Artur, Benatti, Bernadete, Cecília, Fátima, Flávio, Fernanda, Osmar, Raquel, Renato, Sandra, Uderlei**, pelo companheirismo, carinho e dedicação constantes, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos demais e não menos importantes colegas do Curso de Pós-Graduação, estagiários e funcionários do departamento de Física pelo ambiente de trabalho saudável e convivência harmoniosa.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo suporte financeiro.



Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	3
Capítulo 1	
1.1 Introdução.....	5
1.2 O Segundo Código Genético	14
1.3 Forças que Dirigem o Enovelamento de Proteína	16
1.3.1 Forças de Longo Alcance	17
1.3.2 Forças de Curto Alcance	18
a) Interação Dipolo-Dipolo	18
b) Interação Íon-Dipolo	19
c) Interação Dipolo-Dipolo Induzido	20
d) Interação Ion-Dipolo Induzido	20
e) Forças de Dispersão (Dipolo Induzido-Dipolo Induzido)	21
f) Pontes de Hidrogênio.....	22
1.4 A importância das forças de curto alcance no enovelamento protéico.....	23
1.5 O Papel da Água na Estrutura de proteínas.....	24



Capítulo 2	71
2.1 O Citocromo-c	28
2.2 Origem da Variação Espectral do Citocromo-c.....	30
Capítulo 3	76
3.1 Desnaturação Ácida.....	34
3.2 Efeito de Solutos Neutros Sobre a Atividade da Água de Hidratação de Macromoléculas em Solução.....	40
Capítulo 4	91
4.1 Material e Métodos.....	42
Capítulo 5	105
5.1 Resultados	
5.1.1 Desnaturação na Presença e Ausência de 2,5 M de Sorbitol.....	44
5.1.2 Cálculo da Fração de Proteína no Estado Nativo.....	51
5.1.3 Comportamento da Constante de Equilíbrio com o pH.....	57
5.1.4 Análise do Efeito de Sorbitol Sobre as Formas mais Compactas da Proteína.....	60
5.1.5 Análise por SVD do Processo de Desnaturação Ácida de Citocromo-c.....	70



Referência	5.1.5.1 A Técnica de Decomposição de Valor Singular (SVD).....	71
	5.1.5.2 Obtenção da Distribuição de Componentes em Função da Variável Experimental a Partir das Matrizes $A=DF^T$ e $A=USV^T$	75
	5.1.5.3 Obtenção da Matriz H.....	76
	5.1.5.4 Exemplo e Implementação do Método de Análise.....	78
	5.1.5.5 Implementação das Rotinas de SVD e Ajuste não Linear.....	80
	5.1.5.6 SVD dos Espectros de Absorção.....	85
Partir	5.1.5.7 Determinação dos Valores dos Parâmetros (K_1 , K_2 , N_1 e N_2) a do Ajuste da Matriz V^T com o Modelo dado pela Matriz F.....	91
	5.1.5.8 Resultado do Exemplo.....	95
	5.1.5.9 Resultados Experimentais com Análise de SVD.....	98
	5.1.5.10 Equação de Linkage entre Ligação Diferencial de Prótons e Água no citocromo-c.....	105

Capítulo 6

6.1 Discussão.....	109
6.2 Conclusões.....	118
6.3 Contribuições deste Trabalho.....	119

Apêndices.....	120
----------------	-----

Apêndice A.....	120
-----------------	-----

Apêndice B.....	126
-----------------	-----

É sabido que a variação da energia livre no processo de enovelamento e desenovelamento de proteínas tem uma componente que advém da ligação de moléculas de água aos grupos expostos da proteína. Estudos calorimétricos, publicados na literatura tem medido uma mudança significativa na capacidade térmica durante a transição estado desnaturado $\rightleftharpoons$ glóbulo derretido, mas uma variação da capacidade térmica nula na transição glóbulo derretido $\rightleftharpoons$ estado nativo. Estes resultados são evidências de um possível papel de hidratação diferencial no enovelamento de proteínas.

O objetivo deste trabalho é investigar esta contribuição da água de hidratação da proteína para a energética que regula o equilíbrio conformacional do polipeptídeo, determinando a dependência da variação da energia livre de Gibbs da reação de enovelamento/desenovelamento do Citocromo-c com o pH e a atividade de água da solução. Nestes experimentos, a atividade de água é tamponada por sorbitol, um soluto que não participa diretamente da reação.

A desnaturação do Citocromo-c induzida por pH em soluções à diferentes atividades de água é monitorada opticamente na região do visível, entre 380-700 nm. O espectro de absorção nesta região se deve à absorção pelo grupo heme do Citocromo-c e reflete o estado conformacional da proteína.

Na sequência, foram realizados experimentos de reenovelamento de Citocromo-c em pH fixo, e desnaturante para a proteína em água, diminuindo-se a

Resumo

É sabido que a variação da energia livre no processo de enovelamento e desenovelamento de proteínas tem uma componente que advém da ligação de moléculas de água aos grupos expostos da proteína. Estudos calorimétricos, publicados na literatura tem mostrado uma mudança significativa na capacidade térmica durante a transição estado desnaturado $\rightleftharpoons$ glóbulo derretido, mas uma variação da capacidade térmica nula na transição glóbulo derretido $\rightleftharpoons$ estado nativo. Estes resultados são evidências de um possível papel de hidratação diferencial no enovelamento de proteínas.

O objetivo deste trabalho é investigar esta contribuição da água de hidratação da proteína para a energética que regula o equilíbrio conformacional do polipeptídeo, determinando a dependência da variação da energia livre de Gibbs da reação de enovelamento/desenovelamento do Citocromo-c com o pH e a atividade de água da solução. Nestes experimentos, a atividade de água é tamponada por sorbitol, um soluto que não participa diretamente da reação.

A desnaturação do Citocromo-c induzida por pH em soluções à diferentes atividades de água é monitorada opticamente na região do visível, entre 380-700 nm. O espectro de absorção nesta região se deve à absorção pelo grupo heme do Citocromo-c e reflete o estado conformacional da proteína.

Na sequência, foram realizados experimentos de reenovelamento de Citocromo-c em pH fixo, e desnaturante para a proteína em água, diminuindo-se a



atividade de água com a adição de sorbitol. A análise dos espectros óticos indicaram a existência de pelo menos um estado intermediário entre as conformações nativa e desnaturada.

A caracterização do equilíbrio realizado a partir da análise da variação da absorbância em comprimento de onda fixo, permitiu determinar que tanto o estado nativo, quanto o intermediário são estabilizados com a diminuição da atividade de água em relação à desnaturação ácida.

Com o objetivo de melhor caracterizar o processo de desnaturação ácida do Citocromo-c e definir criteriosamente o número de estados intermediários da desnaturação, propusemos analisar as variações espectrais medidas utilizando a técnica numérica de decomposição de valor singular (SVD) seguida da análise de ajuste não linear de modelos de desnaturação. Esta análise permitiu estabelecer três estados, N, I e D, para descrever o processo de desnaturação do Citocromo-c acompanhado por absorção ótica.

Com este modelo, determinamos as constantes de equilíbrio entre os estados N-I e I-D e, o número aparente de prótons e de moléculas de água que se ligam ao Citocromo-c em cada passo deste processo. Estes dados permitiram determinar as curvas de distribuição das espécies nativa, intermediária e desnaturada em função do pH e da atividade de água. Finalmente, foi possível determinar que a cada próton ligado ao Citocromo-c no processo de desenovelamento, cerca de 30 moléculas de água ligam-se à proteína.



ABSTRACT

The free energy change associated with the folding unfolding reaction of proteins has an energetic component that is due to the macromolecular hydration. Recent calorimetric studies published in literature has shown a significant heat capacity change during the re-folding of the denatured to the molten globule state of some proteins while a null heat capacity change in the transition from the molten globule to the native state suggesting a role for protein hydration on the folding reaction. The goal with this work is to explore this hydration contribution to the folding unfolding reaction of citochrome c induced by pH by studying the dependence of the equilibrium parameters on the chemical potential of water and on pH.

The unfolding of cytochrome c induced by pH have been followed by optical absorption measurements in the range of 380 to 700 nm. Within this region the absorption spectra of cytochrome c are due to the absorption of the heme group and reflect the equilibrium of different conformational states of the protein at each pH. In addition, the refolding of cytochrome-c at fixed and low pH was induced by changes in water activity due to the addition of sorbitol to the buffer solution. The analyses of the dependence on the spectra on pH indicate the existence of at least one intermediate state between Native and Denatured state of cytochrome-c. From the analyses of the absorbance change measured at fixed wavelength we could



determine that both the Native and the Intermediate state of the protein are stabilized against acid denaturation.

With the goal to better characterize the mechanism of acid unfolding of cytochrome c we have also analysed the spectra obtained as a function of pH and water activity by Singular Value decomposition. This numerical technic allowed us to conclude, criteriosly, that only on spectral intermediate is involved in the unfolding of cytochrome C. Ouor further analyses of the SVD data, using a model of three conformation states in equilibrium with pH and water activity, allowed to determine the equilibrium distribution plots of each conformacional state of cytochrome c as a function of pH at various values of water activity. Finally, we have also determined that about 30 water molecules binds to protein per each one of the six protons that bound during the unfolding is reaction . In conclusion, we have shown that the deacresce of the water chemical potential stabilize preferentialy the more compact states of cytocrome c and have determined quantitatively the hydration changes associated with these processes.



Capítulo-1

1.1-Introdução

Entre as várias classes de moléculas biológicas de grande importância para os seres vivos, estão as proteínas; haja visto que elas constituem uma grande parte da estrutura de todas as células além de desempenhar funções catalíticas como as enzimas, que controlam e regulam o conjunto do metabolismo celular, funções de defesa do organismo como os anticorpos, dentre tantas outras.

O termo proteína provém do grego (πρωτεϊος – proteios) que significa “de primeira magnitude”. As proteínas são quimicamente polímeros de unidades monoméricas contendo um grupo amina ($-NH_2$), um grupo ácido carboxílico ($-COOH$) e um radical R ligados a um átomo de carbono, monômeros estes denominados aminoácidos. Desta forma, podemos definir uma proteína como uma cadeia de aminoácidos ligados covalentemente uns aos outros semelhantes às contas de um colar, sendo que esta ligação ocorre entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxila do aminoácido seguinte, denominada ligação peptídica.

Na natureza, há vinte tipos de aminoácidos que diferem pelo radical R e que compõem cada tipo de proteína. Diferentes proteínas apresentam diferentes



seqüências de aminoácidos constituindo o que é conhecido como sua estrutura primária.

As proteínas podem ser classificadas em três tipos: fibrosas, de membrana e globulares onde cada tipo de proteína apresenta sub-estruturas estáveis designadas por α -hélice, β -folhas e fita aleatória que constituem motivos estruturais que formam a estrutura secundária da proteína. Esta estrutura de motivos se rearranja espacialmente, enovelando-se na chamada estrutura terciária da proteína, definindo a conformação dos monômeros protéicos. Estes monômeros protéicos podem por sua vez associarem-se formando dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc..., dando origem à estrutura quaternária da proteína.

As proteínas geralmente mantem a estrutura nativa (estado biologicamente ativo) em soluções com pH próximo do pH neutro e temperatura entre 20-40 °C, sendo estas as condições típicas no ambiente celular (Chan & Dill, 1993). Sob condições não fisiológicas as proteínas perdem sua conformação, desenovelando-se, processo este conhecido como desnaturação.

Estudos de conformação protéica vem sendo realizados desde o início deste século. Em 1902, Emil Fisher e Frans Hofmeister concluíram independentemente e de forma inédita, que proteínas são cadeias de aminoácidos ligados uns aos outros por meio de interações covalentes (Haschemeyer & Haschemeyer, 1973; apud Dill, 1990). Em 1911, Chick e Martin foram os primeiros a descobrir o processo de desnaturação e distingui-lo do processo de agregação (Dill, 1990). Por volta de



1925, o processo de desnaturação protéica era atribuído à hidrólise da ligação do peptídio (Wu & Wu, 1925; Anson & Mirsky, 1925; apud Dill, 1990) ou então à desidratação da proteína (Robertson, 1918; apud Dill, 1990).

Foram levantadas então, várias hipóteses a fim de explicar o processo de desnaturação protéica. O fisiologista chinês Wu propôs a hipótese de que a proteína nativa envolve um padrão de enovelamento da cadeia regular e repetido em uma rede tridimensional estabilizado por ligações covalentes, um tanto semelhante a um cristal. Wu afirmou: “Desnaturação é a quebra de ligações frágeis. Em vez de a proteína estar compacta, torna-se uma estrutura difusa. A superfície é alterada e as moléculas do interior são expostas” (Wu, 1929). “Desnaturação é a desorganização da estrutura da molécula de proteína, ocorrendo uma mudança de um arranjo regular rígido para um arranjo irregular difuso, de cadeia flexível e aberta” (Wu, 1931).

O interesse pelo processo de desnaturação fez com que alguns pesquisadores estudassem conformações de proteínas em solução aquosa. Eles supunham que neste tipo de solução, que é o habitat natural da maioria das proteínas, a afinidade das moléculas de água por pontes de hidrogênio endógenas à proteína arrebataria as α -hélices e levaria a cadeia polipeptídica ao estado de fita aleatória.

Esta afirmação foi investigada por Poul Doty e seus colaboradores na Harvard University, em conjunto com E.R. Blout, da Children's Cancer Research Foundation, em Boston, na década de 50.



Nessa investigação foram empregados polipeptídios sintéticos como modelos de laboratório para as proteínas mais complexas e sensíveis. Quando Blout e colaboradores aprenderam a polimerizá-los em um comprimento suficiente (de 100 a 1000 unidades de aminoácidos) e analisaram através de polarimetria seu comportamento em solução, imediatamente puderam observar que os polipeptídios podiam conservar suas α -hélices. Observaram também que podiam desenovelar a α -hélice ajustando a acidez da solução, sendo este um processo que podia ser revertido fazendo os polipeptídios, de novos desordenados (random coil), enrolarem-se novamente em hélice (Doty, 1957).

Destes experimentos, puderam confirmar que polipeptídios em solução aquosa, apresentam duas conformações naturais que transitam reversivelmente de uma para outra, dependendo das condições do meio.

As mudanças conformacionais dos polipeptídeos em solução aquosa levaram os cientistas a questionar quais são as forças que induzem o enovelamento de proteínas e estabiliza o estado nativo. Para achar este estado nativo estável da proteína, dever-se-ia calcular todas as possíveis conformações da cadeia polipeptídica e fazer-se-ia o somatório da energia livre de todas as interações interatômicas da proteína e interações da proteína com o solvente. Mas isto não é possível, devido ao fato do número de conformações estatisticamente possíveis (N) de uma cadeia crescer exponencialmente com o comprimento desta cadeia: $N \sim \mu^n$; onde n é o número de monômeros da cadeia e $\mu \approx 2-6$ é o número de isômeros



rotacionais, determinado para cada tipo de monômero que compõe o polímero (Chan & Dill, 1990). A fim de exemplificar o grau de dificuldade em encontrar o estado nativo estável, suponhamos uma proteína com cerca de 170 aminoácidos e apenas um tipo de ligação entre eles, formando uma cadeia linear, na qual calculamos todos os possíveis isômeros variando apenas a posição na cadeia de qualquer dos vinte aminoácidos. O número de possibilidades para este polipeptídio é tal que teríamos moléculas suficientes para encher um cubo de aresta 10^{50} anos-luz (Raw & Colli, 1967) ! Considerando que esta proteína leve um tempo mínimo da ordem de 10^{-9} s para atingir cada conformação, o tempo necessário para que ela passe por todas as conformações é da ordem de 10^{34} anos, tempo este equivalente a 10^{24} vezes a idade estimada do universo físico conhecido. Esta escala de tempo e o número de conformações não é compatível com as observações experimentais, na qual a cadeia polipeptídica flutua entre conformações alternativas e colapsa para uma estrutura única numa escala de tempo variando desde nanosegundo até segundo. Há, portanto, uma discordância em relação a escala de tempo e ao número de conformações estatisticamente possíveis previstos pelo modelo de enovelamento aleatório. Esta discordância é conhecida como “paradoxo de Levinthal”, nome dado em homenagem a Cyrus Levinthal, quem primeiro levantou esta questão (Levinthal, 1968).

Portanto, na tentativa de explicar quais são as forças e qual a natureza dessas forças que direcionam o colapso da cadeia polipeptídica, modelos vem sendo



propostos. Linderstrom-Lang, em 1924, foi quem propôs o primeiro modelo quantitativo das interações eletrostáticas na proteína nativa. Neste modelo, baseado na teoria de Debye-Huckel, se demonstra que os processos eletrostáticos são função do pH e/ou da força iônica do meio (Linderstrom-Lang, 1924; apud Dill, 1990). A partir de novas descobertas sobre enovelamento de proteínas, o modelo de Linderstrom-Lang foi aperfeiçoado e complementado a tal ponto que, na década de 30, o pareamento de íons (interações eletrostáticas) foi considerado o fator dominante para a estabilidade de proteínas (Mirsky & Pauling, 1936; Eyring & Stearn, 1939 & Cohn et al, 1933; apud Dill, 1990).

A partir do final da década de 30, percebeu-se que não só as forças de longo alcance (interações eletrostáticas) mas também as forças de curto alcance (interação do tipo íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, London-Van der Waals e as pontes de hidrogênio) contribuíam para estabilizar a estrutura protéica. Hoje, considera-se que as forças eletrostáticas e o efeito hidrofóbico (tendência que alguns grupos químicos apresentam em minimizar sua superfície de contato com água) são os principais fatores que conduzem o enovelamento de proteínas (Dill, 1990).

A importância das interações de curto alcance fez com que pesquisadores investigassem o efeito da água de hidratação na energética de estabilização de proteínas, sendo Colombo e Timasheff alguns dos cientistas que estudam a possível contribuição da mudança da atividade de água aos efeitos de desnaturação protéica



(Colombo & Rau, 1992; Timasheff, 1992), efeito este que já foi desprezado por outros cientistas a algumas décadas atrás (Tanford, 1968).

O avanço dos trabalhos sobre enovelamento de proteínas acabou revelando que os polipeptídeos podem reter algumas estruturas ordenadas (Tanford, 1968). Recentemente, experimentos envolvendo técnicas de cinética de desnaturação e renaturação de pequenas proteínas globulares (como a mioglobina e o Citocromo-c, por exemplo) nas quais a troca de Hidrogênio por Deutério é monitorada por NMR bidimensional têm mostrado a existência de estados intermediários entre os estados nativo e desnaturado (Roder et al., 1988; Udgaonkar & Baldwin, 1988, 1990; Miranker et al., 1991, Kuroda, 1993). Nestes estados intermediários foi evidenciado que os mesmos contém boa parte dos elementos da estrutura secundária mas muito pouco da estrutura terciária (Kuroda, 1993). Esses experimentos sustentam o modelo estrutural (Kim & Baldwin, 1982; Kuroda, 1993) e sugerem que as interações entre estruturas secundárias são de suma importância no mecanismo de enovelamento (Wetlaufer, 1973, apud Kuroda, 1993; Karplus & Weaver, 1976; apud Kuroda, 1993).

Apesar de Experimentos de equilíbrio de enovelamento de proteínas também têm demonstrado a existência de estados intermediários. Este estado ou estes estados intermediários apresentam características estruturais bastante interessantes, como se fosse uma mudança de estado físico da fase sólida para a fase líquida (fusão) e



foram denominados de “glóbulo derretido”, do inglês, “molten globule” (Ohgushi & Wada, 1983; Ptitsyn, 1987; Kuwajima, 1989, apud Kataoka et.al, 1993).

O estado de “molten globule” foi observado para várias proteínas em condições específicas de pH e/ou concentração intermediária de desnaturante. Dentre estas, pode-se citar a α -lactalbumina (Dolgikh et al., 1985, apud Kuroda, 1993; Kuwajima, 1977; Baum et al., 1989), β -lactamase (Goto & Fink, 1989), anidrase carbônica bovina (Brazhnikov et al., 1985, apud Kuroda, 1992), Citocromo-c (Ohgushi & Wada, 1984; Potekhin & Pfeil, 1989; Jeng et al., 1990).

Alguns pesquisadores referem-se também a estados intermediários “pré - molten-globule” baseados em estudos de experimentos de ressonância magnética nuclear (NMR), medidas de viscosidade, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, estados estes conhecidos como MFU (Midsized folding units) (Jeng & Englander, 1991). Estes intermediários MFUs foram detectados em estudos com Citocromo-c, com baixa concentração de sal e baixo pD (onde D é deutério), sendo que nestas condições, essas unidades de enovelamento de Citocromo-c apresentaram uma constante de equilíbrio em torno de 10 (Jeng & Englander, 1991). Apesar de se ter encontrado estes estados intermediários, ainda é um tanto quanto incerta a definição do estado de “molten globule”.

A importância do “molten globule” em estudos de equilíbrio de enovelamento em solução nos dá a informação do balanço entre as forças que estabilizam os estados conformacionais intermediários ao processo. Este é



fundamental para o entendimento das forças que determinam o correto enovelamento protéico.

O balanço das forças responsáveis pelo enovelamento da proteína numa estrutura altamente compacta (estrutura nativa) está codificado na sequência de aminoácidos. Caso conhecessemos com detalhes os fatores e forças que determinam este balanço, estaríamos aptos a prever a estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína a partir da primária. Essa correspondência entre sequência e estrutura é conhecida como "segundo código genético", haja visto que o primeiro código genético é a correspondência entre as sequências de bases nitrogenadas do DNA e a sequência de aminoácidos da proteína formada. Portanto, conhecer as forças responsáveis pelo enovelamento da proteína e o equilíbrio dessas forças é de fundamental importância para entendermos este segundo código genético, e desta forma, podemos inferir as leis básicas da física e da química que são responsáveis para manter a proteína na sua estrutura nativa.

Para tanto, devemos conhecer a estrutura tridimensional da proteína no estado nativo, o que não é um processo simples. Hoje já são conhecidas mais de 700 estruturas de proteína definidas com resolução atômica a partir de cristalografia de raio-x e experimento de ressonância magnética nuclear (NMR) multidimensional (Chan & Dill, 1993).

A importância de se conhecer e solucionar o problema do enovelamento de proteína acaba se refletindo de forma considerável sobre a biotecnologia. Em

1.2-O Segundo Código Genético

O balanço das forças responsáveis pelo enovelamento da proteína numa estrutura altamente compacta (estrutura nativa) está codificado na sequência de aminoácidos. Caso conhecessemos com detalhes os fatores e forças que determinam este balanço, estaríamos aptos a predizer a estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína a partir da primária. Essa correspondência entre sequência e estrutura é conhecida como “segundo código genético”, haja visto que o primeiro código genético é a correspondência entre as sequências de bases nitrogenadas do DNA e a sequência de aminoácidos da proteína formada. Portanto, conhecer as forças responsáveis pelo enovelamento da proteína e o equilíbrio dessas forças é de fundamental importância para entendermos este segundo código genético, e desta forma, podermos inferir as leis básicas da física e da química que são responsáveis para manter a proteína na sua estrutura nativa.

Para tanto, devemos conhecer a estrutura tridimensional da proteína no estado nativo, o que não é um processo simples. Hoje já são conhecidas mais de 700 estruturas de proteína definidas com resolução atômica a partir de cristalografia de raio-x e experimento de ressonância magnética nuclear (NMR) multidimensional (Chan & Dill, 1993).

A importância de se conhecer e solucionar o problema do enovelamento de proteína acaba se refletindo de forma considerável sobre a biotecnologia. Em

princípio, este conhecimento permitiria o desenvolvimento de novas proteínas com aplicações abrangendo um vasto campo como a produção de novos catalizadores químicos e biológicos, biosensores, produtos farmacêuticos e cosméticos, hormônios, conversores de energia luminosa em energia química ou energia química em energia cinética, estocagem de energia e/ou de informação, etc.

Fora da célula, a proteína alcança uma forma compacta nativa estável numa escala de tempo infinitamente menor quando comparada a escala de tempo necessária para atingir a conformação nativa, caso a busca desta forma fosse ao acaso. Baseado neste fato podemos supor que, pelo menos in vivo, a busca não é aleatória e sim dirigida por forças que conduzem a proteína para a forma nativa estável.

Estas forças são de natureza eletrostática, sendo classificadas em forças de longo alcance (interação coulombiana, podendo ser de dois tipos: ligação iônica e ligação covalente (coordenada)) e forças de curto alcance (interação dipolo-dipolo, ion-dipolo, ion-dipolo induzido, dipolo-dipolo induzido, forças de dispersão London-Van der Waals, pontes de hidrogênio). Na verdade nós não representamos a força em si, mas sim o potencial de interação entre as cargas, pois o módulo da força é descrito pelo produto do vetor campo elétrico pela carga elétrica (q) e o módulo do vetor campo elétrico é expresso pelo negativo do gradiente do potencial ($\vec{E} = -\nabla U$). A energia para os diferentes tipos de interações está apresentada na tabela a seguir:



1.3-Forças que Dirigem o Enovelamento de Proteína

Tipo de Interação	Exemplo	Ordem de Magnitude (KJ/mol)
-------------------	---------	-----------------------------

Liga De acordo com o paradoxo de Levinthal, uma pequena cadeia polipeptídica pode ter acesso a um número enorme de possíveis estados conformacionais, pressupondo aleatória a distribuição desses estados. Entretanto, no interior da célula, a proteína alcança uma forma compacta nativa estável numa escala de tempo infinitamente menor quando comparada a escala de tempo necessária para atingir a conformação nativa, caso a busca desta forma fosse ao acaso. Baseado neste fato podemos supor que, pelo menos in vivo, a busca não é aleatória e sim dirigida por forças que conduzem a proteína para a forma nativa estável.

Ponte Estas forças são de natureza eletrostática, sendo classificadas em forças de longo alcance (interação coulombiana, podendo ser de dois tipos: ligação iônica e ligação covalente (coordenada)) e forças de curto alcance (interação dipolo-dipolo, íon-dipolo, íon-dipolo induzido, dipolo-dipolo induzido, forças de dispersão London-Van der Waals, pontes de hidrogênio). Na verdade nós não representamos a força em si, mas sim o potencial de interação entre as cargas, pois o módulo da força é descrito pelo produto do vetor campo elétrico pela carga elétrica (q) e o módulo do vetor campo elétrico é expresso pelo negativo do gradiente do potencial ($\vec{E} = -\nabla U$). A energia para os diferentes tipos de interações está apresentada na tabela a seguir:



Tabela-1 Ordem de magnitude de interações intermolecular

Tipo de Interação	Exemplo	Ordem de Magnitude (KJ/mol)
Ligação Covalente	H-H	200-800
Ligação Iônica	Na⁺Cl⁻	40-400
Íon- dipolo	Na⁺(H₂O)_n	4-40
Dipolo-Dipolo	SO₂ SO₂	0.4-4
Dipolo-Dipolo induzido	HCl C₆H₆	0.4-4
Íon-Dipolo induzido	Na⁺ C₆H₆	0.4-4
Dispersão	He He	4-40
Ponte de Hidrogênio	H₂O.....H₂O	4-40

Vamos agora descrever cada uma das interações citadas na tabela anterior:

1.3.1-Forças de longo alcance

As forças de longo alcance podem ser descritas pelo potencial coulombiano dado por:

$$U = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0 \cdot D} \cdot \frac{q}{r}$$

sendo:



q a carga elétrica local

$\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$

D é a constante dielétrica do meio

r é a distância entre cargas

As forças de longo alcance apresentam uma alta energia de interação e são uma das principais forças que estabilizam o estado nativo das proteínas.

1.3.2-Forças de curto alcance

As forças de curto alcance podem ser representadas como segue:

a) Interação dipolo-dipolo

É um tipo de interação que ocorre exclusivamente entre moléculas polares, ou seja, moléculas que apresentam momento de dipolo permanente. As moléculas polares interagem umas com as outras nos estados sólidos e líquidos de modo semelhante ao dos íons de uma substância eletrovalente. Esta interação é energeticamente fraca, mas estabiliza significativamente estruturas de proteínas (Voet & Voet, 1990) e depende, naturalmente, do tamanho das cargas dipolares (Slabaugh & Parsons, 1982).

Considerando a interação eletrostática entre dois dipolos μ_i e μ_j separados por uma distância r_{ij} , a energia de interação será dada por:



c) Dipolo-dipolo induzido

$$U_{ij} = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0 \cdot D} \cdot \frac{2}{3} \frac{\mu_i^2 \cdot \mu_j^2}{r^6 kT}$$

onde

μ o momento de dipolo permanente

k é a constante de Boltzmann e vale $k=1.381 \times 10^{-23}$ J/K

T é a temperatura na escala Kelvin

b) Interação íon-dipolo

Ocorre entre um íon e uma molécula polar. A energia de interação explica parcialmente as ligações em muitos compostos por coordenação. A solubilidade de diversas substâncias iônicas em água é o principal resultado da ligação íon-dipolo que o soluto forma com o solvente (Slabaugh & Parsons, 1982). O potencial é expresso por:

$$U = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0 \cdot D} \cdot \frac{ne\mu}{r^2}$$

onde

n é o número de cargas elétricas

e corresponde a carga elétrica elementar e vale em módulo $|e|=1.6 \times 10^{-19}$ C

c) Dipolo-dipolo induzido

Este tipo de interação é também conhecida como força de dispersão de London. As moléculas dipolares induzem a formação de um dipolo nas moléculas que seriam não polares tendo como consequência interações extremamente fracas. Este tipo de interação é normalmente encontrado em soluções onde o solvente é polar e o soluto é apolar. O potencial é dado por:

$$U = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0 \cdot D} \cdot \frac{\alpha\mu^2}{r^6}$$

onde

α é a polarizabilidade da molécula não polar

d) Interação ion-dipolo induzido

Uma carga elétrica é capaz de induzir um momento de dipolo numa molécula não polar (ligação íon-dipolo induzido), onde este tipo de interação explica alguns complexos por coordenação. O potencial é expresso por:

$$U = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0 \cdot D} \cdot \frac{1}{2} \frac{\alpha \cdot ne^2}{r^4}$$



e) Forças de Dispersão (Dipolo induzido-dipolo induzido)

Este tipo de interação é também conhecida como força de dispersão de London-Van der Waals. Esta interação ocorre entre moléculas inertes e não polares onde o momento de dipolo médio é nulo, mas o momento de dipolo instantâneo não é nulo, sendo este, capaz de induzir um momento de dipolo instantâneo numa molécula vizinha com certo sincronismo produzindo assim, atração entre as moléculas. Este tipo de atração só pode ser explicado pela teoria quântica que, aliás, é a única que dá a descrição correta dessas forças atrativas, consequência da troca de fótons virtuais entre os elétrons e o núcleo de uma molécula neutra e aqueles componentes de outra molécula neutra (Lopes, 1993). Através de cálculos de mecânica quântica, o físico Erwin Schrödinger deduziu a diferença de energia potencial entre dois dipolos como se fossem osciladores harmônicos e obteve a expressão para o potencial de interação entre esses dipolos, como segue:

$$U = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{1}{D} \frac{1}{r^6} \cdot \left\{ 2\alpha\mu^2 + \frac{2\mu^4}{3KT} + \frac{3}{4}h\nu_0\alpha^2 \right\}$$

onde

h a constante de Planck e vale $h=6.626 \times 10^{-34}$ J.s

ν_0 a frequência natural do oscilador



f) Pontes de Hidrogênio

Um tipo particular de interação de grande importância no campo da biofísico-química são as pontes de hidrogênio. Este tipo de interação é uma atração intermolecular na qual os átomos de hidrogênio formam “ligações em pontes” entre átomos de elevada eletronegatividade (Russel, 1982). Esta interação ocorre devido a ligação do átomo de hidrogênio a outro átomo altamente eletronegativo. O átomo de alta eletronegatividade mantém junto de si o elétron do átomo de hidrogênio, diminuindo consideravelmente a densidade da nuvem eletrônica ao redor do núcleo do íon hidrogênio (que é um próton). Assim, o hidrogênio fica praticamente com a carga positiva, atraindo desta forma, elétrons pertencentes a átomos eletronegativos que se encontram na sua vizinhança através de interação dipolo-dipolo. Desta maneira, o átomo de hidrogênio serve para ligar dois outros átomos ao mesmo tempo.

De uma forma geral, as pontes de hidrogênio são ligações relativamente fracas quando comparadas a ligação covalente (menos de 40 KJ/mol) e assumem um papel central na determinação das propriedades de muitos compostos como o ponto de ebulição de substâncias moleculares (Chang, 1990).



1.4-A importância das forças de curto alcance no enovelamento

protéico

Ao estudarmos as forças que conduzem o enovelamento da proteína bem como sua estabilidade, devemos colocar a seguinte questão: Se as interações de curto alcance são extremamente fracas quando comparadas com as ligações iônicas e covalentes, porque elas são tão importantes? A resposta é que sendo as interações de curto alcance fracas em relação as interações iônicas e covalentes, elas podem ser facilmente quebradas e reconstruídas sob condições fisiológicas onde os processos dinâmicos que envolvem as macromoléculas biológicas necessitam de uma mudança rápida das interações intra e inter-molecular na qual sem isto, seria impossível ter surgido a vida na Terra.



1.5-O papel da água na estrutura de proteínas

A água é o composto químico mais abundante encontrado nos organismos vivos perfazendo cerca de 60 a 90% do peso total das diferentes células, tecidos e organismos. A maioria dos tecidos apresentam em média 75% de água (Lehninger, 1977) o que implica que as estruturas moleculares como proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e pequenos metabólitos se encontram em solução aquosa.

A água é indispensável aos seres vivos devido as seguintes propriedades físico-químicas:

- Estrutura molecular plana-angular onde o ângulo entre as ligações H-O e H-O vale 104.5° . Sendo o oxigênio altamente eletronegativo, esta estrutura se torna dipolar e pode se orientar através de um campo elétrico externo. Essa orientação contribui significativamente para a redução da intensidade do campo elétrico no pareamento de íons.
- Estrutura molecular bastante organizada devido principalmente as pontes de hidrogênio que a água forma entre si ou com outras moléculas em solução. Estas pontes de hidrogênio conferem a molécula de água algumas propriedades físicas peculiares como altos valores para o ponto de fusão, ebulição, calor específico, calor latente de fusão e vaporização, constante dielétrica etc. Comparada com outros solventes orgânicos, a água também apresenta alta viscosidade relativa e



alta tensão superficial (Matheus & van Holde, 1990), propriedades estas com enormes implicações para os sistemas vivos.

- A água se comporta como solvente de grande parte das substâncias encontradas nos sistemas biológicos. Esta incrível capacidade que a água tem de dissolver compostos iônicos e moleculares se deve principalmente a tendência de formar pontes de hidrogênio e por sua característica dipolar. Há certos grupos químicos que apresentam uma alta capacidade de formar pontes de hidrogênio com as moléculas de água, sendo conhecidos como moléculas hidrofílicas. Estes grupos são carboxilas, amina, éster, cetona, sulfidrilas entre outros.

Não são só pontes de hidrogênio que a água forma com os compostos em solução, apresentando também, uma interação do tipo íon-dipolo com compostos iônicos. Para um composto carregado eletricamente ou um composto iônico colocado em água, um sal, por exemplo, as interações entre os cátions e os ânions deste sal tornam-se relativamente fracas pois, a molécula de água (que é um dipolo) orienta-se em volta dos íons em solução. O átomo de oxigênio da água corresponde ao polo negativo e tende a se agrupar ao redor dos cátions existentes em solução enquanto o átomo de hidrogênio da água corresponde ao polo positivo e tende a se agrupar ao redor dos ânions, blindando desta forma, os íons da solução. Este efeito de blindagem é o responsável pela alta solubilidade de eletrólitos em solução aquosa fazendo com que tanto o cátion quanto o ânion da solução sejam hidratados. Esta

detergente, podem formar micelas em solução aquosa (Voet & Voet, 1990) onde a



camada de moléculas de água que cercam estes íons é denominada “água de hidratação”.

As macromoléculas biológicas, como as proteínas, também apresentam cargas elétricas em sua superfície que são “blindadas” pela água de hidratação que as cercam.

Já as substâncias não polares são pouco solúveis na água ou até mesmo insolúveis, como os hidrocarbonetos, uma vez que estes não formam nem pontes de hidrogênio, nem interações iônicas com a água. De fato, a dissolução de um hidrocarboneto em água requer uma apreciável quantidade de energia para romper a estrutura organizada da água líquida, que se mantém estabilizada por pontes de hidrogênio, e criar cavidades na solução que acomodem este hidrocarboneto. Estas cavidades são criadas graças à reorganização da água em estruturas altamente organizadas denominadas clatratos. Assim sendo, os hidrocarbonetos em solução tendem a escapar da água, organizando-se de tal forma que sua superfície de contato com a água seja mínima. Esta interação é conhecida como interação hidrofóbica.

A interação hidrofóbica não tem uma descrição em termos de energia potencial e desta forma, alguns autores preferem designá-la como efeito hidrofóbico, que pode ser definido como as influências que substâncias não polares causam no solvente a fim de minimizar sua superfície de contato com a água. Por outro lado, moléculas anfífilas que tem porções polares e apolares, como sabão e detergente, podem formar micelas em solução aquosa (Voet & Voet, 1990) onde a



parte hidrofílica está exposta a água e a parte hidrofóbica está escondida. Uma vez que a proteína nativa em solução aquosa se comporta como uma micela onde grande parte dos resíduos não polares das cadeias laterais não estão em contato com a água, podemos deduzir que as interações hidrofóbicas devem ser um fator determinante na estruturação de proteína em solução aquosa. Hoje sabemos que as interações hidrofóbicas juntamente com as interações de longo alcance são as principais responsáveis pelo enovelamento da proteína e pela estabilidade do estado nativo (Chan & Dill, 1993; Kauzmann, 1958)

Capítulo 2

2.1-O Citocromo-c

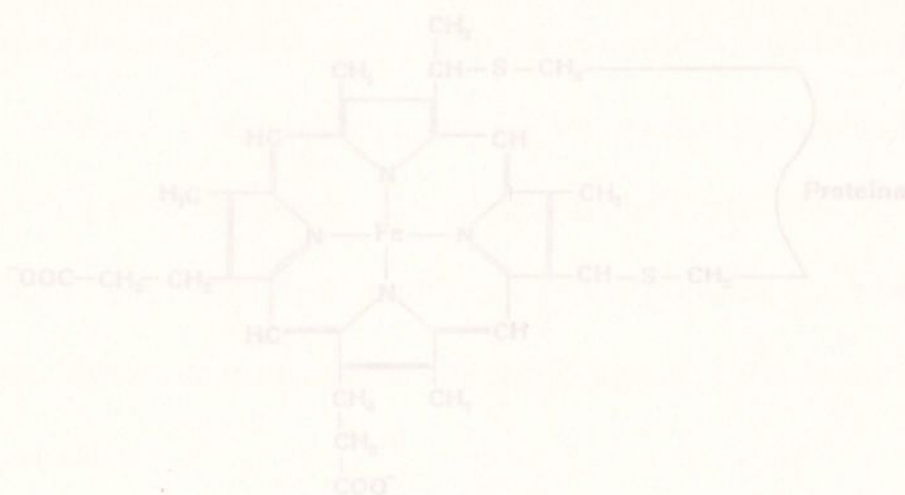
Citocromo é a designação dada a um conjunto de proteínas encontradas em todos os organismos aeróbios, sendo que o conteúdo de citocromos de um tecido de mamífero é proporcional a sua atividade respiratória. Desta forma, tecidos como o músculo cardíaco é rico em citocromos enquanto o fígado, o rim e cérebro possuem menor quantidade destas proteínas, e a pele e os pulmões, menor quantidade ainda (Smith et al, 1985). Podemos diferenciar um tipo de citocromo do outro através de seus espectros de absorção ótica no visível e designamos cada proteína com espectro característico por a, b, c ou por um subscrito.

Os citocromos se comportam como transportadores de elétrons por uma mudança reversível do estado de oxidação do átomo de ferro do grupo heme da forma ferroso para férrica. O transporte de elétrons ocorre nas mitocôndrias e/ou no retículo endoplasmático e, talvez, em algum outro tipo de estruturas de membrana.

Dentre todos os tipos de citocromos, o Citocromo-c é o mais estudado. Como exemplo clássico temos o Citocromo-c de coração de cavalo que foi estudado detalhadamente por várias técnicas e cuja estrutura tridimensional foi determinada



por difração de raio-x. Este citocromo de coração de cavalo é uma proteína globular de massa molecular 12.327 g/mol contendo 104 resíduos de aminoácido (como a maioria dos citocromos-c de animais vertebrados) e um grupo heme (Fe-protoporfirina IX) ligado covalentemente por duas ligações tioéster aos resíduos cisteinil da cadeia polipeptídica. O grupo heme é um participante obrigatório dos processos respiratórios de qualquer organismo, estando totalmente imerso no interior hidrofóbico da molécula com o átomo de Ferro totalmente coordenado.

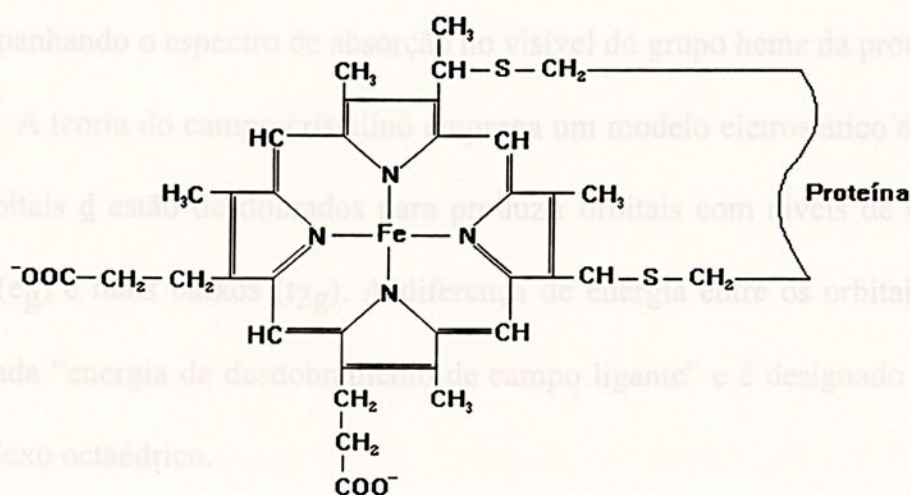


Grupo heme do Citocromo-c de coração de cavalo

Esses quatro átomos de Nitrogênio ocupam a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a coordenação do átomo de Ferro. As 5^a e 6^a posições de coordenação, normal ao plano do Heme, são ocupadas pela Histidina-18 (posição axial por um N-imidazol) e Metionina-80 (posição axial por um átomo de enxofre), respectivamente.

2.2-Origem da variação espectral do Citocromo-c

Como visto, o grupo Heme do Citocromo-c é um complexo porfirínico octaédrico com um átomo de Ferro complexado ao plano do anel por quatro átomos de Nitrogênio do anel pirrólico da porfirina.



Grupo heme do Citocromo-c de coração de cavalo

Esses quatro átomos de Nitrogênio ocupam a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a coordenação do átomo de Ferro. As 5^a e 6^a posições de coordenação, normal ao plano do Heme, são ocupadas pela Histidina-18 (posição axial por um N-imidazol) e Metionina-80 (posição axial por um átomo de enxofre), respectivamente.

O átomo de Ferro do grupo Heme é paramagnético e apresenta a configuração eletrônica $3d^6$ para Fe^{+2} e $3d^5$ para Fe^{+3} , na qual os elétrons se distribuem nos orbitais t_{2g} e e_g .

As propriedades magnéticas e espectrais do grupo Heme são explicadas com base na “teoria do campo cristalino”, desenvolvida pelo físico Hans Bethe em 1929. O estado conformacional da proteína determina estas propriedades, o que permite que se investigue as reações de enovelamento e desenovelamento do Citocromo-c acompanhando o espectro de absorção no visível do grupo heme da proteína.

A teoria do campo cristalino emprega um modelo eletrostático e prevê como os orbitais d estão desdobrados para produzir orbitais com níveis de energia mais altos (e_g) e mais baixos (t_{2g}). A diferença de energia entre os orbitais e_g e t_{2g} é chamada “energia de desdobramento de campo ligante” e é designado por Δ_0 num complexo octaédrico.

Na maioria dos casos, os orbitais d do íon metálico central não estão vazios, podendo conter até 10 elétrons, sendo que no estado fundamental de um complexo octaédrico, estes estão distribuídos entre os orbitais t_{2g} e e_g , e tendem a ocupar o estado de mais baixa energia, obedecendo a regra de Hund. Se o campo elétrico produzido pelos ligantes for fraco, Δ_0 será pequeno e os elétrons se espalharão e ocuparão todos os orbitais, mas se o campo elétrico dos ligantes for forte, Δ_0 será grande e os elétrons primeiro se emparelharão no orbital t_{2g} .



entre O número de elétrons que ocupam os orbitais d do átomo de Ferro do FerriCitocromo-c é 5, assim, o número quântico spin (S), dependendo do campo ligante e do grau de pareamento dos elétrons, pode assumir os valores: $S=1/2$, $S=3/2$ e $S=5/2$. O valor do número quântico spin assumido pelos elétrons do subnível d do átomo de Ferro do grupo heme pertencente ao Citocromo-c é $S=1/2$ para a forma nativa e $S=5/2$ para a forma desnaturada (Iizuka & Yonetani, 1970; Volkenshtein, 1981).

Logo, a origem da variação espectral do Citocromo-c durante a desnaturação é explicada e sua caracterização se deve a Dyson e Beattie (Dyson & Beattie, 1982). Eles mostraram que o estado de spin do átomo de Ferro do grupo Heme está diretamente relacionado com o grau de enovelamento protéico pois quando a proteína desnatura, ocorre mudanças na esfera de coordenação do átomo de Ferro na 5ª e 6ª posição, onde estão ligados os aminoácidos Histidina-80 e Metionina-18. No estado nativo, ambos aminoácidos Histidina-80 e Metionina-18 estão ligados covalentemente no átomo de Ferro do grupo Heme. No estado desnaturado, nem a Histidina, nem a Metionina estão coordenadas, na qual se ligam moléculas de água no lugar dos aminoácidos, levando a configuração eletrônica do orbital d do átomo de Ferro de um estado de baixo spin para um estado de alto spin. Este complexo absorve radiação eletromagnética mais energética e com maior intensidade em relação à proteína no estado nativo. Desta forma, o espectro de absorção óptico da proteína desnaturada analisado na banda de Soret (UV próximo e visível situado



entre 380nm e 420nm) está deslocado para o violeta (blue shift) e apresenta maior coeficiente de extinção molar no pico de absorção em relação ao estado nativo.

3.1-Desnaturação Ácida

Uma proteína globular compactada numa estrutura única e organizada é denominada nativa. Quando as ligações que mantêm esta estrutura se rompem, isto é, quando as ligações entre grupos protéicos internos a proteína são desfeitas, esta perde sua conformação e transita cooperativamente para um estado desordenado denominado desnaturado, podendo ao longo desta transição, existir estados intermediários entre as conformações nativa e desnaturada. Este fenómeno é conhecido como desnaturação. Nestes novos estados, grupos anteriormente escondidos no interior do glóbulo protéico são solubilizados por moléculas do solvente. A hidratação destes novos grupos deve ter uma contribuição para a estabilização energética dos estados mais desenovelados da proteína em solução.

Por outro lado, a desnaturação de uma proteína pode ser induzida pela ação de vários agentes físicos e químicos como calor, acidificação ou alcalinização da solução, radiação UV, raios-X, ureia, guanidina-HCl, etc.

Dependendo do pH do meio na qual uma proteína se encontra, sua carga elétrica resultante pode ser zero (este valor de pH é denominado de ponto isoeletrico (pI) da proteína); sua carga resultante pode ser negativa (valores de pH acima do pI) ou sua carga resultante pode ser positiva (valores de pH abaixo do pI). A protonação



Capítulo 3

3.1-Desnaturação Ácida

Uma proteína globular compactada numa estrutura única e organizada é denominada nativa. Quando as ligações que mantêm esta estrutura se rompem, isto é, quando as ligações entre grupos protéicos internos a proteína são desfeitas, esta perde sua conformação e transita cooperativamente para um estado desordenado denominado desnaturado, podendo ao longo desta transição, existir estados intermediários entre as conformações nativa e desnaturada. Este fenômeno é conhecido como desnaturação. Nestes novos estados, grupos anteriormente escondidos no interior do glóbulo protéico são solubilizados por moléculas do solvente. A hidratação destes novos grupos deve ter uma contribuição para a estabilização energética dos estados mais desenovelados da proteína em solução.

Por outro lado, a desnaturação de uma proteína pode ser induzida pela ação de vários agentes físicos e químicos como calor, acidificação ou alcalinização da solução, radiação UV, raios-X, uréia, guanidina-HCl, etc.

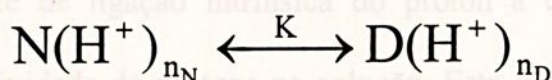
Dependendo do pH do meio na qual uma proteína se encontra, sua carga elétrica resultante pode ser zero (este valor de pH é denominado de ponto isoelétrico (pI) da proteína); sua carga resultante pode ser negativa (valores de pH acima do pI) ou sua carga resultante pode ser positiva (valores de pH abaixo do pI). A protonação



dos grupos tituláveis das proteínas faz com que sua carga líquida positiva, aumente. Consequentemente, em pH ácido, quando os grupos carboxila são neutralizados, há um aumento da repulsão eletrostática entre as cargas positivas levando à desestabilização do estado nativo e conduzindo-o ao estado desnaturado. Entretanto, nem todos os prótons ligados são responsáveis diretamente pela desestabilização conformacional da proteína necessitando de um número mínimo de prótons que se ligam a conformação nativa para que a transição ocorra, uma vez que o processo de desnaturação é cooperativo.

Sobre o efeito do pH na constante de equilíbrio conformacional

A transição entre dois estados (nativo e desnaturado) atinge um equilíbrio representado por:



O equilíbrio entre estas conformações com n_N e n_D prótons ligados aos estados N e D, respectivamente, cuja constante de equilíbrio observada ou aparente (K_{ap}) expressa em termos da concentração total de proteína no estado desnaturado e a concentração total de proteína no estado nativo é dada por:

$$K_{ap} = \frac{[D]_{TOTAL}}{[N]_{TOTAL}} \quad (1)$$

Conforme proposto por Tanford (Tanford, 1968), podemos escrever a concentração total de proteína no estado desnaturado como o somatório:



$$[D]_{TOTAL} = (D_0 + DH + DH_2 + DH_3 + \dots + DH_{n-1} + DH_n) = \sum_{i=0}^{n_D} DH_i \quad (2)$$

onde D_0 é a proteína desnaturada sem próton ligado, DH é a proteína desnaturada com um próton ligado, e assim até DH_n que representa a proteína desnaturada com n prótons ligado.

Supondo que todos os sítios de ligação da proteína sejam idênticos e independentes, a concentração total de proteína no estado desnaturado pode ainda ser representada pelo polinômio de ligação (Tanford, 1968; Cantor & Schimmel, 1980):

$$[D]_{TOTAL} = D_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_D} \quad (3)$$

onde k é a constante de ligação intrínseca do próton à cada sítio de ligação individual e, a_H a atividade de prótons na solução. Esta mesma análise pode ser feita para a concentração total de proteína no estado nativo, cujo polinômio de ligação é representado por:

$$[N]_{TOTAL} = N_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_N} \quad (4)$$

Logo, a constante de equilíbrio observada dada pela eq-1 fica, após substituírmos as equações eq-3 e eq-4, dada por:

$$K_{ap} = \frac{D_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_D}}{N_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_N}} \quad (5)$$

Se o pH da solução é muito menor que o pK do grupo ácido, $k \cdot a_H \gg 1$, a equação-5 se simplifica:

$$K_{ap} = \frac{D_0}{N_0} \cdot a_H^{(n_D - n_N)} \quad (6)$$

Esta equação nos permite calcular a dependência de $\log K_{ap}$ com o pH, dada por:

$$\left(\frac{\partial \log K_{ap}}{\partial pH} \right)_{a_i} = -(n_D - n_N) = -\Delta n \quad (7)$$

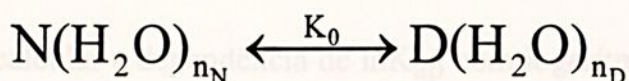
onde Δn é a diferença do número de prótons ligados entre a conformação D e a conformação N. Este tipo de equação é conhecida por equação de Linkage ou de conectividade entre o equilíbrio conformacional e a diferença do número de ligantes ligados às diferentes conformações (Wyman, 1964).

Portanto, a constante de equilíbrio aparente varia linearmente com a atividade de prótons ao menos em uma faixa de pH onde Δn permanece inalterado.

$$K = \frac{D_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_D}}{N_0 \cdot (1 + k \cdot a_H)^{n_N}} \quad (10)$$

Sobre o efeito da atividade de água na constante de equilíbrio conformacional

Por outro lado, toda vez que a transição conformacional ocorre, há variação do número de moléculas de água da camada de hidratação da proteína cujo equilíbrio é representado por:



De forma semelhante a análise feita para a ligação de prótons à macromolécula, podemos calcular a concentração total de proteína nos estados nativo e desnaturado em termos do polinômio de ligação, como segue:

$$[D]_{TOTAL} = D_0 \cdot (1 + k \cdot a_w)^{n_D} \quad (8)$$

$$[N]_{TOTAL} = N_0 \cdot (1 + k \cdot a_w)^{n_N} \quad (9)$$

onde k é a constante de ligação intrínseca de moléculas de água para cada sítio de ligação individual e a_w a atividade de água na solução e n_D e n_N o número de moléculas de água ligadas a D e N, respectivamente.

A constante de equilíbrio é:

$$K = \frac{D_0 \cdot (1 + k \cdot a_w)^{n_D}}{N_0 \cdot (1 + k \cdot a_w)^{n_N}} \quad (10)$$



3.2 Dado que todo sítio de hidratação exposto ao solvente está necessariamente hidratado, $k \cdot a_w \gg 1$ e a eq-10 se simplifica :

$$K = \frac{D_0}{N_0} \cdot a_w^{(n_D - n_N)}$$

o que nos permite calcular a dependência de $\ln K_{ap}$ com logaritmo da atividade de água, mantida a atividade de todos os outros ligantes constantes, inclusive o pH. Esta dependência é expressa por:

$$\left(\frac{\partial \ln K_{ap}}{\partial \ln a_w} \right)_{a_i} = (n_D - n_N) = \Delta n \quad (11)$$

onde Δn corresponde a diferença do número de moléculas de água ligadas entre as conformações D e N. Esta equação prediz que com o aumento da atividade da água, aumenta a constante de desnaturação. Portanto, em água pura o estado mais estabilizado é o desnaturado e à atividade de água menores, a estabilidade deste estado diminui favorecendo a formação do estado nativo.

Dependência do Potencial Químico da Água com a concentração de Solutos

Em uma solução binária, constituída de N_w moléculas do solvente e N_s moléculas do soluto, o potencial químico do solvente μ_w é dado por:

$$\mu_w = \mu_w^0 + RT \ln a_w \quad (12)$$



3.2 Efeito de Solute Neutro Sobre a Atividade da Água de Hidratação de Macromoléculas em Solução

A expressão anterior mostra um possível efeito de água sobre o equilíbrio conformacional. Colombo et al mostrou que este equilíbrio conformacional entre os estados T e R da hemoglobina é sensível à variação da atividade de água, utilizando solutos neutros como tampões da atividade deste solvente (Colombo et al; 1992, 1994, 1996).

A adição de um soluto neutro à solução de proteína faz com que o potencial químico da água na fase solução diminua em relação ao potencial químico da água de hidratação e, desta forma, o sistema fica momentaneamente fora do equilíbrio. Para reestabelecer o equilíbrio, moléculas de água migram da camada de hidratação (fase de maior potencial químico) para a solução (fase de menor potencial químico) acompanhadas de um consequente rearranjo conformacional da proteína.

Dependência do Potencial Químico da Água com a concentração de Solutos

Em uma solução binária, constituída de N_W moléculas do solvente e N_S moléculas do soluto, o potencial químico do solvente μ_W é dado por:

$$\mu_W = \mu_W^O + RT \ln a_W \quad (12)$$



onde μ_w^0 é o potencial químico do solvente puro. Para soluções ideais, a atividade do solvente à baixa concentração do soluto pode ser confundida com a fração molar do solvente, χ_w , dada por:

$$\chi_w = \frac{N_w}{N_w + N_s}$$

ou

$$\mu_w - \mu_w^0 = RT \ln a_w = RT \ln \chi_w = RT \ln(1 - \chi_s)$$

onde χ_s é a fração molar do soluto à baixa concentração de soluto. Como,

$$\ln(1 - \chi_s) \approx -\chi_s$$

temos:

$$\ln a_w \approx -RT\chi_s \quad (13)$$

mostrando que a atividade de água diminui com o aumento da concentração de soluto dissolvidos em solução.

A atividade do solvente também está relacionada à outras propriedades da solução como a pressão osmótica Π , por exemplo, dada pela relação:

$$\Pi \bar{V}_w = RT\chi_s \quad (14)$$

onde $\bar{V}_w$ é o volume molar da água.



Capítulo-4

4.1-Material e Métodos

Reagentes—Citocromo-c de coração de cavalo é um produto da United State Biochemical Corporation, lot:67743, cat:14125, peso molecular-12 327 g. Como soluto neutro, foi usado Sorbitol (D-Glucitol) da Calbiochemical corporation®, CA92037, lot:080690, cat:56755, peso molecular: 182,17 g. O agente desnaturante usado foi HCl (Ácido Clorídrico fumegante) P.A, Merck.

Experimento de Equilíbrio de Desnaturação Acompanhado por espectroscopia de absorção no visível

—Os espectros de absorção de Citocromo-c no visível na região de Soret foram obtidos, ou em um espectrofotômetro Hitachi U-2 000 UV-Visível ou então em um espectrofotômetro Cary UV-Visível Varian, modelo 3E, com cela termostatzada para cubetas de 1 cm de caminho óptico e volume de 3 mL. A temperatura usada em todo experimento foi de 20 ± 1 °C. O pH foi medido num Radiômetro pHmetro Corning pH/ion analyser 350 usando eletrodo de vidro e calomelano calibrado com tampões fosfato, fitalato e tetroxalato (pH 7,00, 4,00 e 2,13, respectivamente, para 20 °C). A solução usada nos experimentos de titulação espectrofotométrica foram preparados com água bidestilada e desionizada. A concentração de Citocromo-c para o trabalho espectrofotométrico foi da ordem de 5×10^{-6} Molar. As curvas de absorção para cada pH ajustado no intervalo entre 7 e 2



foram medidas na região do visível entre 350 nm e 700 nm. A concentração da solução de HCl do estoque usado como agente desnaturante foi de 0,1 M, 0,5 M e 1,0 M, sendo que este foi adicionado à amostra protéica em alíquotas de 10 μ L para cada valor de pH lido. A curva de absorção do Citocromo-c nativo apresenta um pico em 408,6 nm com um coeficiente de extinção molar $\epsilon_{408,6} = 1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e, no estado desnaturado, apresenta um pico de absorção em 394,4 nm com um coeficiente de extinção molar $\epsilon_{394,4} = 1,90 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Goto et al, 1990). As absorbâncias medidas em 394,4 nm, 408,6 nm e 400,5 nm (ponto isobéstico) em função do pH foram analisadas com modelos termodinâmicos de equilíbrio de desnaturação.

Nesta figura, mostramos uma série de espectros de absorção de uma solução 5 μ M de Citocromo-c + HCl, obtidos a vários valores de pH entre pH 7,00 e pH 2,00. Pode-se notar também que abaixo de um pH~2,5 há o aparecimento de um ponto isobéstico em $\lambda=400,5 \text{ nm}$



Capítulo 5

5.1-Resultados

5.1.1-Desnaturação na presença e ausência de 2,5 M de Sorbitol

Os espectros mostrados na figura-1 apresentam as características espectrais típicas ao Citocromo-c descritas anteriormente. O espectro de absorção óptico de Citocromo-c na região de Soret, de 350 a 450 nm, sonda o estado de spin do átomo de Ferro do grupo Heme, estado este que está diretamente relacionado com o grau de enovelamento protéico (Dyson & Beattie, 1982). Quando titulamos a solução Citocromo-c com ácido e acompanhamos o espectro de absorção na região do visível na banda de Soret, notamos que a medida que o pH diminui, a intensidade do pico de absorção em 408,6 nm, característico do estado nativo, diminui de intensidade, deslocando-se para o violeta (Blue Shift). Concomitantemente, ocorre um aumento da absorbância em comprimentos de onda menores com o aparecimento cada vez mais pronunciado de um pico em 394,4 nm, característico do estado desnaturado.

Nesta figura, mostramos uma série de espectros de absorção de uma solução 5 μ M de Citocromo-c - HCl, obtidos à vários valores de pH entre pH 7.00 e pH 2.00. Pode-se notar também que abaixo de um pH~2,5 há o aparecimento de um ponto isobéstico em $\lambda=400,5$ nm



A fim de evidenciar o aparecimento deste ponto isobéptico, os espectros mostrados na figura-1 foram desmembrados na região de pH alto (7 - 2,47) e pH baixo (2,47 e 2), conforme mostrado nas figuras-2 e 3, respectivamente. A existência de um ponto isobéptico é indicativa da transição entre duas espécies cromóforas (Ewing, 1972).

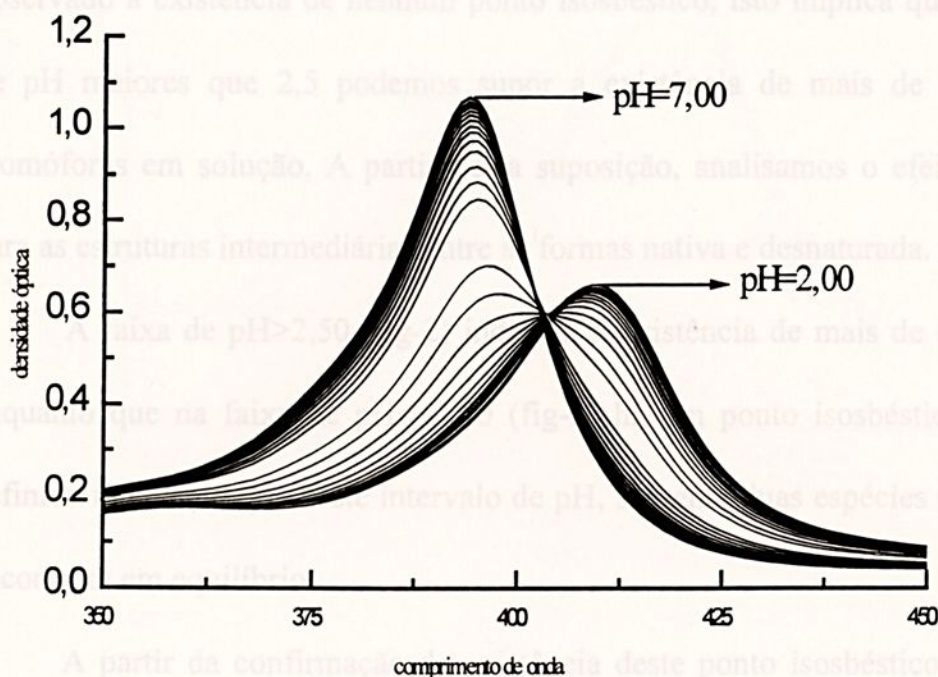
Como na região de pH variando entre 7,00 até próximo de 2,50 não foi observado a existência de nenhum ponto isobéptico, isto implica que para valores de pH maiores que 2,5 podemos ter a presença de mais de duas espécies cromóforas em solução. A partir desta suposição, analisamos o efeito de sorbitol para as estruturas intermediárias entre as formas nativa e desnaturada.

Abaixo de pH > 2,50, a existência de mais de duas espécies, enquanto que na faixa de intervalo de pH, as espécies cromóforas se encontram em equilíbrio.

A partir da confirmação da existência deste ponto isobéptico na região de baixo pH, faremos as suposições de que:

a) A transição ocorre entre três espécies: a nativa (N), a intermediária (I) e a desnaturada (D) para valores de pH maiores que ~2,50 e;

Fig-1: Variação do espectro de absorção óptica na região do visível do Citocromo-c, devido a variação do pH da solução entre 7 e 2.



A fim de evidenciar o aparecimento deste ponto isobéptico, os espectros mostrados na figura-1 foram desmembrados na região de pH alto (7 - 2,47) e pH baixo (2,47 e 2), conforme mostrado nas figuras-2 e 3, respectivamente. A existência de um ponto isobéptico é indicativa da transição entre duas espécies cromóforas (Ewing, 1972).

Como na região de pH variando entre 7,00 até próximo de 2,50 não foi observado a existência de nenhum ponto isobéptico, isto implica que para valores de pH maiores que 2,5 podemos supor a existência de mais de duas espécies cromóforas em solução. A partir desta suposição, analisamos o efeito de sorbitol para as estruturas intermediárias entre as formas nativa e desnaturada.

A faixa de $\text{pH} > 2,50$ (fig-2) indica a coexistência de mais de duas espécies, enquanto que na faixa de $\text{pH} < \sim 2,50$ (fig-3) há um ponto isobéptico muito bem definido indicando que neste intervalo de pH, somente duas espécies cromóforas se encontram em equilíbrio.

A partir da confirmação da existência deste ponto isobéptico na região de baixo pH, faremos as suposições de que:

- a) A transição ocorre entre três espécies; a nativa (N), a intermediária (I) e a desnaturada (D) para valores de pH maiores que $\sim 2,50$ e;
- b) Para valores de pH inferiores a 2,50, somente a espécie intermediária (I) e a desnaturada (D), contribuem para a variação espectral.



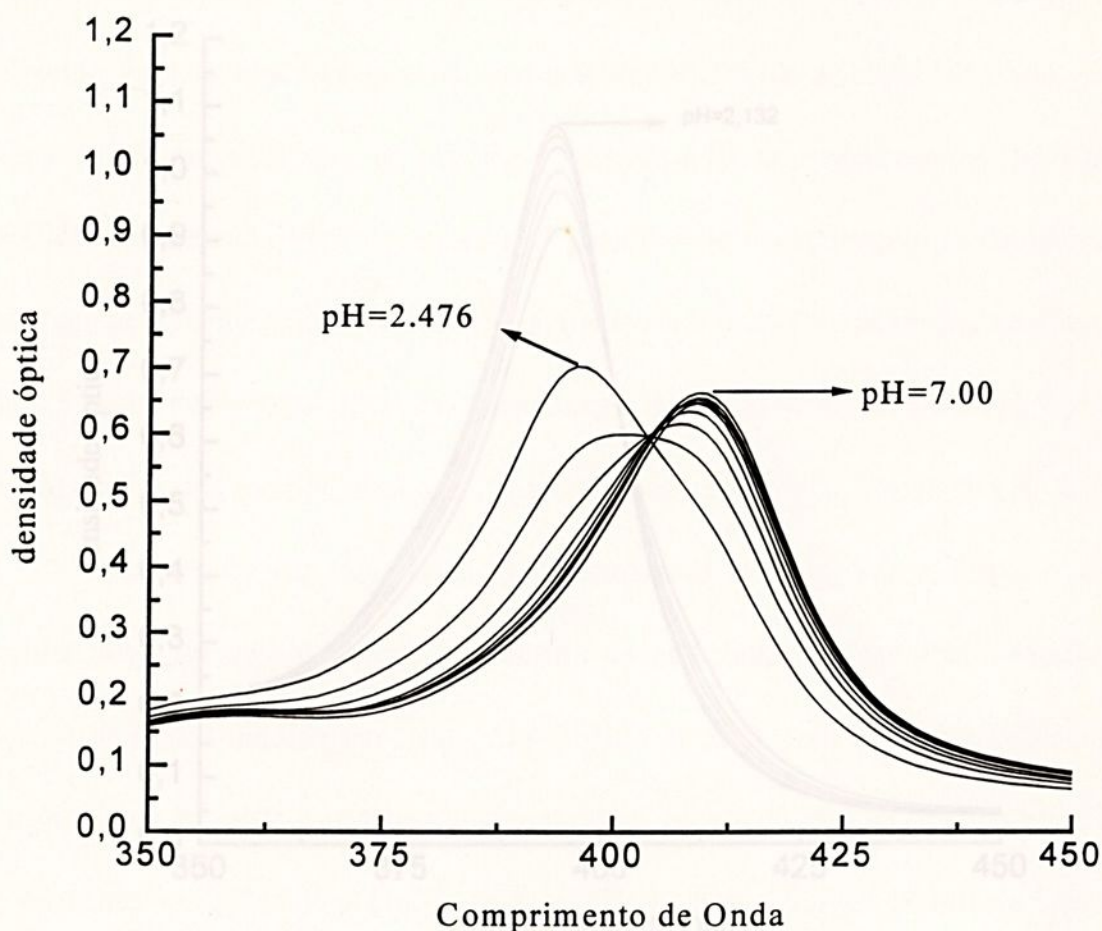


Fig-2: Espectros de absorção óptica da Citocromo-c correspondentes a desnaturação ácida no intervalo de pH variando entre 7,00 e 2,47. Estes espectros foram desmembrados da figura-1, no qual é possível perceber que, nesta faixa de pH, não aparece ponto isobéptico.

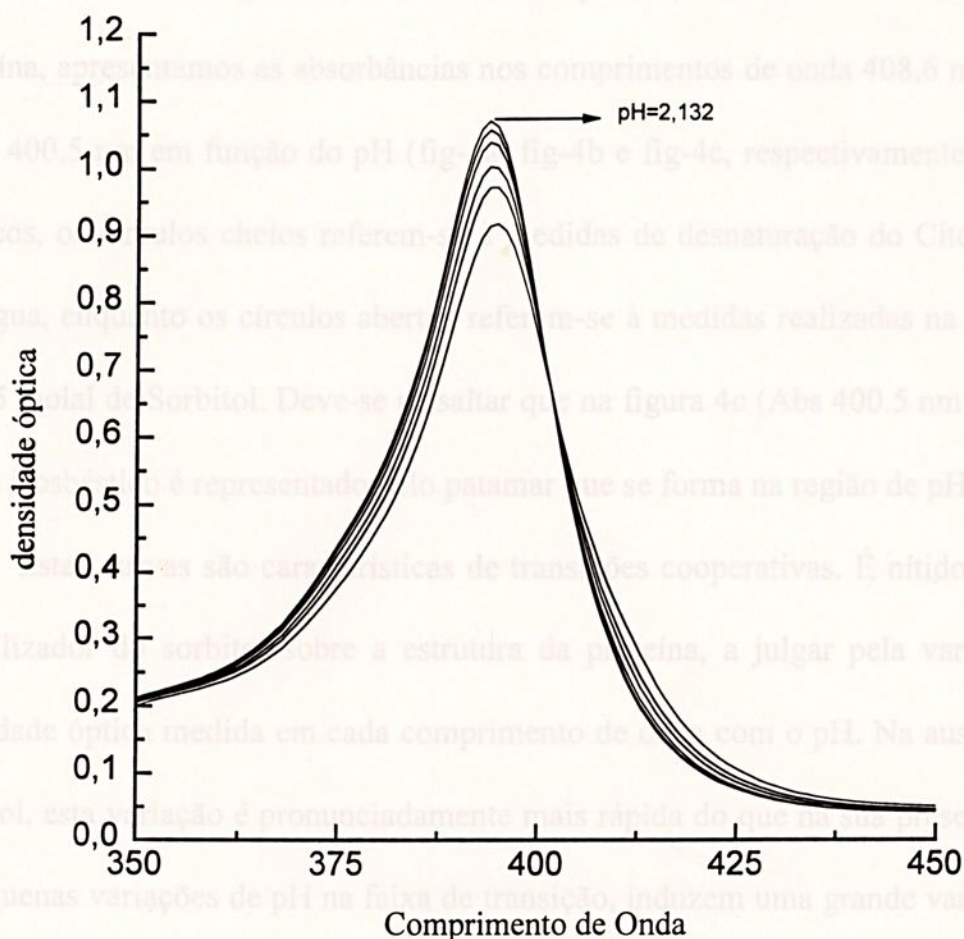


Fig-3: Espectros de absorção óptica da Citocromo-c correspondentes a desnaturação ácida no intervalo de pH variando entre 2,47 e 2,00. Estes gráficos foram desmembrados da figura-1 onde é possível perceber um ponto isobéstico em $\lambda=400,5$ nm.

Com o objetivo de acompanhar em detalhes as características da transição Nativo->Desnaturado ($N \Rightarrow D$) e o efeito da presença de sorbitol na solução de proteína, apresentamos as absorbâncias nos comprimentos de onda 408,6 nm, 394,4 nm e 400,5 nm em função do pH (fig-4a, fig-4b e fig-4c, respectivamente). Nestes gráficos, os círculos cheios referem-se à medidas de desnaturação do Citocromo-c em água, enquanto os círculos abertos referem-se à medidas realizadas na presença de 2,5 molal de Sorbitol. Deve-se ressaltar que na figura 4c (Abs 400.5 nm x pH), o ponto isobéstico é representado pelo patamar que se forma na região de $pH < 3$.

Estas curvas são características de transições cooperativas. É nítido o efeito estabilizador do sorbitol sobre a estrutura da proteína, a julgar pela variação da densidade óptica medida em cada comprimento de onda com o pH. Na ausência de sorbitol, esta variação é pronunciadamente mais rápida do que na sua presença, isto é, pequenas variações de pH na faixa de transição, induzem uma grande variação da absorbância, que caracteriza o processo de enovelamento e desenovelamento do Citocromo-c. Além disto, a desnaturação do Citocromo-c na presença de sorbitol ocorre em uma faixa de pH menor que na ausência do soluto.

Fig-4: Curvas de titulação de Citocromo-c realizadas na ausência e presença de sorbitol, acompanhadas pelas absorbâncias medidas em 408,6 nm (fig-4a), 394,4 nm (fig-4b), 400,5 nm (fig-4c) em função do pH.

3.1.2- Cálculo da Fração de Proteína no Estado Nativo

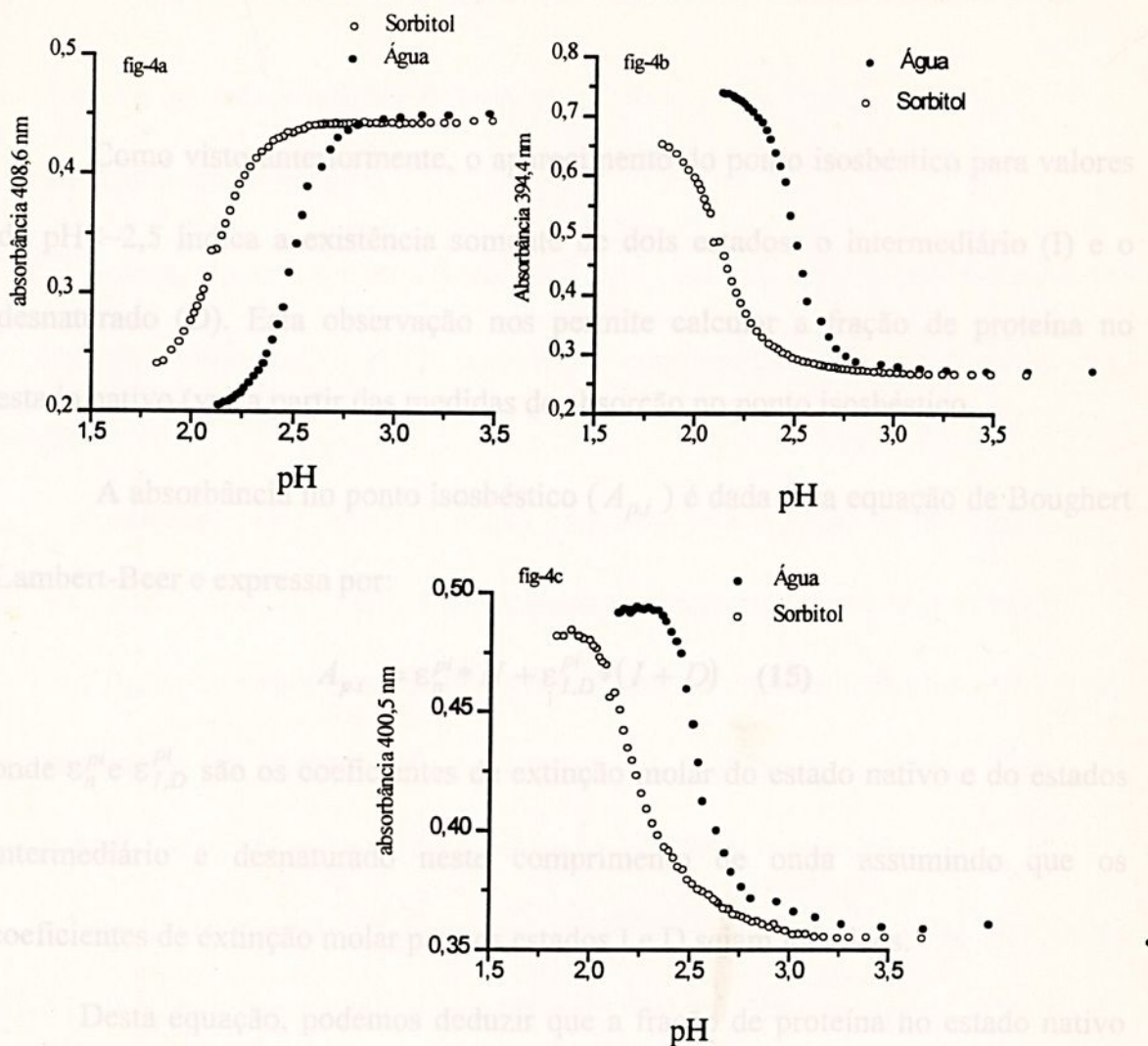


Fig-4: Curvas de titulação de Ctocromo-c realizadas na ausência e presença de sorbitol, acompanhadas pelas absorbâncias medidas em 408,6 nm(fig-4a), 394,4 nm (fig-4b), e 400,5 nm(fig-4c) em função do pH.

5.1.2-Cálculo da Fração de Proteína no Estado Nativo

Como visto anteriormente, o aparecimento do ponto isobéstico para valores de $pH < 2,5$ indica a existência somente de dois estados: o intermediário (I) e o desnaturado (D). Esta observação nos permite calcular a fração de proteína no estado nativo (y_n) a partir das medidas de absorção no ponto isobéstico.

A absorbância no ponto isobéstico ($A_{p,i}$) é dada pela equação de Boughert Lambert-Beer e expressa por:

$$A_{p,i} = \epsilon_n^{pi} * N + \epsilon_{I,D}^{pi} * (I + D) \quad (15)$$

onde ϵ_n^{pi} e $\epsilon_{I,D}^{pi}$ são os coeficientes de extinção molar do estado nativo e do estados intermediário e desnaturado neste comprimento de onda assumindo que os coeficientes de extinção molar para os estados I e D sejam idênticos.

Desta equação, podemos deduzir que a fração de proteína no estado nativo (y_n) é calculada através da seguinte relação:

$$y_n = \frac{N}{C_T} = \frac{(A_{pi}^{pH} - A_{pi}^{pH < 2,5})}{(A_{pi}^{pH \approx 7} - A_{pi}^*)} \quad (16)$$

sendo:

_ y_n a fração de proteína no estado nativo,

_ $A_{p,i}^{pH}$ a absorbância no ponto isobéstico para cada valor de pH,



$-A_{pi}^{pH<2,5}$ é o valor máximo da absorbância. Este máximo aparece quando a fração de proteína no estado nativo é nula e $A_{pi}^* = \epsilon_{I,D}^{pi} \cdot C_T = A_{pi}^{pH<2,5}$, sendo C_T a concentração total de proteína.

$-A_{pi}^{pH \approx 7}$ a absorbância no ponto isosbético a pH neutro, onde a concentração de proteína no estado nativo ($[N]$) equivale a concentração total de proteína em solução.

A expressão 16 pode ser utilizada para descrever a fração de proteína nativa (y_N) em cada valor de pH e em cada condição experimental (com e sem sorbitol).

A figura-5 mostra este comportamento onde os círculos fechados referem-se ao experimento de desnaturação na ausência de sorbitol e o círculo aberto, à desnaturação de proteína em solução contendo 2,5 molal de sorbitol.

Esta figura mostra que abaixo de $pH \sim 2,25$, a fração de proteína no estado nativo (y_N) é praticamente zero na ausência de Sorbitol. Na presença do mesmo, há em torno de 60% da proteína que permanece no estado nativo a este pH, mostrando claramente o efeito estabilizador do Sorbitol.

Na figura-6 mostramos a absorbância em 400,5 nm subtraída da contribuição, neste comprimento de onda, da absorbância devido à fração de Citocromo-c no estado nativo, isto é,

$$A_{I,D} = A_{medida} - y_N \cdot A_{N,pH_{alto}} \quad (17)$$



onde:

y_n corresponde aos valores da fig-5e;

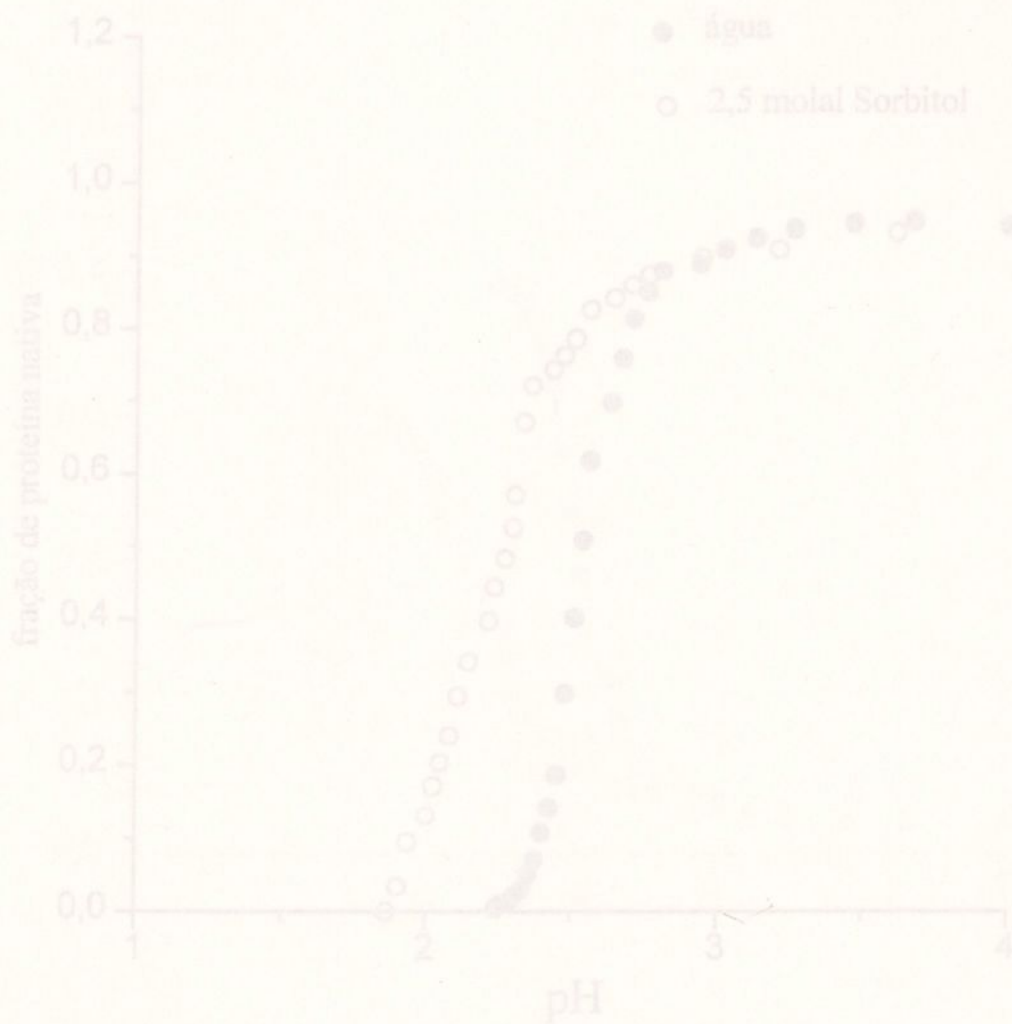


Fig-5: Valores da fração de proteína no estado nativo calculados com a equação-16 a partir da variação medida no ponto isosbético, isto é, $\lambda=400,5$ nm.

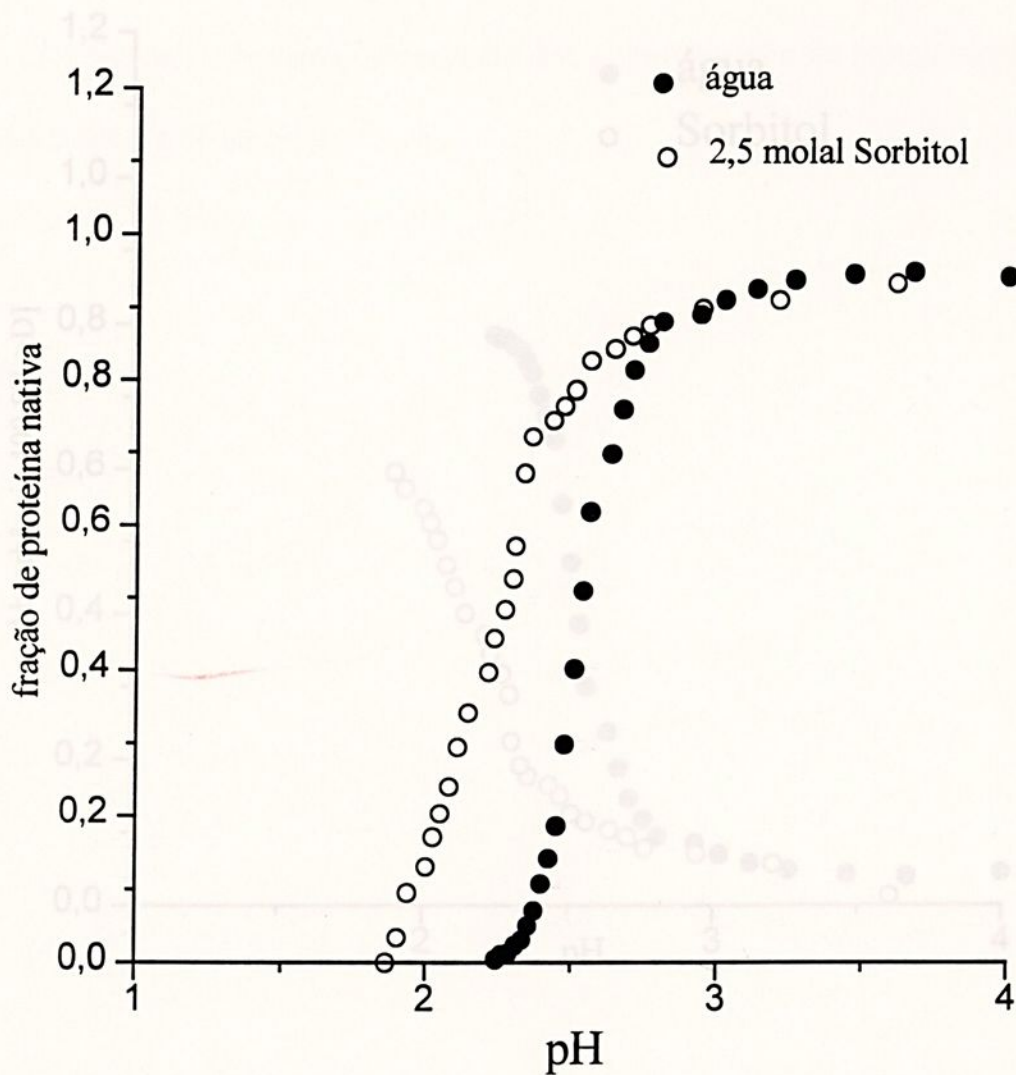


Fig-5: Valores da fração de proteína no estado nativo calculados com a equação-16 a partir da variação medida no ponto isobéstico, isto é, $\lambda=400,5$ nm.

$A_{\lambda, pH}$ é o valor da absorbância neste comprimento de onda quando o Citocromo-c encontra-se exclusivamente no estado nativo.

Esta diferença ($A_{\lambda, D}$) nos mostra como a absorbância cresce devido à formação dos estados intermediário e desnaturado.

Assim, novamente observamos que a desnaturação da proteína é dificultada pela presença de sorbitol.

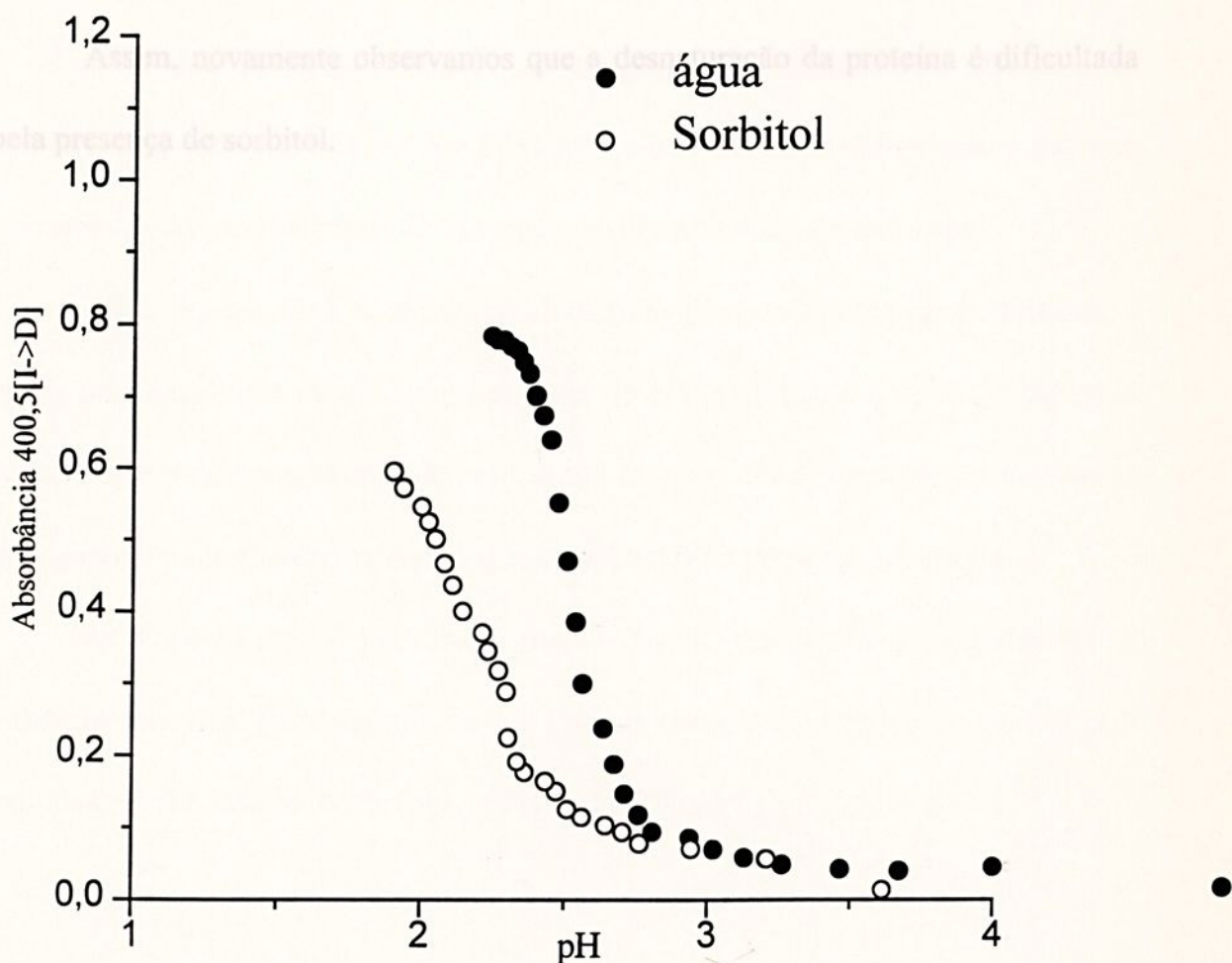


Fig-6: Curva da absorbância em 400,5 nm em função do pH para o processo de desnaturação ácida do Citocromo-c na ausência e presença de 2,5 molal de sorbitol.

– $A_{N,pH_{alto}}$ é o valor da absorbância neste comprimento de onda quando o Citocromo-c encontra-se exclusivamente no estado nativo.

Esta diferença ($A_{I,D}$) nos mostra como a absorbância cresce devido à formação dos estados intermediário e desnaturado.

Assim, novamente observamos que a desnaturação da proteína é dificultada pela presença de sorbitol.

corresponde ao pico da banda de absorção devido ao estado desnaturado

Este gráfico $\log K \times pH$ revela duas transições energeticamente distintas, a julgar pela existência de duas regiões; uma de pH mais alto e a outra de pH mais baixo; onde o comportamento de $\log K \times pH$ é linear. Este comportamento é ainda mais pronunciado quando as medidas são realizadas na presença de sorbitol.

Se considerarmos que cada região desta, representa principalmente a transição induzida pela ligação de Δn protons entre dois estados, a relação que expressa o comportamento de $\log K \times pH$ será dada por:

$$\log \frac{[\text{estado final}]}{[\text{estado inicial}]} = \log K - \Delta n \cdot pH \quad (18)$$

As retas ligando os pontos mostrados na figura-7 foram obtidos pelo ajuste dos parâmetros K e Δn desta equação aos pontos experimentais na região de pH mais alto e pH mais baixo. Os valores do melhor ajuste são mostrados na Tabela-2.

5.1.3-Comportamento da Constante de Equilíbrio com o pH

A constante de equilíbrio aparente pode ser calculada a partir dos gráficos apresentados na figura fig-4 com utilização da equação-6.

O gráfico da figura-7 mostra como o logaritmo da constante de equilíbrio aparente calculado em $\lambda=394,4$ nm varia com o pH, onde este comprimento de onda corresponde ao pico da banda de absorção devido ao estado desnaturado

Este gráfico $\log K \times \text{pH}$ revela duas transições energeticamente distintas, a julgar pela existência de duas regiões; uma de pH mais alto e a outra de pH mais baixo; onde o comportamento de $\log K \times \text{pH}$ é linear. Este comportamento é ainda mais pronunciado quando as medidas são realizadas na presença de sorbitol.

Se considerarmos que cada região desta, representa principalmente a transição induzida pela ligação de Δn prótons entre dois estados, a relação que expressa o comportamento de $\log K \times \text{pH}$ será dada por:

$$\log \frac{[\text{estado final}]}{[\text{estado inicial}]} = \log K - \Delta n \cdot \text{pH} \quad (18)$$

As retas ligando os pontos mostrados na figura-7 foram obtidos pelo ajuste dos parâmetros K e Δn desta equação aos pontos experimentais na região de pH mais alto e pH mais baixo. Os valores do melhor ajuste são mostrados na Tabela-2.



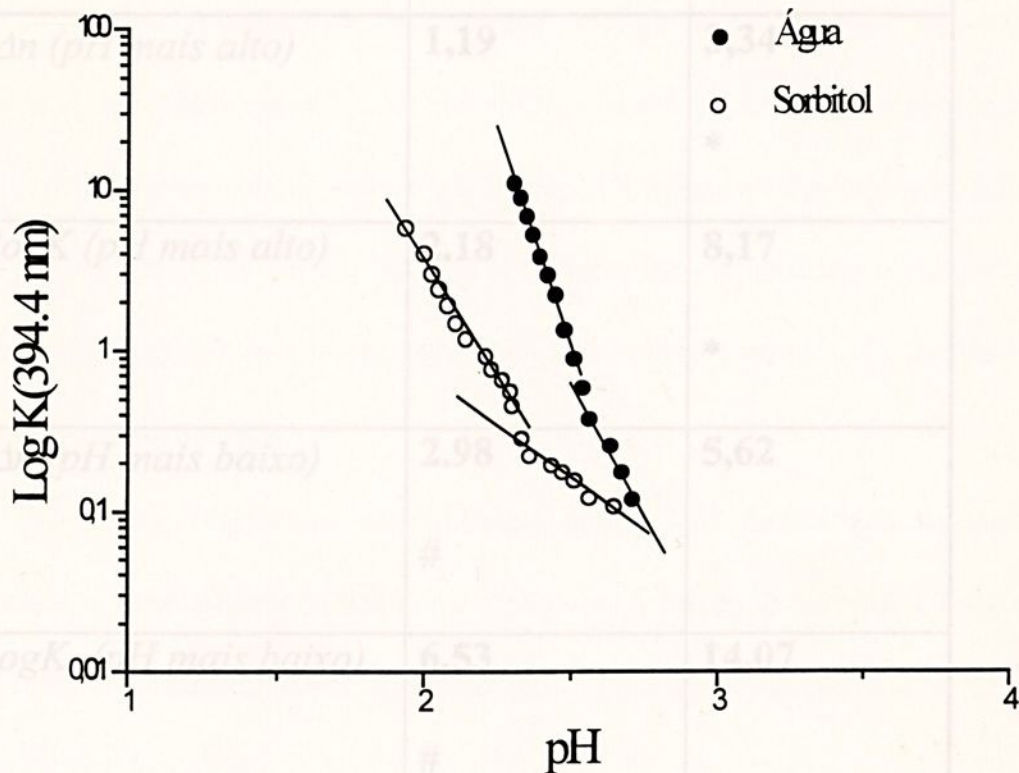


Fig-7: As curvas de $\log K$ em função do pH evidenciam claramente uma transição entre três espécies moleculares (N, I e D); uma, ocorrendo para uma região de maior pH ($N \Rightarrow I$) e a outra numa região de pH menor ($I \Rightarrow D$). Notemos a mudança da inclinação dos ajustes lineares entre as regiões de mais alto pH e mais baixo pH, na qual, esta mudança de inclinação é mais acentuada na presença de sorbitol. A barra de erro não aparece no gráfico uma vez que seu tamanho é menor que o tamanho do símbolo que representa cada ponto da curva.

5.1.4-Análise do efeito de sorbitol sobre as formas mais compactas da

	<i>fig-7 (sorbitol)</i>	<i>fig-7 (água)</i>
Δn (pH mais alto)	1,19	3,34 *
$\log K$ (pH mais alto)	2.18	8,17 *
Δn (pH mais baixo)	2.98 #	5,62
$\log K$ (pH mais baixo)	6,53 #	14,07

Tabela-2. Apresentamos os valores do ajuste dos parâmetros (Δn e $\log K$) da equação-18 dos gráficos da fig-7 para as regiões de maior valor de pH e de menor valor de pH na presença e ausência de sorbitol.

(*) Valores de Δn e $\log K$ para a desnaturação em água na região de pH mais alto.

(#) Valores de Δn e $\log K$ para a desnaturação da proteína na região de pH mais baixo.

$$\frac{A_{\lambda}}{A_{\mu}} = \frac{\epsilon_{\lambda} \cdot I + \epsilon_{D} \cdot D}{\epsilon_{\mu} \cdot C_T} = \frac{\epsilon_{\lambda}}{\epsilon_{\mu}} \cdot \frac{I}{C_T} + \frac{\epsilon_{D}}{\epsilon_{\mu}} \cdot \frac{D}{C_T} \quad (19)$$

5.1.4-Análise do efeito de sorbitol sobre as formas mais compactas da proteína

Os dados apresentados na tabela-2 e figuras precedentes demonstram claramente um efeito estabilizador do sorbitol sobre as estruturas compactas do Citocromo-c. A partir daqui vamos analisar qual a possível origem deste efeito: se ele se deve à um efeito direto, no qual o sorbitol liga-se às formas compactas da proteína, estabilizando-as, ou se este efeito é indireto, através da mudança do potencial químico da água.

Para tanto, realizamos experimentos onde o pH da solução foi mantido constante e a osmolalidade da solução variada com a adição de sorbitol. Na figura-8, mostramos o comportamento espectral do Citocromo-c a pH~2.2 à diversas concentrações de sorbitol.

A presença do ponto isobéstico em 400,5 nm permite supor que a transição entre o estado desnaturado e o mais compacto ocorre em dois estado. Além disto, podemos calcular a fração de proteína no estado desnaturado medindo a razão entre a absorbância num comprimento de onda qualquer (A_λ) e a absorbância no ponto isobéstico (A_{pi}), como segue:

$$\frac{A_\lambda}{A_{pi}} = \frac{\epsilon_I \cdot I + \epsilon_D \cdot D}{\epsilon_{pi} \cdot C_T} = \frac{\epsilon_I}{\epsilon_{pi}} \cdot \frac{I}{C_T} + \frac{\epsilon_D}{\epsilon_{pi}} \cdot \frac{D}{C_T} \quad (19)$$

Abs
1.000

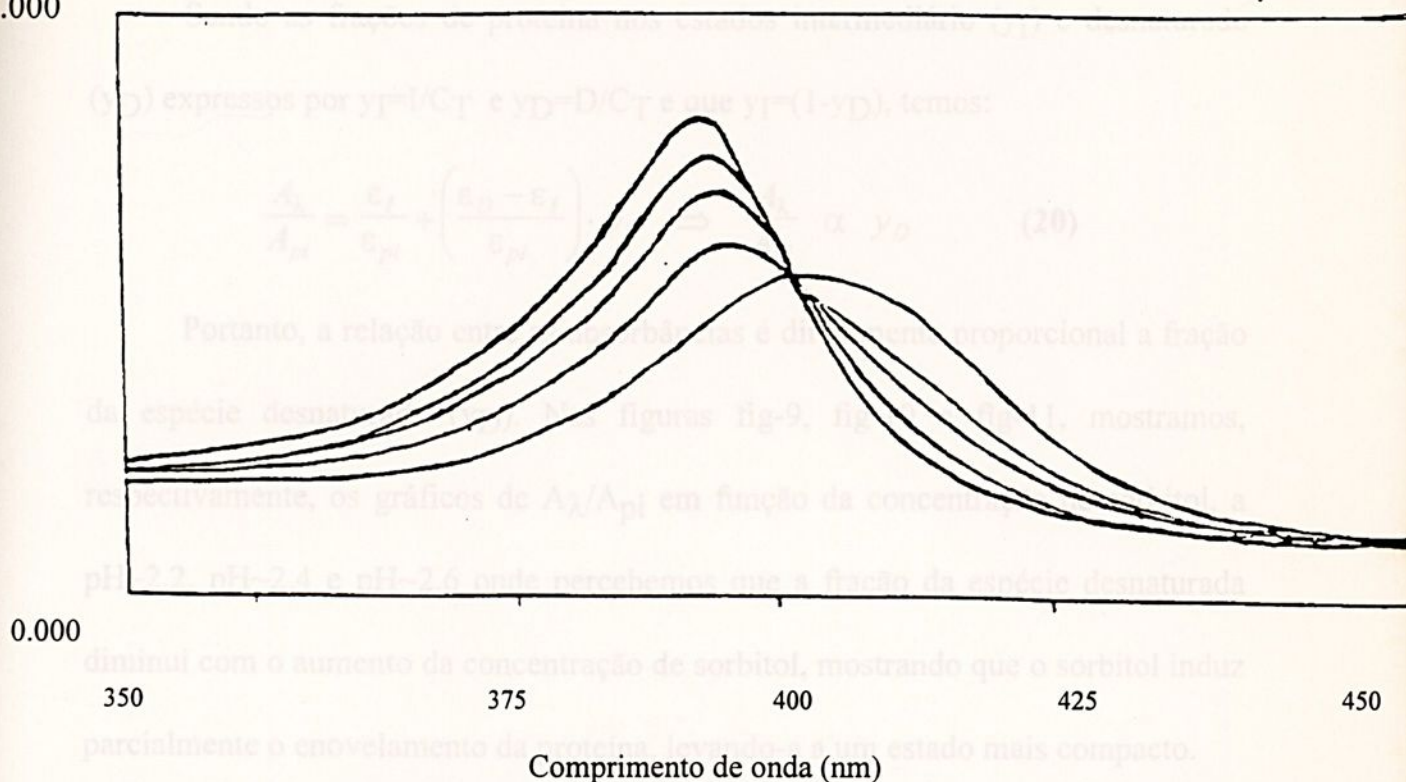


Fig-8: Espectro de absorção óptica na região do visível na banda de Soret do Citocromo-C como função da concentração de sorbitol a pH 2,20 constante. Conforme aumentamos a concentração de sorbitol, o pico em 394,4 nm que caracteriza o estado desnaturado se desloca para o vermelho (red-shift), diminuindo de intensidade, indicando que a proteína está se enovelando. Podemos notar o aparecimento do ponto isosbéstico em 400,5 nm.

Na figura fig-12, mostramos $\log K$ versus logaritmo da concentração de soluto e na fig-13, $\log K$ versus logaritmo da atividade de água expresso em termos de pressão osmótica. O gráfico $\log K$ versus $\log[\text{sorbitol}]$ apresenta um comportamento não-linear nos pHs 2,2, 2,4 e 2,6 (fig-12a, fig-12b e fig-12c, respectivamente) enquanto o gráfico $\log K$ versus pressão osmótica (fig-13a, fig-13b, fig-13c) apresenta um comportamento linear. Estes comportamentos podem ser

Sendo as frações de proteína nos estados intermediário (y_I) e desnaturado (y_D) expressos por $y_I = I/C_T$ e $y_D = D/C_T$ e que $y_I = (1 - y_D)$, temos:

$$\frac{A_\lambda}{A_{pi}} = \frac{\epsilon_I}{\epsilon_{pi}} + \left(\frac{\epsilon_D - \epsilon_I}{\epsilon_{pi}} \right) \cdot y_D \Rightarrow \frac{A_\lambda}{A_{pi}} \propto y_D \quad (20)$$

Portanto, a relação entre as absorvâncias é diretamente proporcional a fração da espécie desnaturada (y_D). Nas figuras fig-9, fig-10 e fig-11, mostramos, respectivamente, os gráficos de A_λ/A_{pi} em função da concentração de sorbitol, a pH~2.2, pH~2.4 e pH~2.6 onde percebemos que a fração da espécie desnaturada diminui com o aumento da concentração de sorbitol, mostrando que o sorbitol induz parcialmente o enovelamento da proteína, levando-a a um estado mais compacto.

Estas medidas foram realizadas a pH<3, onde os estados reinantes são o intermediário e o desnaturado; logo, o aumento da concentração de sorbitol induz o reenovelamento da proteína, estabilizando as formas mais compactas representadas pelo estado intermediário.

Na figura fig-12, mostramos logK versus logaritmo da concentração de soluto e na fig-13, logK versus logaritmo da atividade de água expresso em termos de pressão osmótica. O gráfico logK versus log[sorbitol] apresenta um comportamento não-linear nos pHs 2.2, 2.4 e 2.6 (fig-12a, fig-12b e fig-12c, respectivamente) enquanto o gráfico logK versus pressão osmótica (fig-13a, fig-13b, fig-13c) apresenta um comportamento linear. Estes comportamentos podem ser

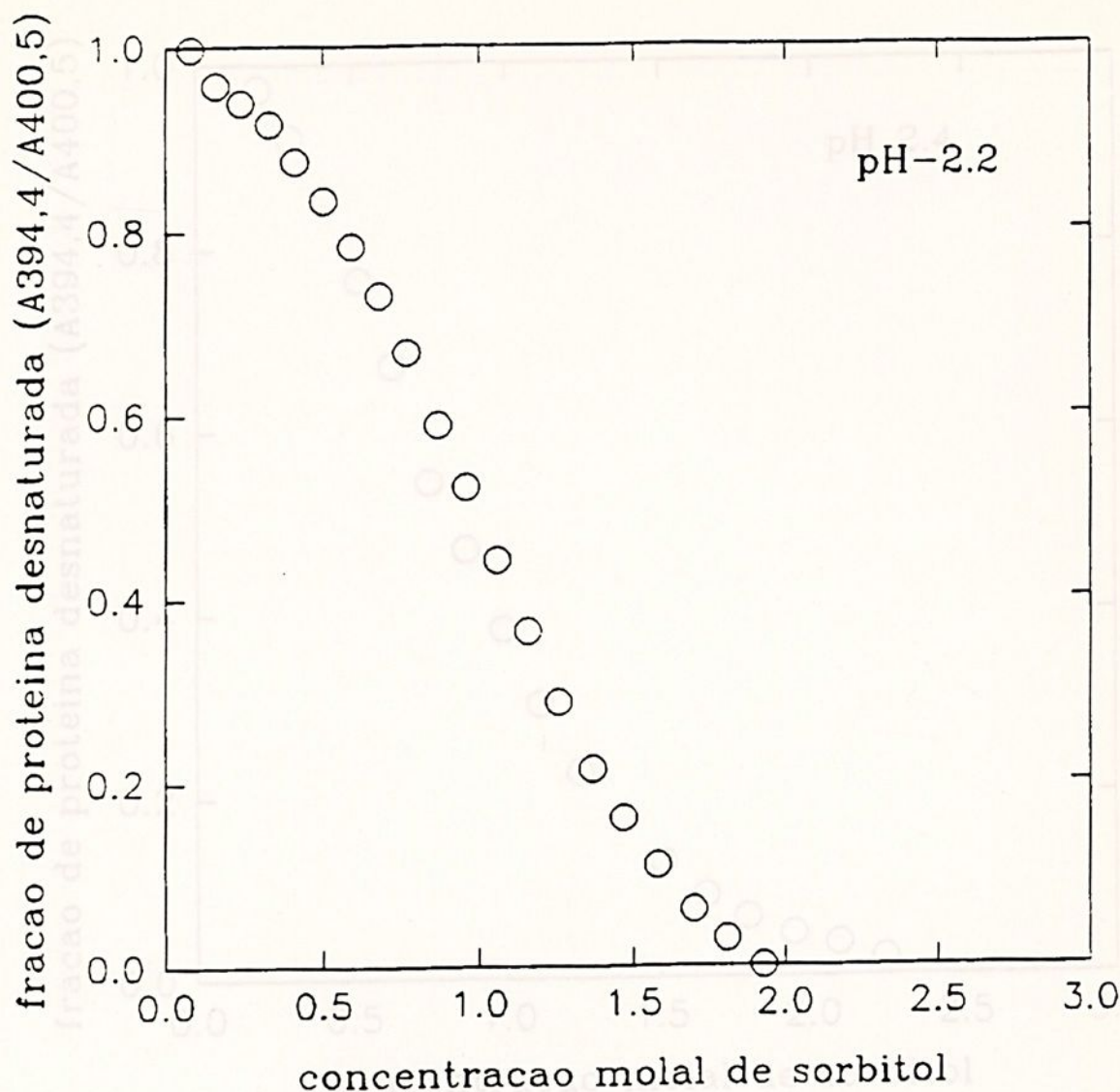


Fig-9: Variação da fração de proteína desnaturada em função da concentração de sorbitol, medida em 394,4 nm a pH 2,20 constante.

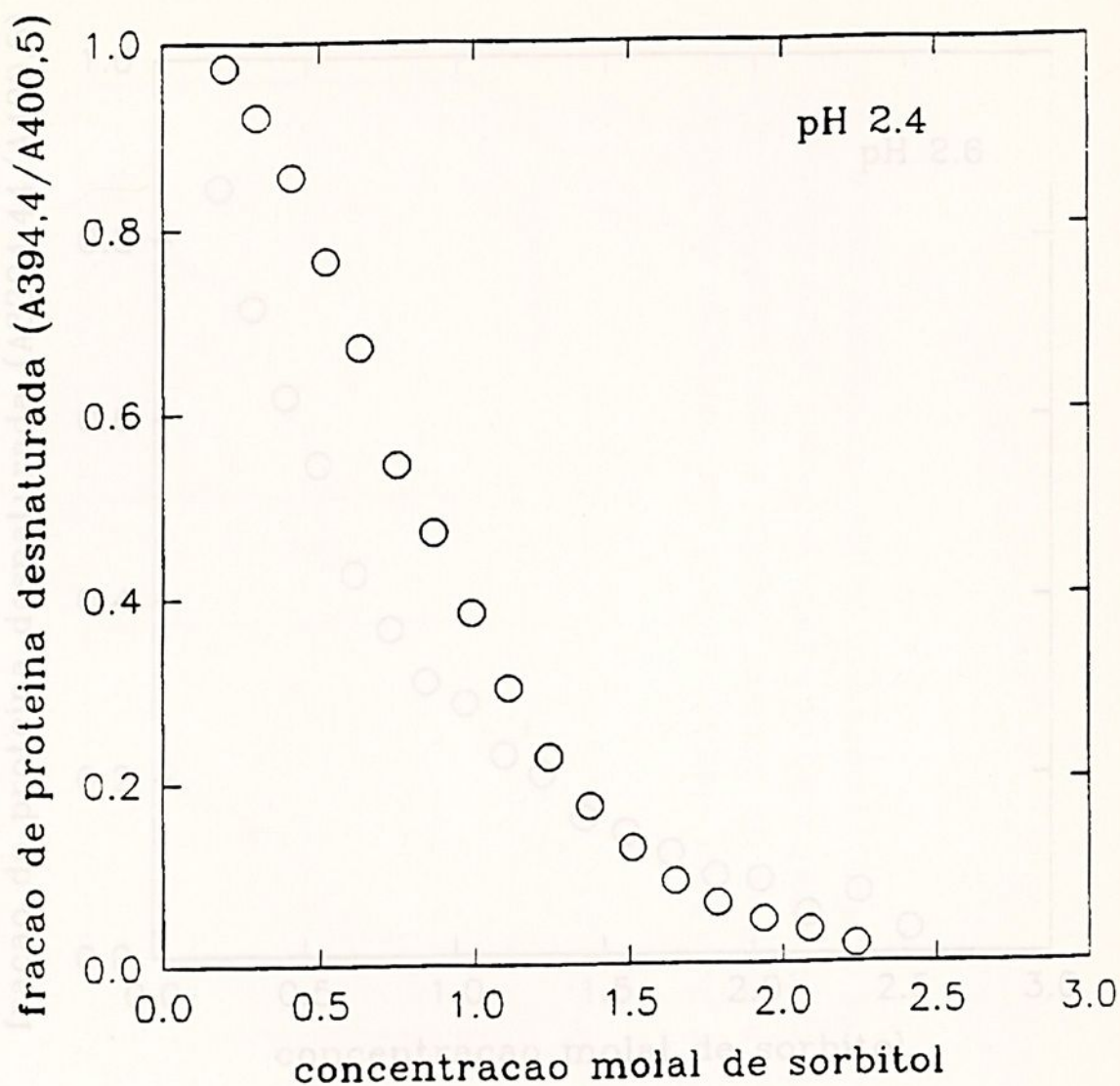


Fig-10: Variação da fração de proteína desnaturada em função da concentração de sorbitol, medida em 394,4 nm a pH 2,40 constante.

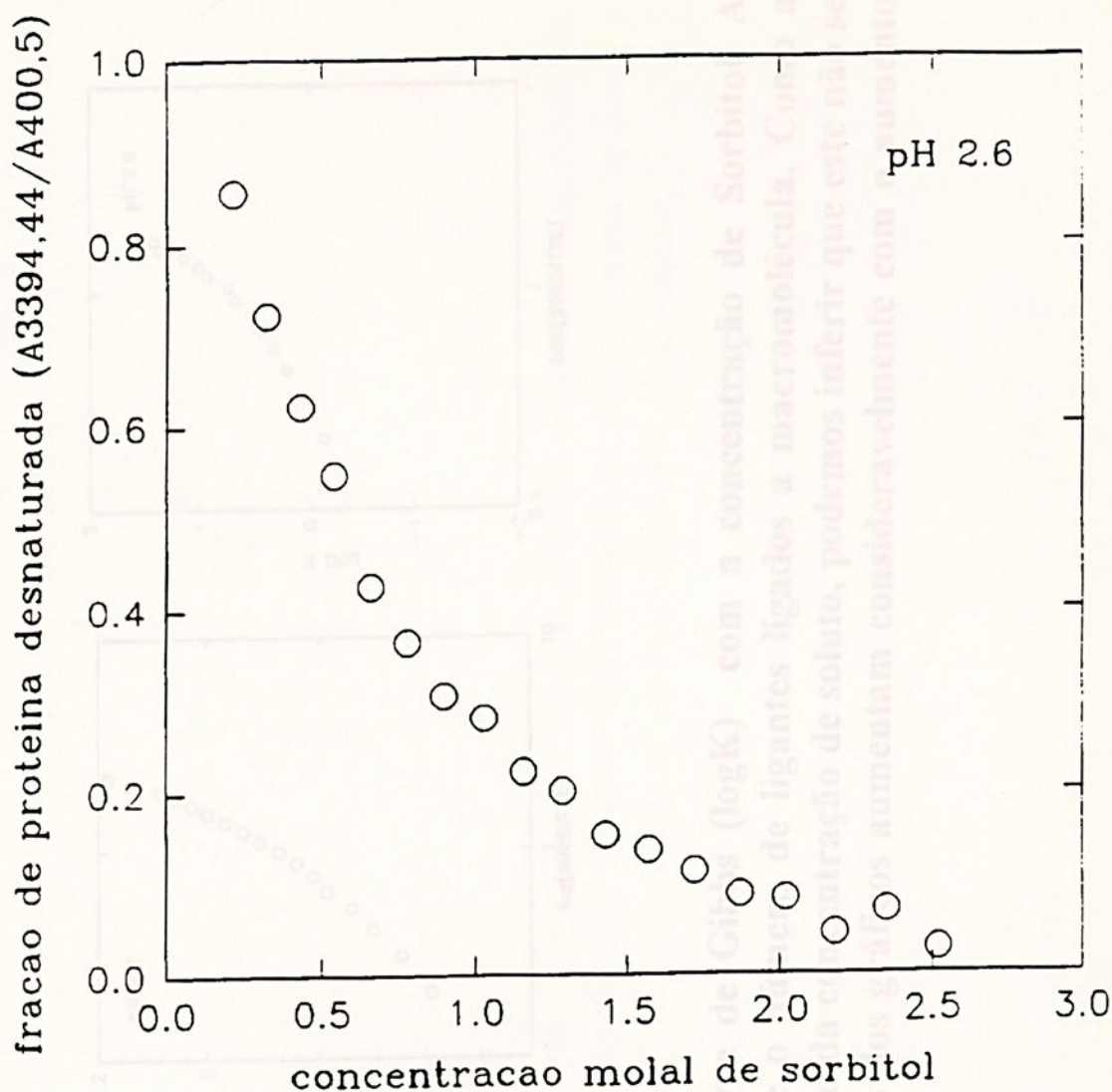


Fig-11: Variação da fração de proteína desnaturada em função da concentração de sorbitol, medida em 394,4 nm a pH 2,60 constante.

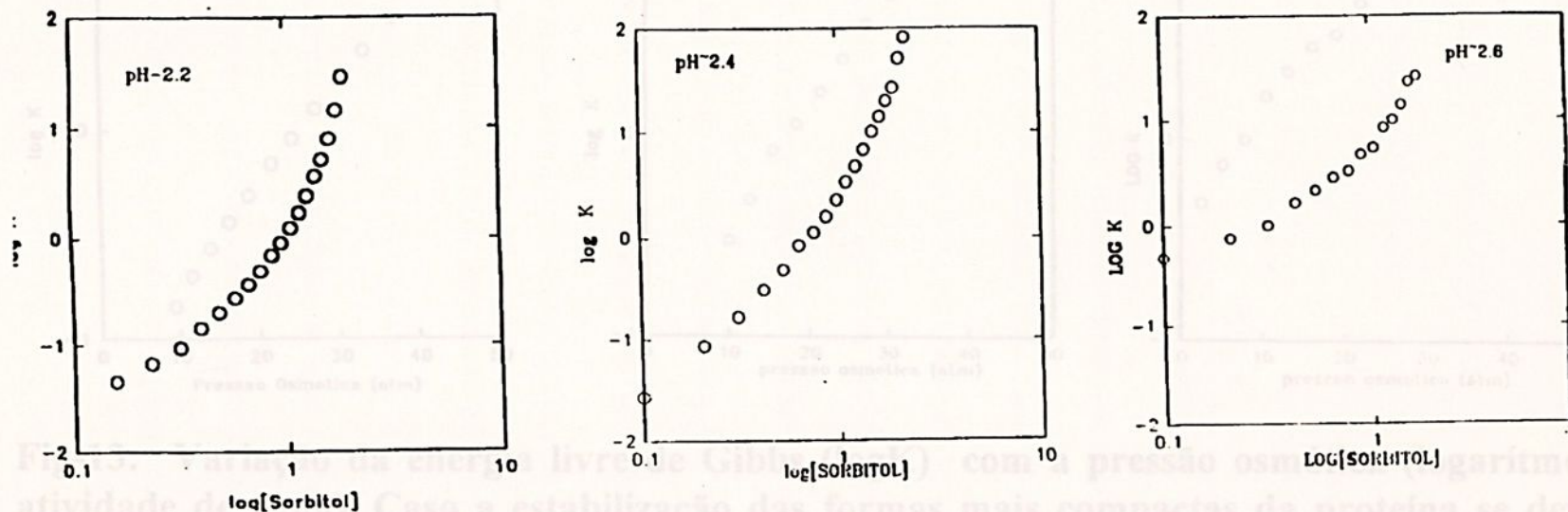


Fig-12: Variação da energia livre de Gibbs ($\log K$) com a concentração de Sorbitol. A inclinação destes gráficos fornece o número de ligantes ligados a macromolécula. Como a proteína se enovela com o aumento da concentração de soluto, podemos inferir que este não se liga a proteína pois as inclinações dos gráficos aumentam consideravelmente com o aumento da concentração de Sorbitol.

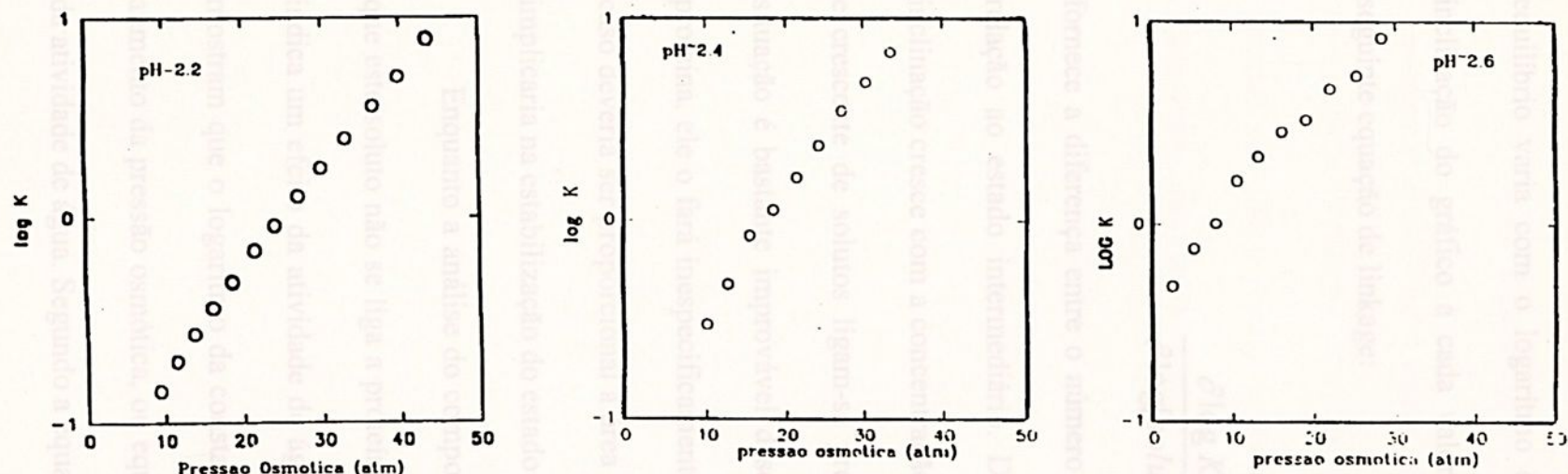


Fig-13: Variação da energia livre de Gibbs ($\log K$) com a pressão osmótica (logaritmo da atividade de água). Caso a estabilização das formas mais compactas da proteína se deva a variação da atividade de água, o comportamento destes gráficos será linear, o que é compatível com que observamos.

analisados pela equação de linkage que mostra como o logaritmo da constante de equilíbrio varia com o logaritmo da concentração de ligante. Na figura-12, a inclinação do gráfico à cada valor da concentração do soluto, que equivale a seguinte equação de linkage:

$$\frac{\partial \log K}{\partial \log [\text{solute}]} = (n_{\text{int}} - n_{\text{desnat}})$$

fornece a diferença entre o número de solutos ligados ao estado desnaturado em relação ao estado intermediário. Dada à não linearidade destes gráficos, esta inclinação cresce com a concentração de soluto, implicando que um número grande e crescente de solutos ligam-se preferencialmente ao estado intermediário. Esta situação é bastante improvável desde que espera-se que se o sorbitol se ligar à proteína, ele o fará inespecificamente. Portanto, o número de solutos ligados, neste caso deveria ser proporcional à área de superfície protéica exposta ao solvente, que implicaria na estabilização do estado D e não do estado I como observado.

Enquanto a análise do comportamento de $\log K$ versus $\log[\text{sorbitol}]$ indicam que este soluto não se liga a proteína, o gráfico de $\log K$ versus a pressão osmótica indica um efeito da atividade de água sobre o equilíbrio. Os gráficos da figura-13 mostram que o logaritmo da constante de renaturação aumenta linearmente com o aumento da pressão osmótica, ou equivalentemente com o logaritmo da diminuição da atividade de água. Segundo a equação-11, reescrita abaixo,



$$\left(\frac{\partial \ln K_{ap}}{\partial \ln a_w} \right)_{a_i} = (n_D - n_N) = \Delta n$$

o comportamento linear é aquele previsto se o reenovelamento protéico é induzido pela água de hidratação. Adicionalmente, a inclinação destes gráficos fornecem uma variação de +180 moléculas de água entre os estados desnaturado e reenovelado do Citocromo-c nesta faixa de variação de pH.

equilíbrio medida a partir da dependência da absorbância em um único comprimento de onda contém uma contribuição, não determinada trivialmente, do equilíbrio entre os estados I e N e I e D.

Portanto, para se proceder a uma análise mais apurada do efeito do pH e do efeito da água sobre as características espectrais e conformacionais do Citocromo-c, propusemos implementar técnicas de análise por decomposição de valor singular (SVD) e o método de ajuste de uma função não linear de várias variáveis através do algoritmo simplex de Nelder-Mead.



5.1.5-Análise por SVD do Processo de Desnaturação Ácida de

Citocromo-c

Os experimentos mostrados anteriormente apontam claramente para a existência de pelo menos três estados conformacionais do Citocromo-c que coexistem em equilíbrio dependente do pH e da atividade de água. A constante de equilíbrio medida a partir da dependência da absorbância em um único comprimento de onda contém uma contribuição, não determinada trivialmente, do equilíbrio entre os estados I e N e I e D.

Portanto, para se proceder à uma análise mais apurada do efeito do pH e do efeito da água sobre as características espectrais e conformacionais do Citocromo-c, propusemos implementar técnicas de análise por decomposição de valor singular (SVD) e o método de ajuste de uma função não linear de várias variáveis através do algoritmo simplex de Nelder-Mead.



5.1.5.1-A técnica de decomposição de valor singular (SVD)

Técnicas espectrofotométricas são usadas para caracterizar sistemas químicos e bioquímicos, medindo-se um grande número de curvas espectrais (espectros de emissão ou absorção) em função de alguns tipos de parâmetros físicos ou químicos como comprimento de onda, tempo, potencial elétrico, concentração de ligante, pH, etc...

A absorção espectrofotométrica de uma amostra constituída de i cromóforos à concentrações C_i é expressa pela lei de Boughert-Lambert-Beer:

$$A_\lambda = \sum_i \epsilon_i^\lambda \cdot C_i \quad (21)$$

onde

A_λ é o valor da absorbância num dado comprimento de onda

ϵ_i^λ é o valor do coeficiente de extinção molar do cromóforo i no comprimento de onda λ

C_i é o valor da concentração do cromóforo i

i é o número de espécies existentes em solução

A solução desta equação será trivial caso os valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ_i) que caracterizam as espécies moleculares que contribuem para o espectro observado forem conhecidos. Se o espectro de absorção de cada espécie molecular é conhecida no intervalo entre λ_1 e λ_n , então o espectro de absorção A_λ observado em uma dada condição experimental pode ser escrito como:



$$A_{\lambda 1} = \sum_i \epsilon_i^{\lambda 1} \cdot C_i$$

$$A_{\lambda n} = \sum_i \epsilon_i^{\lambda n} \cdot C_i$$

onde C_i representa a concentração de cada uma das espécies cromóforas presentes naquela condição experimental.

Podemos continuar a análise supondo a existência de um processo envolvendo três espécies moleculares, N, I e D, por exemplo, e reescrever o conjunto de equações acima na forma matricial

$$A = DF^T \quad (22)$$

sendo

$$A = \begin{pmatrix} A_{\lambda 1} \\ \vdots \\ A_{\lambda n} \end{pmatrix}; \quad D = \begin{pmatrix} \epsilon_N^{\lambda 1} & \epsilon_I^{\lambda 1} & \epsilon_D^{\lambda 1} \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \epsilon_N^{\lambda n} & \epsilon_I^{\lambda n} & \epsilon_D^{\lambda n} \end{pmatrix}; \quad F^T = \begin{pmatrix} C_N \\ C_I \\ C_D \end{pmatrix} \quad (23)$$

Se a absorção de uma dada amostra for medida em $\underline{m}$ condições experimentais, ($\underline{m}$ valores de pH por exemplo), a matriz A conterá $\underline{m}$ colunas correspondentes a $\underline{m}$ espectros de absorção para cada valor de pH de $\underline{n}$ comprimentos de onda (espectros da figura-1) e a matriz F, $\underline{m}$ linhas

correspondentes às concentrações dos estados nativo (C_N), intermediário (C_I) e desnaturado (C_D) nos m valores de pH.

Se A e D são conhecidos, então a solução para as concentração de N, I e D para cada valor de pH será do tipo (Press, W.H; Brian, P.F; Teulkolssy, S.A; Vetterling, W.T; 1987):

$$a.x = b$$

Entretanto, nem sempre todos os conjuntos espectrais da matriz D são conhecidos. A estratégia então é utilizar a técnica de SVD que consiste em deconvoluir a matriz A das medidas experimentais da figura-1, em 3 outras matrizes:

$$A=USV^T \quad (24)$$

onde U e V são matrizes ortogonais tal que:

$$U^T U = V^T V = I$$

sendo I a matriz identidade (Vandergriff & Shrager, 1994). A matriz U é uma combinação linear das curvas espectrais reais e a matriz V é uma combinação das frações das espécies moleculares encontradas em solução para cada valor da variável experimental.

A matriz S é uma matriz diagonal onde os elementos da diagonal principal estão na seguinte ordem: $s_{1,1} \geq s_{2,2} \geq s_{3,3} \dots$ e são os valores singulares da matriz A. Cada elemento da diagonal principal corresponde a contribuição de cada



espécie em solução ao espectro observado. Desta maneira, o número de elementos significativos (diferentes de zero) da diagonal principal da matriz S permite estabelecer o número de espécies moleculares encontradas em solução que contribuem significativamente para as variações espectrais observadas. O número total de espécies moleculares que a matriz S identifica é conhecido como 'rank da matriz', com um número i de colunas muito menor que o original. A relação na equação-25 nos permite reconstruir a matriz A como o somatório de poucos componentes espectrais cujo número de componentes corresponde ao rank da matriz:

$$A = \sum_i (Ucoluna_i) \cdot s_{i,i} (Vcoluna_i)^T \quad (25)$$

A matriz $A_{(m \times n)}$ original se tornará uma matriz do tipo $A_{(m \times \text{rank})}$. Esta nova matriz, apesar de ser muito menor que a original, contém toda a informação relevante contida na matriz original. O rank de A pode ser estimado graficando $\log(S_{i,i})$ versus i , onde apenas os valores significativos de $\log S$ para i muito pequenos correspondem ao rank. Logo, a escolha do rank passa a ser um trabalho de hipótese.

5.1.5.2-A Obtenção da Distribuição de Componentes em Função da

Variável Experimental a Partir das Matrizes $A=DF^T$ e $A=USV^T$

Por simples inspeção, a matriz A pode ser escrita de duas formas

(K.F.Vandegriff.; R.I.Shrager, 1994;):

$$A=USV^T \text{ e } A=DF^T$$

logo, $USV^T=DF^T$ o que implica:

$$D=USV^TF^{T+} \quad (26)$$

onde F^{T+} é denominada de matriz pseudoinversa de Moonre-Penrouse.

Definindo uma matriz como:

$$H=V^TF^{T+} \quad (27)$$

podemos escrever a matriz D na forma:

$$D=USH \quad (28)$$

Portanto, ao computar a matriz H (eq-27), pode-se obter pela relação 28 os espectros das espécies cromóforas em solução.

$$V_{(\text{parâmetros})}^T = HF^T \quad (29)$$

A busca da solução no ajuste é aquele que minimiza a diferença entre V^T experimental e V^{T*} tentativa, isto é:

$$V^T - V^{T*} \rightarrow 0 \quad (30)$$



5.1.5.3-Obtenção da Matriz H

A matriz H é obtida do produto da matriz V^T , determinada na deconvolução de A, pela matriz F^T que contem as concentrações relativas de cada uma das espécies N, I e D, em cada valor da variável experimental (pH por exemplo). A matriz F é construída a partir de um modelo que, no caso da desnaturação ácida do Citocromo-c, corresponderá ao modelo termodinâmico de equilíbrio conformacional.

Deste modo, podemos propor um modelo para o equilíbrio entre estas espécies em função do pH e dependente de parâmetros ajustáveis tais como as constantes de equilíbrio entre as espécies e o número de ligantes na transição de uma espécie à outra, que permita calcular a matriz F e que descreva o comportamento experimental representado na matriz V^T . Portanto, ao atribuímos valores para os parâmetros ajustáveis em F teremos um valor tentativo para a matriz H (eq-27) e uma matriz V^T tentativa ($V^{T\#}$) para os parâmetros escolhidos, (K.F.Vandegriff.; R.I.Shrager, 1994; Henry, E.R; Hofrichter, J). isto é:

$$V_{(parâmetros)}^{T\#} = HF^T \quad (29)$$

A busca da solução no ajuste é aquele que minimiza a diferença entre V^T experimental e $V^{T\#}$ tentativa, isto é;

$$V^T - V^{T\#} \rightarrow 0 \quad (30)$$

ou ainda; são os parâmetros que minimizam a norma (K.F.Vandegriff.; R.I.Shrager, 1994).

$$\|S \cdot (V^T - HF^T)\| \quad (31)$$

É importante notar que, para o presente trabalho, a informação relevante está contida na matriz F, isto é, nos parâmetros termodinâmicos que caracterizam o equilíbrio. Portanto, a solução que estamos buscando está contida nas matrizes V e F e será resolvida através da minimização da norma (equação-31). A matriz V é determinada pela deconvolução da matriz experimental A.

$$K_1 = \frac{I}{N \cdot [H^+]^{\Delta n_1}} \quad (33) \quad \text{e} \quad K_2 = \frac{D}{I \cdot [H^+]^{\Delta n_2}} \quad (34)$$

Os valores Δn_1 e Δn_2 representam a diferença entre o número de prótons ligado ao estado intermediário e nativo, e desnaturado e intermediário, respectivamente.

A concentração de espécie intermediária será expressa por:

$$I = K_1 \cdot N \cdot [H^+]^{\Delta n_1} \quad (35)$$

A concentração de espécie desnaturada será expressa por:

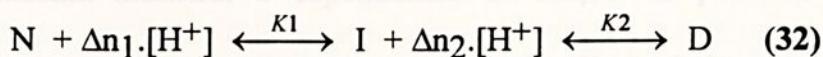
$$D = K_2 \cdot I \cdot [H^+]^{\Delta n_2} = K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{(\Delta n_1 + \Delta n_2)} \cdot N \quad (36)$$

A concentração total de proteína em solução é dada por:

$$C_T = N + I + D \quad (37)$$

5.1.5.4-Exemplo e Implementação do Método de Análise

O método de análise baseado na decomposição de valor singular (SVD) por nós implementado, modela o processo de desnaturação de uma proteína que envolve 3 estados conformacionais em equilíbrio com o pH, isto é, os estados nativo (N), intermediário (I) e desnaturado (D). Este modelo é representado pela equação de equilíbrio abaixo:



com constantes de equilíbrio dadas por:

$$K_1 = \frac{I}{N \cdot [H^+]^{\Delta n_1}} \quad (33) \quad \text{e} \quad K_2 = \frac{D}{I \cdot [H^+]^{\Delta n_2}} \quad (34)$$

Os valores Δn_1 e Δn_2 representam a diferença entre o número de prótons ligado ao estado intermediário e nativo, e desnaturado e intermediário, respectivamente.

A concentração de espécie intermediária será expressa por:

$$I = K_1 \cdot N \cdot [H^+]^{\Delta n_1} \quad (35)$$

A concentração de espécie desnaturada será expressa por:

$$D = K_2 \cdot I \cdot [H^+]^{\Delta n_2} = K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{(\Delta n_1 + \Delta n_2)} \cdot N \quad (36)$$

A concentração total de proteína em solução é dada por:

$$C_T = N + I + D \quad (37)$$



logo; 5.1.5.5-Implementação das Rotinas de SVD e Ajuste não Linear

$$C_T = N \cdot \left(1 + K_1 \cdot [H^+]^{\Delta n_1} + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{(\Delta n_1 + \Delta n_2)} \right) \quad (38)$$

de onde se obtém a dependência da fração de proteína no estado nativo (y_N) em função do pH, dada por:

$$y_N = \left(1 + K_1 \cdot [H^+]^{\Delta n_1} + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{(\Delta n_1 + \Delta n_2)} \right)^{-1} \quad (39)$$

Da mesma maneira, a dependência da fração de proteína nos estados intermediário (y_I) e desnaturado (y_D) em função do pH são dadas por:

$$y_I = \frac{I}{C_T} = K_1 \cdot [H^+]^{\Delta n_1} \cdot \frac{N}{C_T} = K_1 \cdot [H^+]^{\Delta n_1} \cdot y_N \quad (40)$$

$$y_D = \frac{D}{C_T} = K_2 \cdot \frac{I}{C_T} \cdot [H^+]^{\Delta n_2} = K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+]^{(\Delta n_1 + \Delta n_2)} \cdot y_N \quad (41)$$

Estas três expressões definem a matriz $F=[y_N \ y_I \ y_D]$ para m valores de pH

(Shrager, R.I; 1984; Shrager, R.I; 1986).

Parâmetros escolhidos simulando parâmetros reais	valores atribuídos
	2
K_2	1×10^9
Δn_2	6

Tabela-3: A tabela mostra os valores iniciais escolhidos para os parâmetros que compõe a matriz F

5.1.5.5-Implementação das Rotinas de SVD e Ajuste não Linear

As rotinas para deconvolução de valor singular (SVD) e ajuste não linear foram implementadas com o auxílio do software Matlab (mathworks).

A partir de agora iremos realizar um teste do programa de SVD gerando dados teóricos para a construção da matriz A dos espectros de absorção óptica. Vamos supor que cada uma das espécies moleculares puras existentes em solução tenham um espectro característico descritos por gaussianas ligeiramente distintas, que chamaremos de N, I e D. Estes espectros são gerados com a rotina SVDDEMO (vide apêndice).

A figura-14 apresenta estes espectros (gaussianas). A figura-15 mostra os gráficos simulando as frações reais y_N , y_I e y_D em função do pH calculados com o auxílio das equações 39,40 e 41 para os parâmetros K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2 escolhidos e apresentados na tabela-3, a seguir.

Parâmetros escolhidos simulando parâmetros reais	valores atribuidos
K_1	1×10^8
Δn_1	2
K_2	1×10^{13}
Δn_2	6

Tabela-3: A tabela mostra os valores iniciais escolhidos para os parâmetros que compõe a matriz F

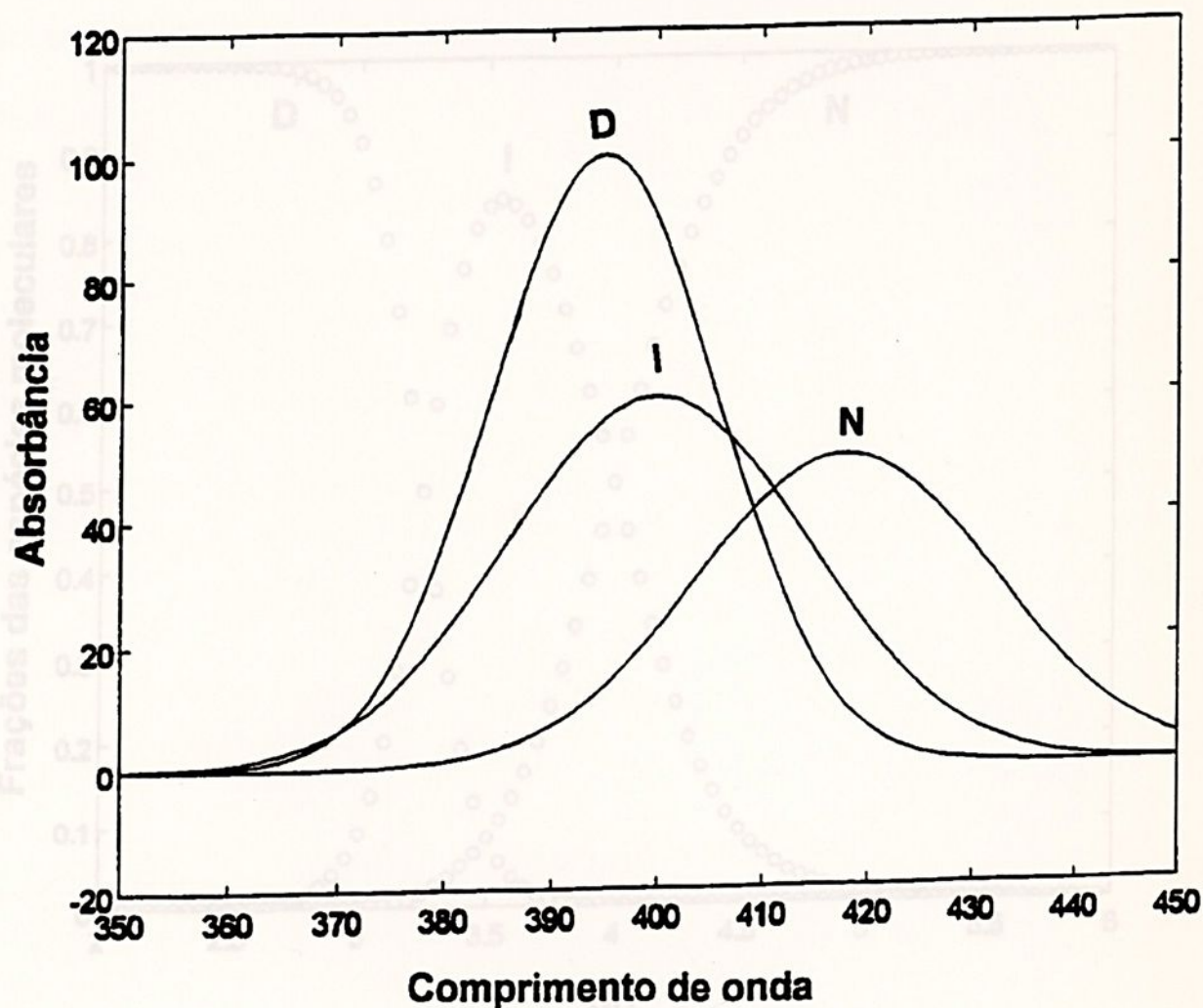


Fig-14: Gaussianas construídas com a rotina SVDDEMO. Estas gaussianas estão simulando os espectros de absorção óptica na região do visível na banda de Soret correspondentes às espécies puras de proteínas nos estados nativo (N), intermediário (I) e desnaturado (D).

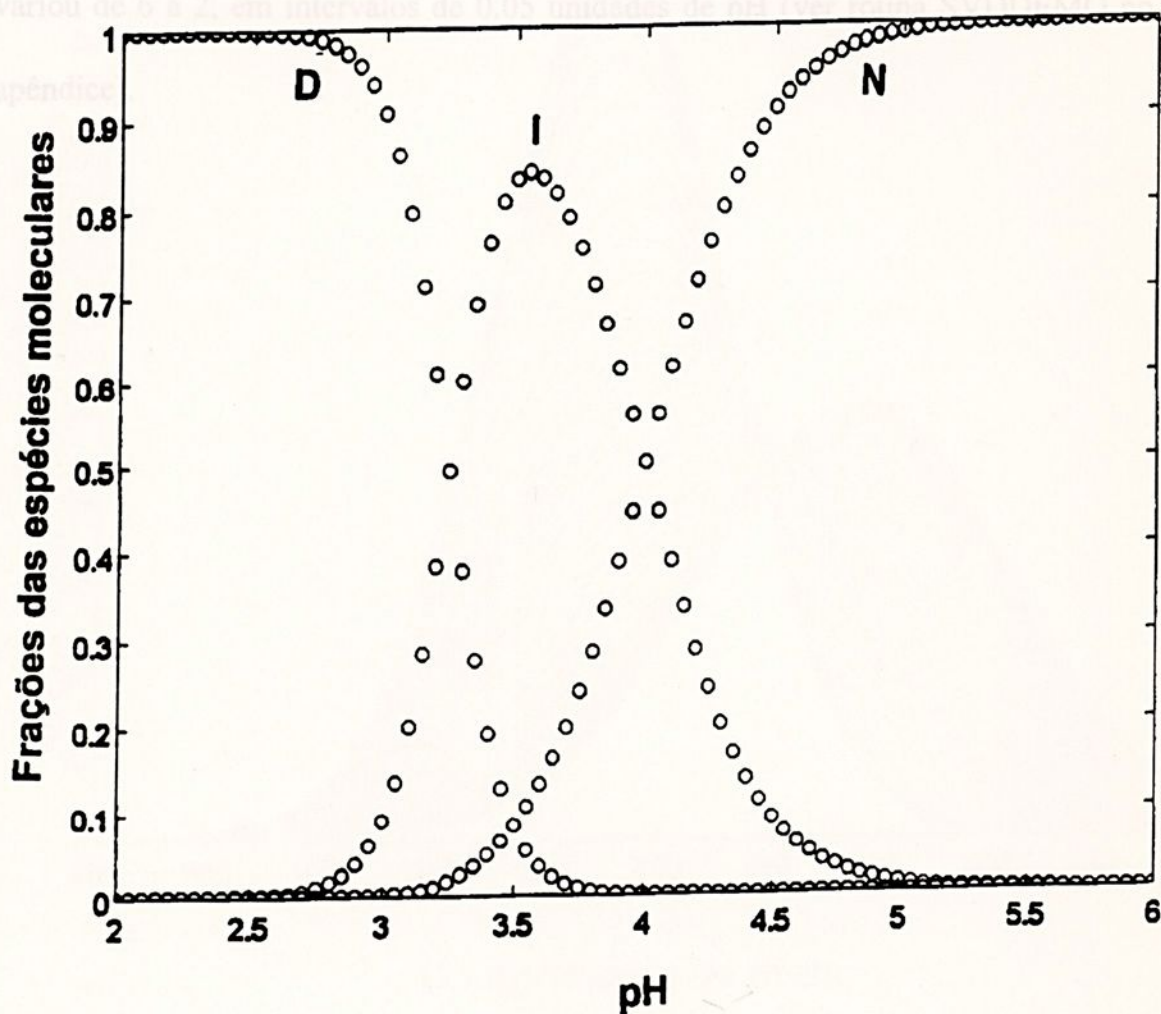


Fig-15: São mostrados nesta simulação, como a fração de proteína nos estados nativo (N), intermediário (I) e desnaturado (D) variam com o pH. Estas curvas foram construídas com a rotina SVDDEMO a partir dos valores iniciais atribuídos as constantes de equilíbrio.

Na figura-16, são apresentados os espectros de absorção óptica que servirão de base para a nossa análise. Estes espectros foram gerados pela expressão $Abs=c(1).y_n(pH)+c(2).y_i(pH)+c(3).y_d(pH)$ compondo a matriz A, sendo que o pH variou de 6 a 2, em intervalos de 0.05 unidades de pH (ver rotina SVDDEMO no apêndice).

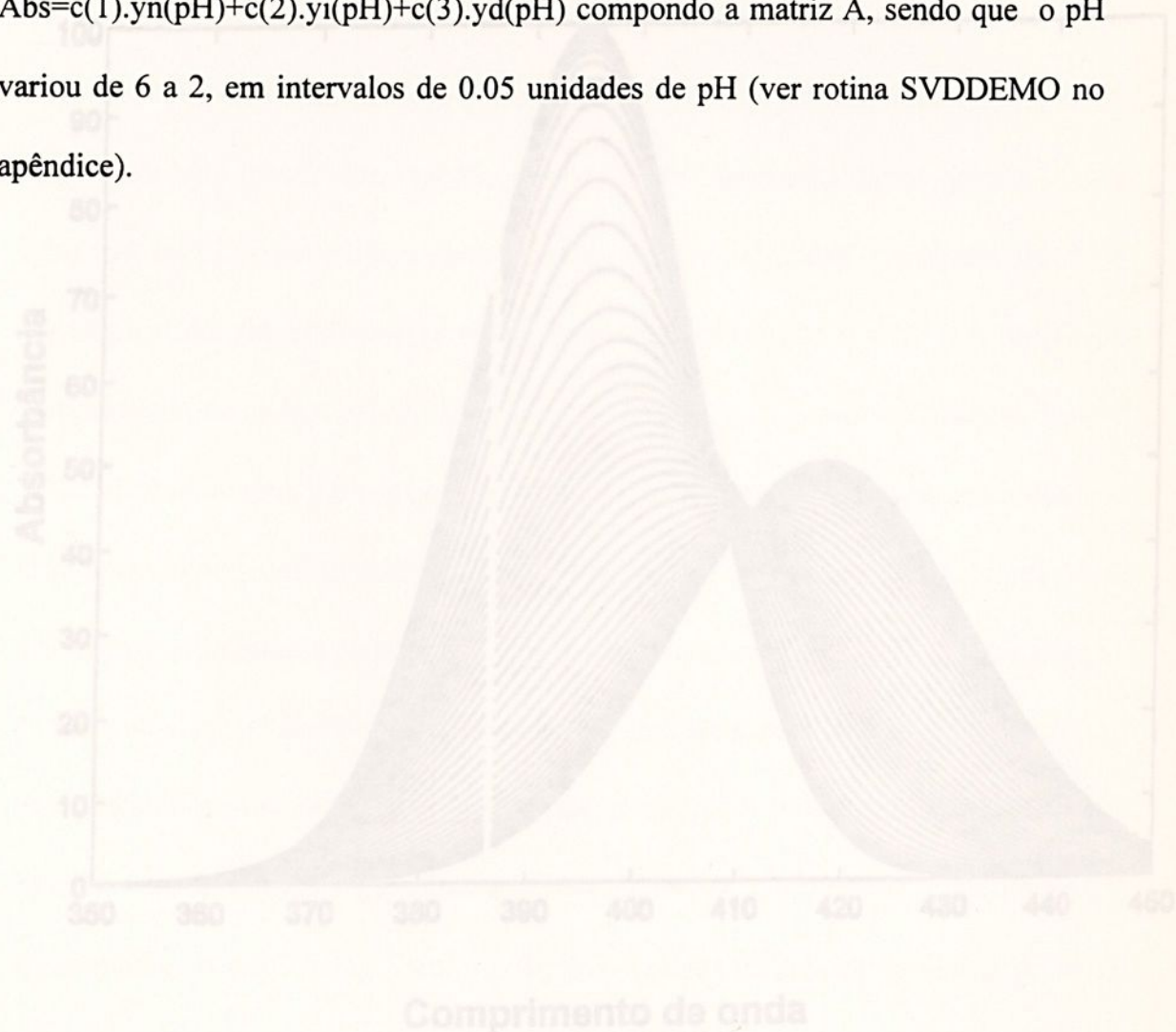


Fig-16: Simulação com a rotina SVDDEMO das curvas de absorção espectrofotométricas de uma proteína em solução aquosa ao longo do processo de desnaturação ácida. Este conjunto de espectros compõe a matriz A.

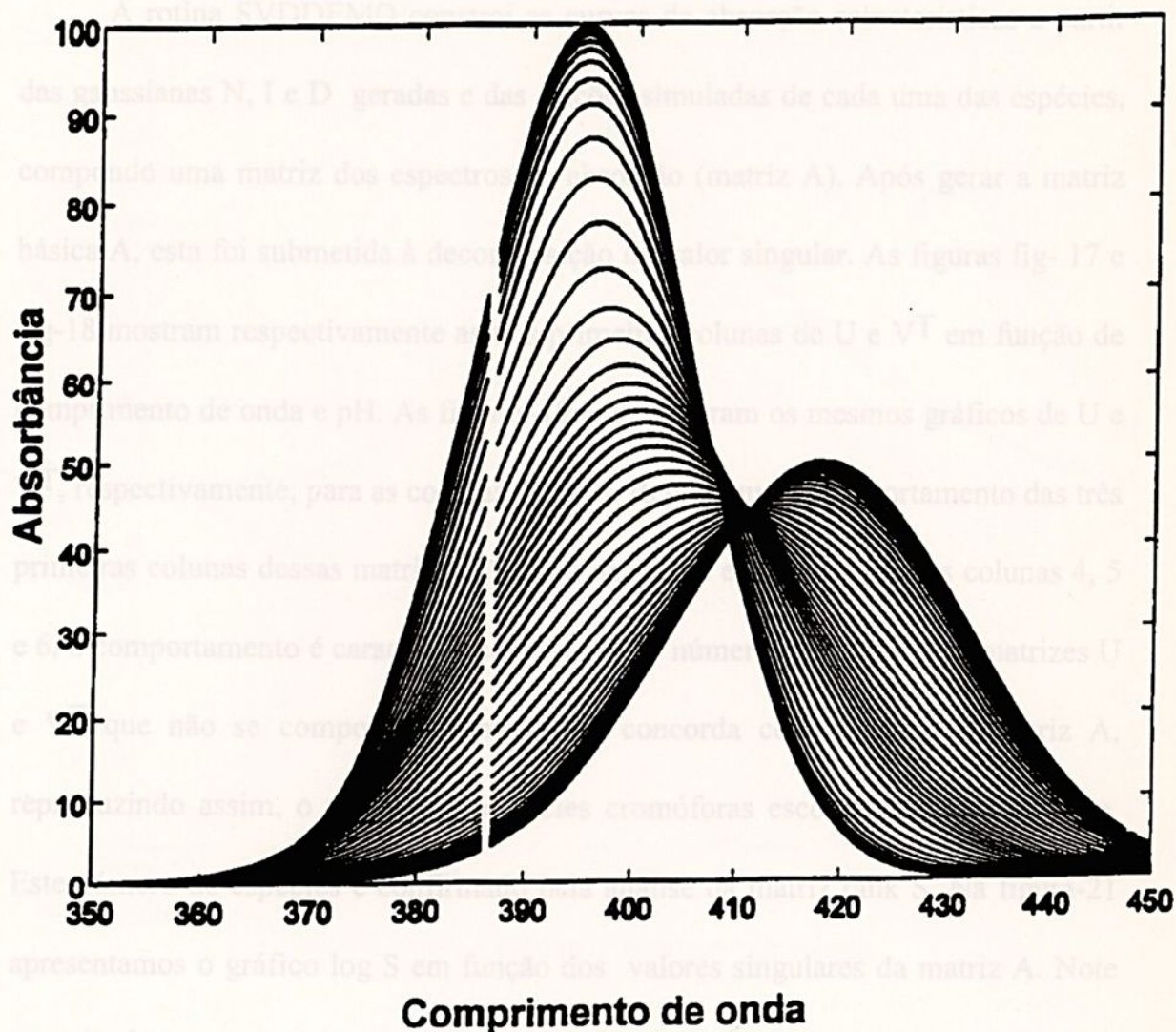


Fig-16: Simulação com a rotina SVDDEMO das curvas de absorção espectrofotométricas de uma proteína em solução aquosa ao longo do processo de desnaturação ácida. Este conjunto de espectros compõe a matriz A.

5.1.5.6-SVD Dos Espectros de Absorção

A rotina SVDDEMO constroi as curvas de absorção características a partir das gaussianas N, I e D geradas e das frações simuladas de cada uma das espécies, compondo uma matriz dos espectros de absorção (matriz A). Após gerar a matriz básica A, esta foi submetida à decomposição de valor singular. As figuras fig- 17 e fig-18 mostram respectivamente as três primeiras colunas de U e V^T em função de comprimento de onda e pH. As figuras-19 e 20 mostram os mesmos gráficos de U e V^T , respectivamente, para as colunas 4, 5 e 6. Repare que o comportamento das três primeiras colunas dessas matrizes são bem definidas enquanto para as colunas 4, 5 e 6, o comportamento é característico de ruído. O número de colunas das matrizes U e V^T que não se comportam como ruído concorda com o rank da matriz A, reproduzindo assim, o número de espécies cromóforas escolhidos para este teste. Este número de espécies é confirmado pela análise da matriz rank S. Na figura-21 apresentamos o gráfico log S em função dos valores singulares da matriz A. Note que só três pontos apresentam valores significativos para os elementos da diagonal da matriz S (valores não nulos) enquanto que os demais pontos apresentam valores para os elementos da diagonal da matriz S menores que 10^{-12} . Este rank da matriz S equivalente à 3, mostrando que só três espécies espectrais colaboram significativamente para o comportamento da matriz A.



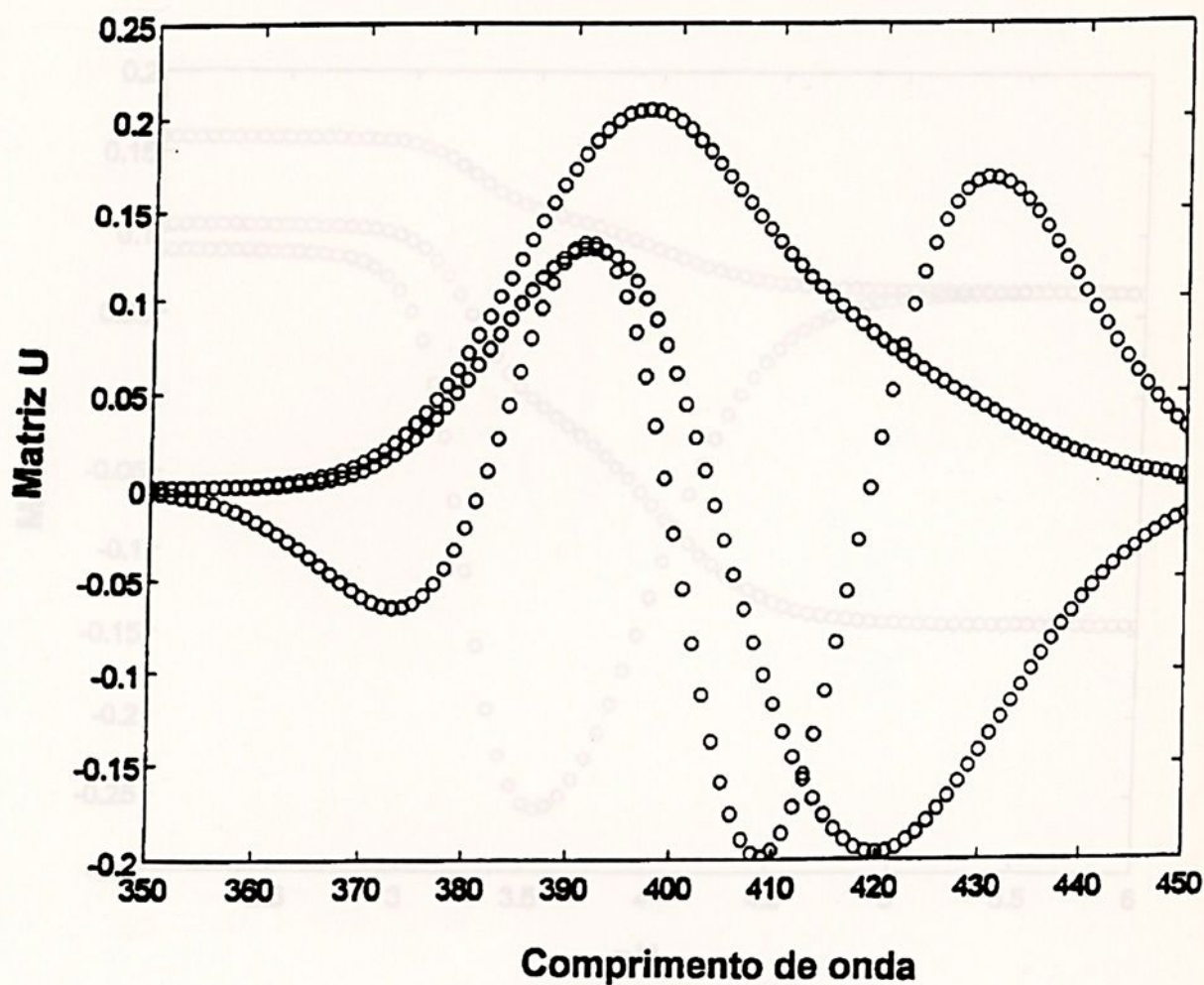


Fig-17: Apresentamos a simulação das três primeiras colunas da matriz U . Esta matriz é uma combinação linear dos espectros simulados que compõe a matriz A . Note que essas três primeiras colunas apresentam comportamento bem definido.

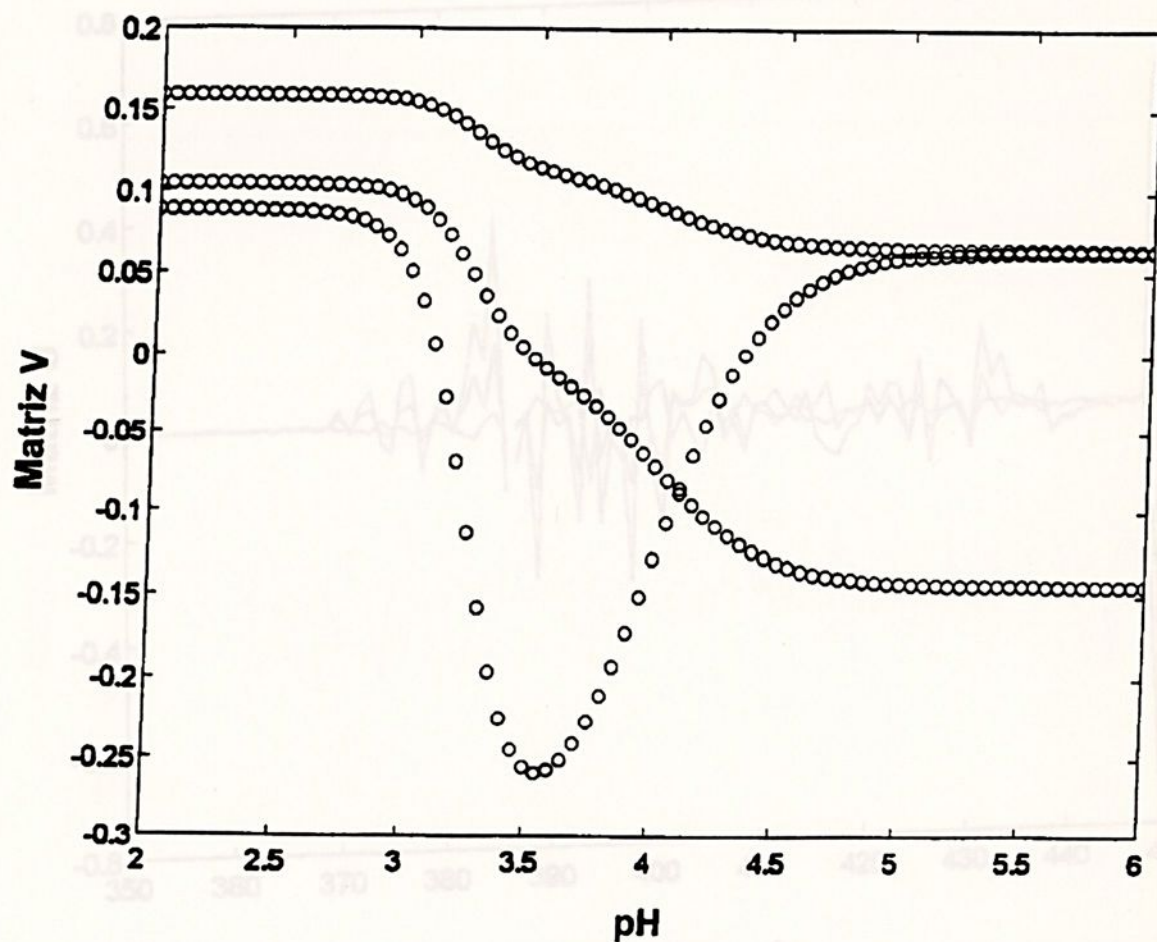


Fig-18: Simulação das três primeiras colunas da matriz V. Esta matriz é uma combinação linear das frações das espécies espectrais. Percebemos que estas três primeiras colunas não apresentam comportamento de ruído.

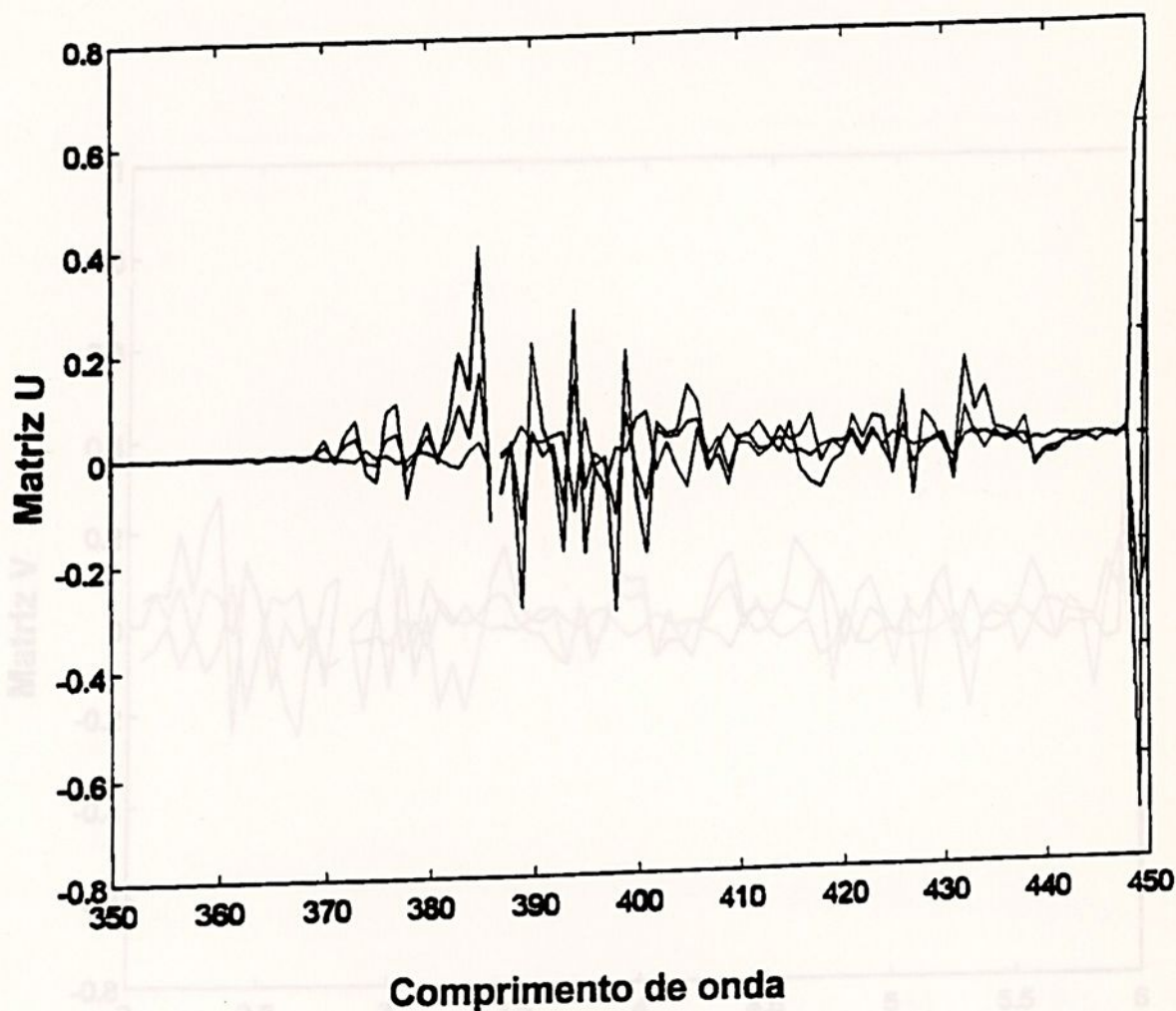


Fig-19: Simulação das colunas 4, 5 e 6 da matriz U. Estas curvas não estão bem definidas, apresentado desta forma, um comportamento característico de ruído sem nenhum significado físico.

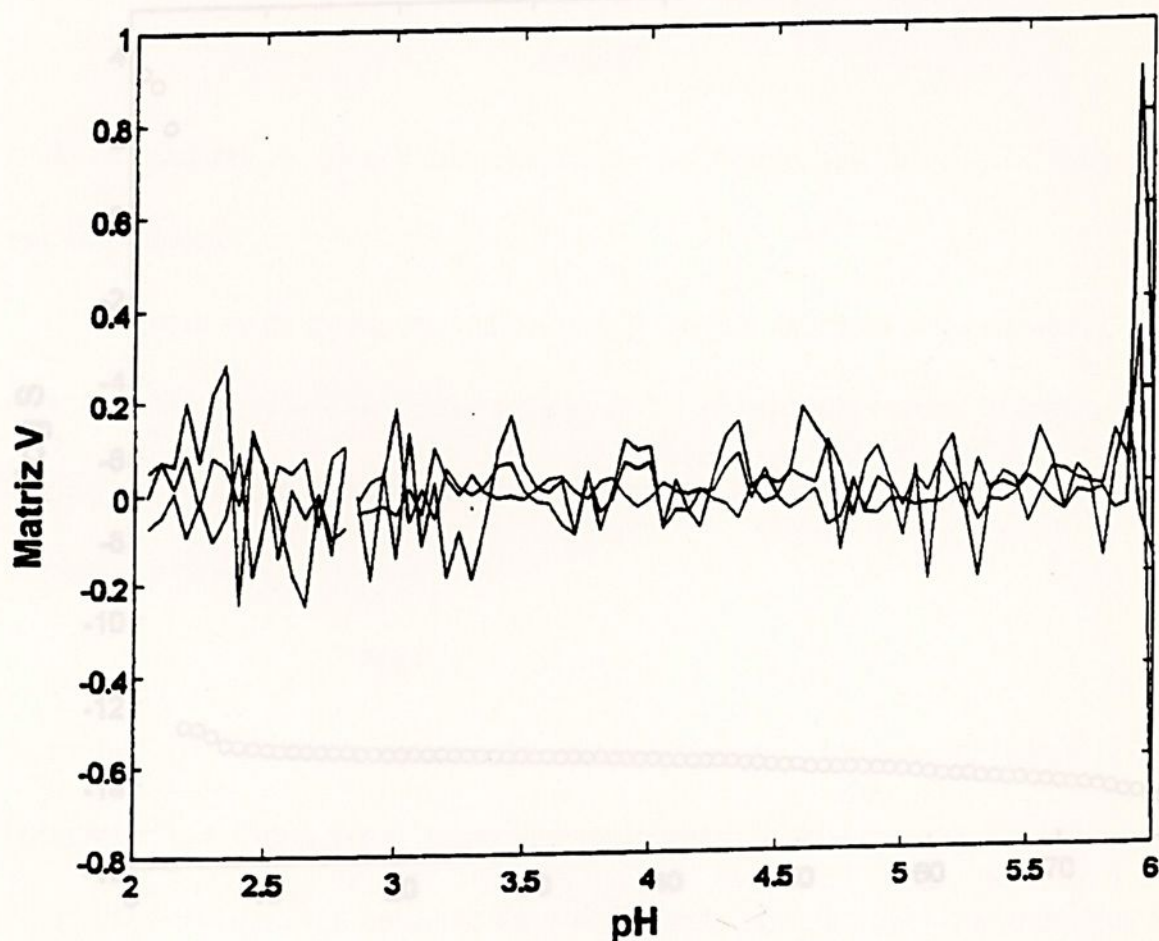


Fig-20: Simulação das colunas 4, 5 e 6 da matriz V. Estas curvas não estão bem definidas, apresentado desta forma, um comportamento característico de ruído sem nenhum significado físico.

5.1.5.7-Determinação dos Valores dos Parâmetros (K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2) a

Partir do Ajuste da Matriz V^T com o Modelo Dado Pela Matriz F .

Como discutimos anteriormente,

$$A = DF^T$$

onde as matrizes A , D e F são mostradas nas figuras fig-16, fig-22 e fig-23, respectivamente.

Apartir deste ponto, desejamos usar o modelo expresso pelas equações, 39,

41 e 42 para utilizar as três primeiras colunas de V^T objetivando reobter os parâmetros K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2 e as componentes espectrais que formam a matriz D .

Portanto escrevemos

$$F(K_1, K_2, \Delta n_1, \Delta n_2) = (y_a, y_b, y_c)$$

A rotina que faz o ajuste dos parâmetros de uma função matemática é dada no apêndice B.

Esta rotina faz o ajuste dos parâmetros de uma função matemática para várias variáveis para um conjunto de dados usando um algoritmo que minimiza a norma da diferença entre os valores ajustáveis e os valores reais (algoritmo simplex de Nelder-Mead).

Fig-21: Simulação do gráfico Log S versus valores singulares da matriz A. Este gráfico nos fornece o rank da matriz A que informa o número de espécies cromóforas em solução. Este número é representado pela parte linear do gráfico para valores singulares próximo de zero.

onde V^T é a matriz V real e H e F^T são as matrizes para os valores atuais de K_1 ,

5.1.5.7-Determinação dos Valores dos Parâmetros (K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2) a

Partir do Ajuste da Matriz V^T com o Modelo Dado Pela Matriz F .

Como discutimos anteriormente,

$$A=DF^T$$

onde as matrizes A , D e F são mostradas nas figuras fig-16 , fig-22 e fig-23, respectivamente.

A partir deste ponto, desejamos usar o modelo expresso pelas equações, 39, 40 e 41 e utilizar as três primeiras colunas de V^T objetivando reobter os parâmetros K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2 e as componentes espectrais que formam a matriz D .

Portanto, escrevemos

$$F(K_1, K_2, n_1, n_2) = (y_N \quad y_i \quad y_D)$$

A rotina que calcula F em função dos parâmetros chama-se FITSVD2 (ver apêndice). Esta rotina faz o ajuste dos parâmetros de uma função não linear de várias variáveis para um conjunto de dados usando um algoritmo que minimiza a norma da diferença entre os valores ajustáveis e os valores reais (algoritmo simplex de Nelder-Mead).

Para um dado valor de K_1 , K_2 , Δn_1 , Δn_2 ; calcula-se a matriz:

$$H=V^T F^{T+}$$



onde V^T é a matriz V real e H e F^T são as matrizes para os valores atuais de K_1 , K_2 , Δn_1 , Δn_2 . O produto de $HF^T = V^T \#$ e a minimização são dadas por:

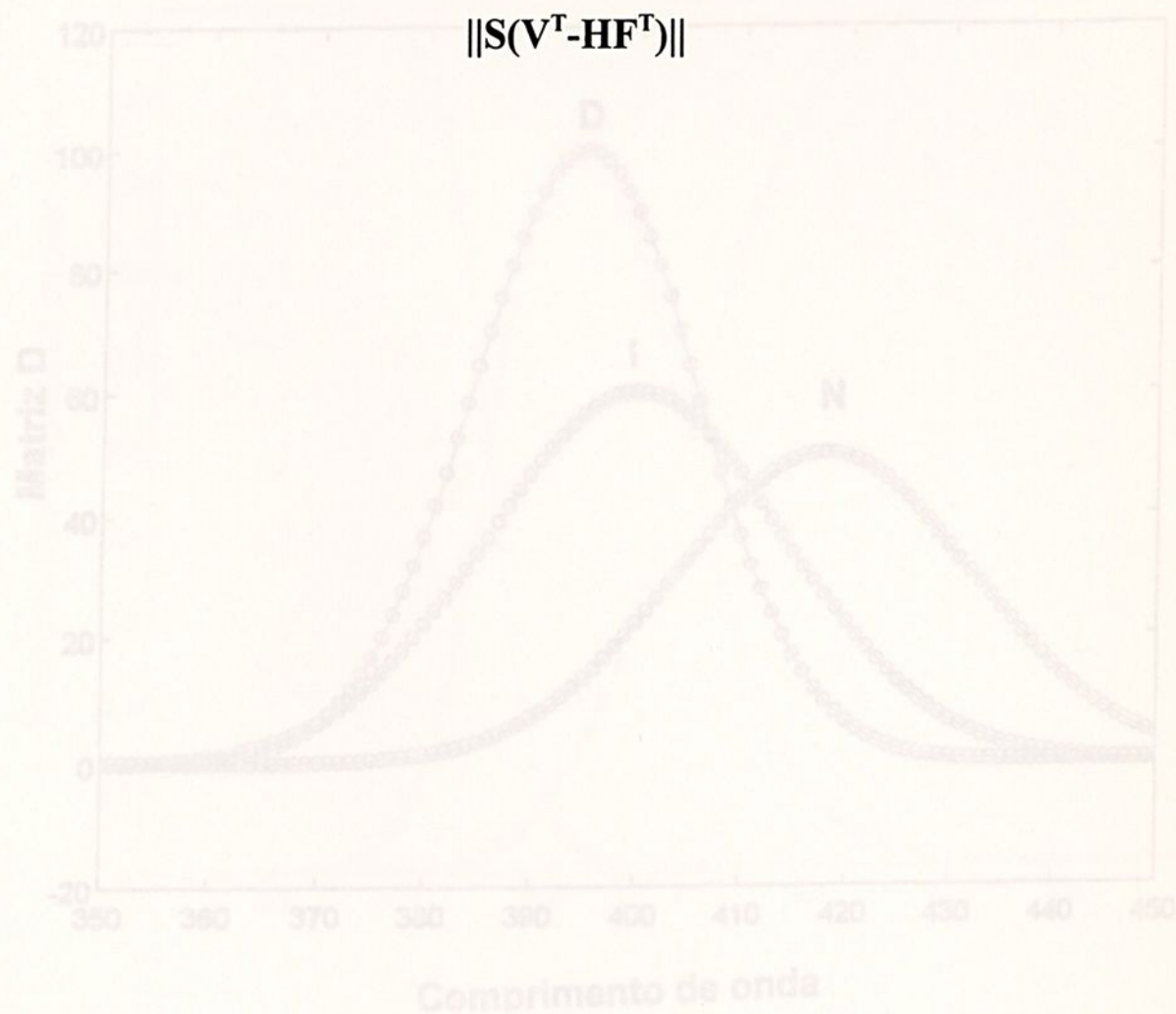


Fig-22: Reconstrução das curvas espectrais de cada espécie pura (linha contínua) após a aplicação do SVD a matriz A e a minimização da norma, onde podemos notar um ajuste perfeito com as curvas originais geradas a partir das gaussianas da rotina SVDDEMO para cada espécie pura (círculos abertos).

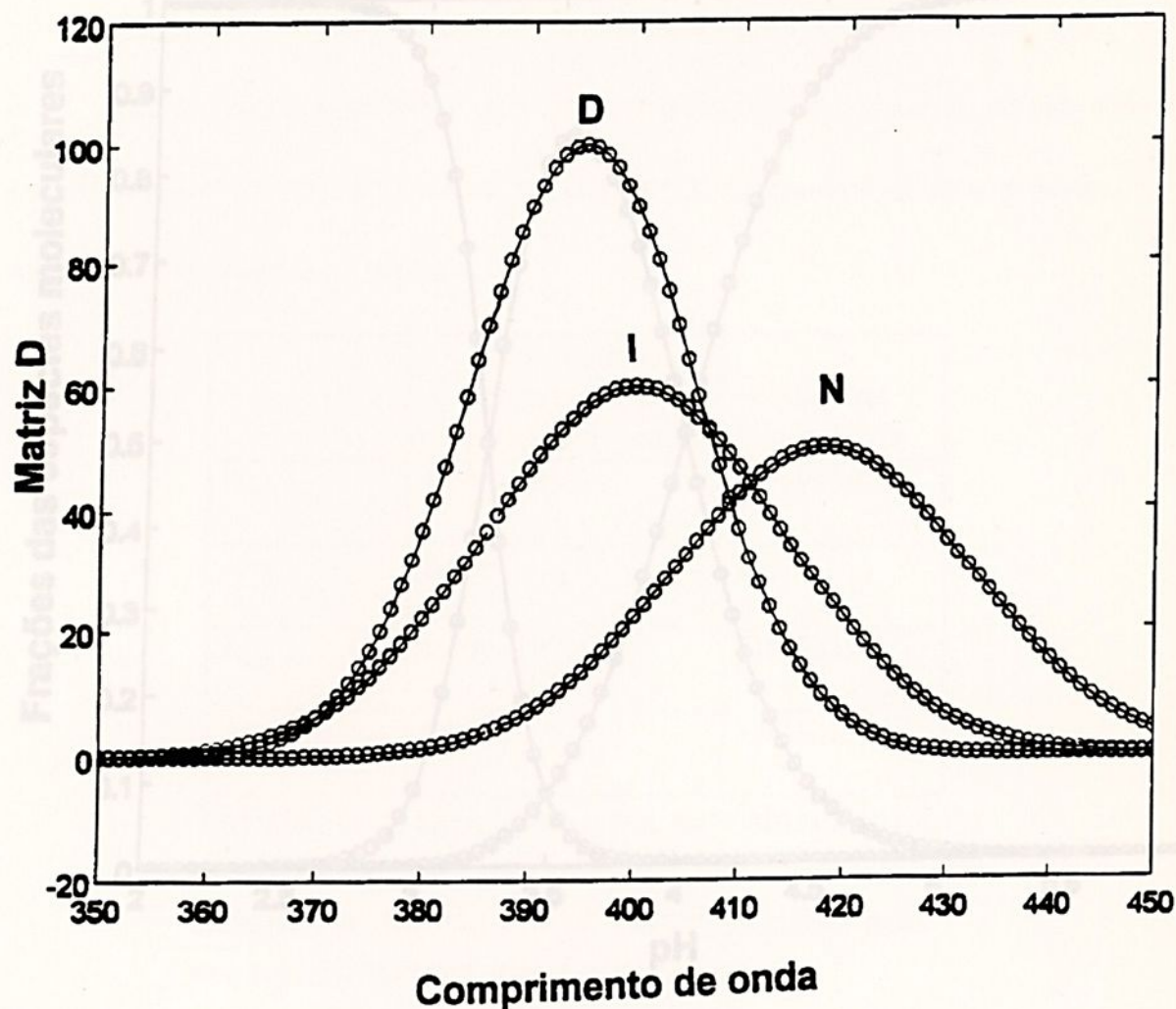


Fig-22: Reconstrução das curvas espectrais de cada espécie pura (linha contínua) após a aplicação do SVD a matriz A e a minimização da norma, onde podemos notar um ajuste perfeito com as curvas originais geradas a partir das gaussianas da rotina SVDDEMO para cada espécie pura (circulos abertos).

5.1.5.8-RESULTADO DO EXEMPLO

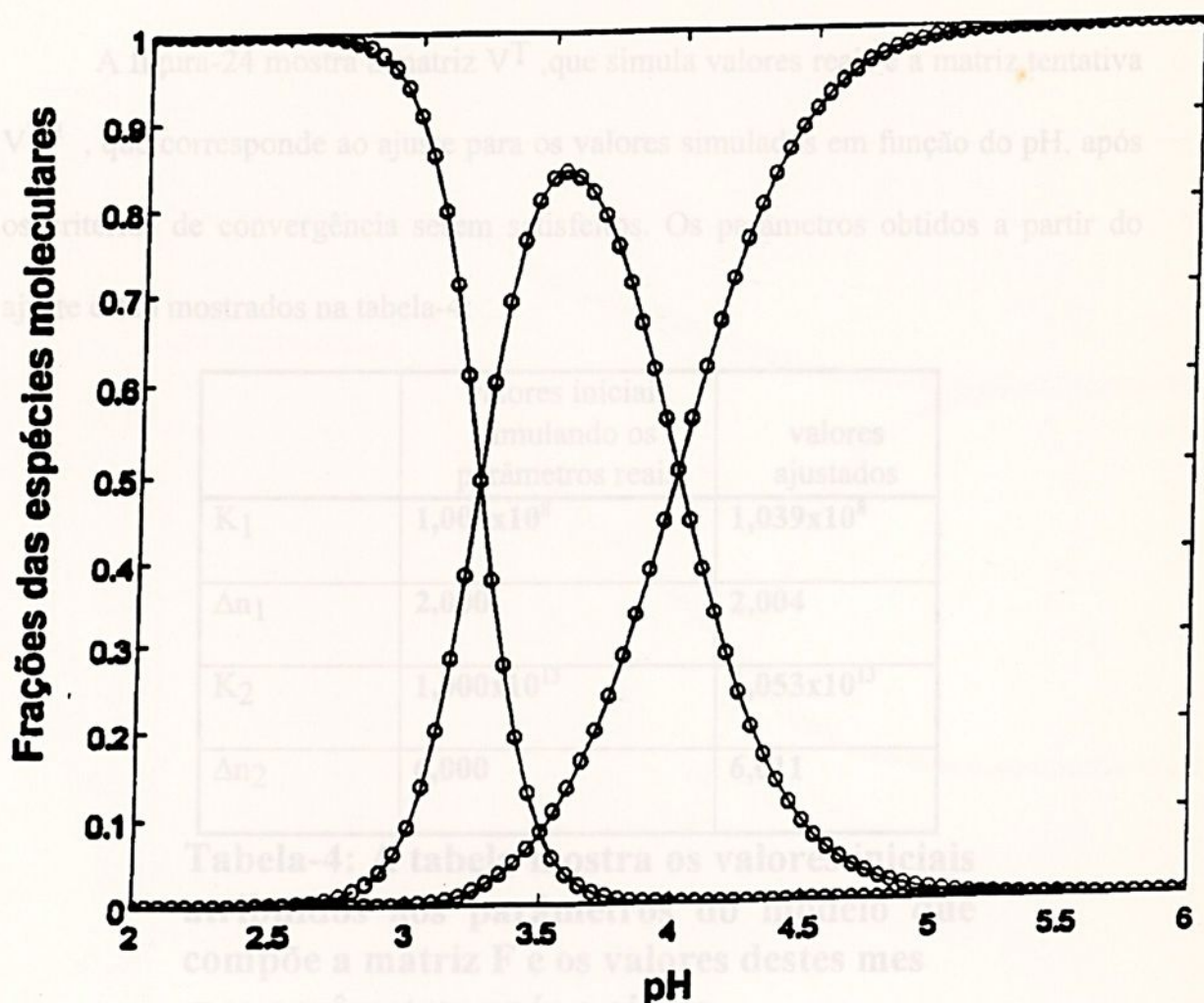


Fig-23: Curvas de distribuição das espécies moleculares encontradas em solução. Os círculos abertos estão simulando a fração real de cada uma das espécies geradas através da rotina SVDDEMO, enquanto que a linha contínua representa o ajuste produzido após a aplicação da deconvolução da matriz A e a minimização de $V^T - V^{T\#}$.

5.1.5.8-RESULTADO DO EXEMPLO

A figura-24 mostra a matriz V^T , que simula valores reais e a matriz tentativa $V^{T\#}$, que corresponde ao ajuste para os valores simulados em função do pH, após os critérios de convergência serem satisfeitos. Os parâmetros obtidos a partir do ajuste estão mostrados na tabela-4:

	valores iniciais simulando os parâmetros reais	valores ajustados
K_1	$1,000 \times 10^8$	$1,039 \times 10^8$
Δn_1	2,000	2,004
K_2	$1,000 \times 10^{13}$	$1,053 \times 10^{13}$
Δn_2	6,000	6,011

Tabela-4: A tabela mostra os valores iniciais atribuídos aos parâmetros do modelo que compõe a matriz F e os valores destes mesmos parâmetros após o ajuste.

A pequena diferença existente entre os valores iniciais e os valores ajustados se deve ao número de passos que o programa realiza. Quanto maior o número de passos, menor será esta diferença.

Na figura-23 é mostrado a simulação dos gráficos (ajustados e gerados) das frações de cada uma das espécies cromóforas existentes em solução em função do pH.

Agora que conhecemos a matriz F , a matriz D dos espectros em solução pode ser reconstruídos pelo modelo matricial dado pela equação-22. A figura-22 mostra a comparação entre os espectros originais da matriz D e os espectros reconstruídos.

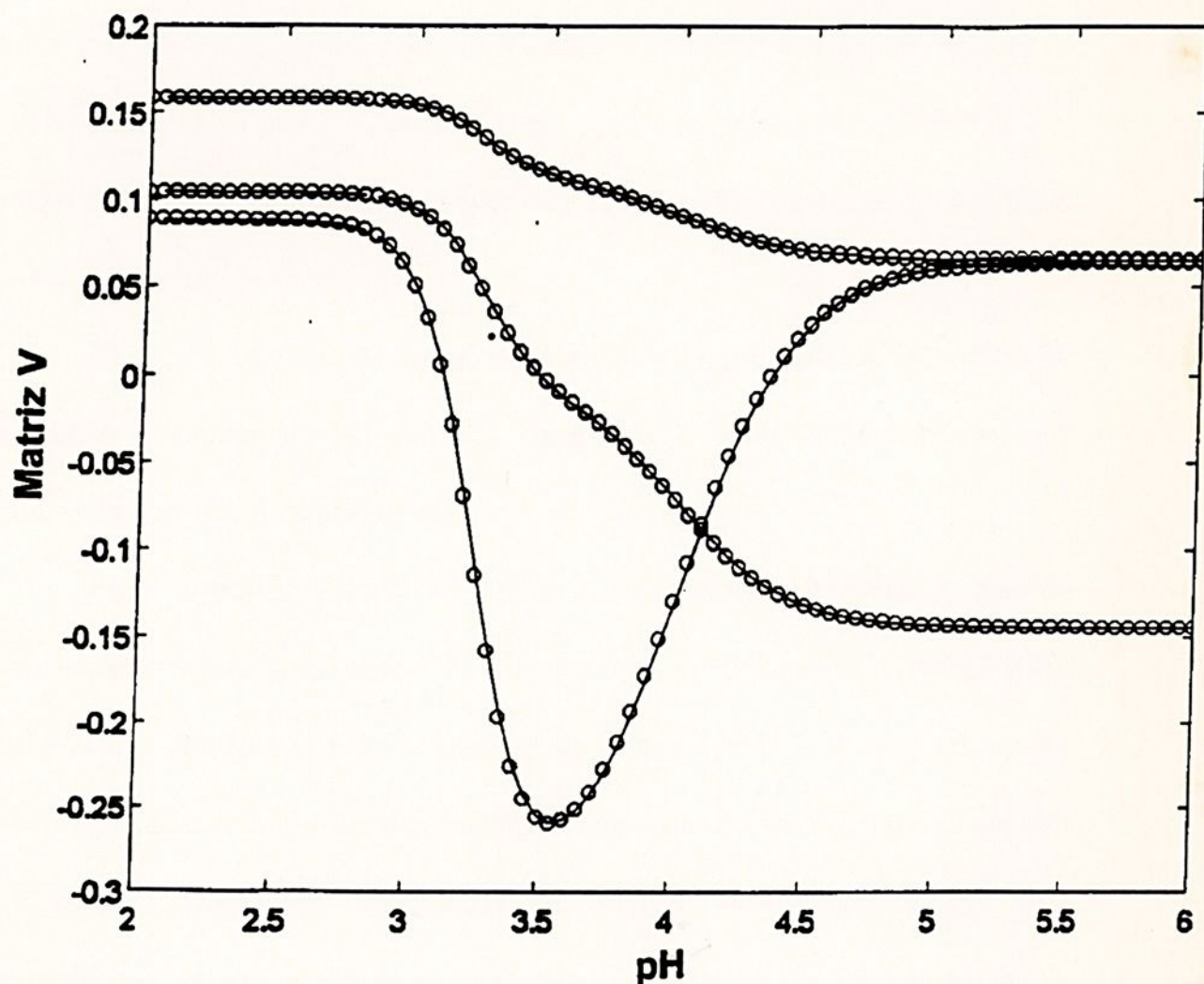


Fig-24: Simulação das três primeiras colunas da matriz V , onde a linha contínua simula a matriz V real obtida do SVD da matriz A e os círculos abertos representam a matriz V ajustada com a rotina FITSVD2.

Agora que conhecemos a matriz F ; a matriz D dos espectros em solução pode ser reconstruídos pelo modelo matricial dado pela equação-22. A figura-22 mostra a comparação entre os espectros originais da matriz D e os espectros reconstruídos.

Apos colocarmos em funcionamento o programa que faz a decomposição de valor singular e o ajuste das matrizes V real e V tentativa, realizamos medidas de desnaturação ácida para o Citocromo- c em água e na presença de 0,2, 0,5, e 1,5, molar de sorbitol e aplicamos a técnica de SVD as curvas espectrais (absorbância versus comprimento de onda).

Para cada conjunto de dados experimentais foram medidos entre 60 e 80 espectros á valores de pH distintos entre 2 e 7. Estes conjuntos espectrais compõem a matriz A de absorbância.

Estes espectros (matriz A) foram deconvoluídos por SVD. A fim de confirmarmos o rank da matriz A , calculamos o coeficiente de correlação das colunas das matrizes U e V . O número de colunas de U e V com valores do coeficiente de correlação simultaneamente maiores que 0,6 corresponde ao número de espécies cromóforas encontradas em solução (R.I.Shrager, 1984). Nós encontramos valores maiores que 0,6 para o coeficiente de correlação das 3 primeiras colunas de U e V indicando que 3 espécies conformacionais (espectrais) para o Citocromo- c são suficientes para descrever a dependência espectral medida em função do pH e nas diversas concentrações de sorbitol. Este resultado confirma nossas suposições prévias.



5.1.5.9-Resultados Experimentais com análise de SVD

Após colocarmos em funcionamento o programa que faz a decomposição de valor singular e o ajuste das matrizes V real e V tentativa, realizamos medidas de desnaturação ácida para o Citocromo-c em água e na presença de 0,2, 0,5, e 1,5, molal de sorbitol e aplicamos a técnica de SVD as curvas espectrais (absorbância versus comprimento de onda).

Para cada conjunto de dados experimentais foram medidos entre 60 e 80 espectros à valores de pH distintos entre 2 e 7. Estes conjuntos espectrais compõem a matriz A de absorbância.

Estes espectros (matriz A) foram deconvoluídos por SVD. A fim de confirmarmos o rank da matriz A , calculamos o coeficiente de correlação das colunas das matrizes U e V . O número de colunas de U e V com valores do coeficiente de correlação simultaneamente maiores que 0,6 corresponde ao número de espécies cromóforas encontradas em solução (R.I.Shrager, 1984). Nós encontramos valores maiores que 0,6 para o coeficiente de correlação das 3 primeiras colunas de U e V indicando que 3 espécies conformacionais (espectrais) para o Citocromo-c são suficientes para descrever a dependência espectral medida em função do pH e nas diversas concentrações de sorbitol. Este resultado confirma nossas suposições prévias.



Uma matriz V^T típica à todos os experimentos realizados (com e sem sorbitol) é mostrado na figura-25. Nesta figura, os círculos abertos representam os pontos experimentais para a desnaturação do Citocromo-c em água e a linha contínua representa o melhor ajuste da matriz F (equação 39-41) aos pontos experimentais. Na tabela-5, os valores de K_1 , K_2 , Δn_1 e Δn_2 determinados para diversas concentrações de sorbitol, assim como o valor da osmolalidade medida destas soluções são apresentados.

Uma vez determinado os parâmetros termodinâmicos do processo de desnaturação, podemos construir a curva de distribuição de cada uma das espécies moleculares em função do pH na ausência e presença de concentrações variadas de sorbitol, como mostrado figura-26. Na figura-26a apresentamos a fração de proteína no estado nativo na ausência e presença de sorbitol. A medida que a concentração de sorbitol aumenta, a curva da fração de proteína nativa se desloca para a região de menor valor de pH, o mesmo acontecendo para a fração de proteína no estado intermediário (figura-26b) e no estado desnaturado (figura-26c). Notamos também que o perfil das curvas de distribuição praticamente não varia. Estas curvas, aparentemente, só são deslocadas para a região de menor valor de pH. Particularmente, este deslocamento da curva preservando o perfil de distribuição é notável para as curvas de distribuição do estado intermediário que mantêm, aproximadamente, o mesmo valor de fração máxima e largura da curva.



Na figura-27, reconstruímos os espectros originais (matriz D) correspondentes aos estados nativo (N), intermediário (I) e desnaturado (D), para

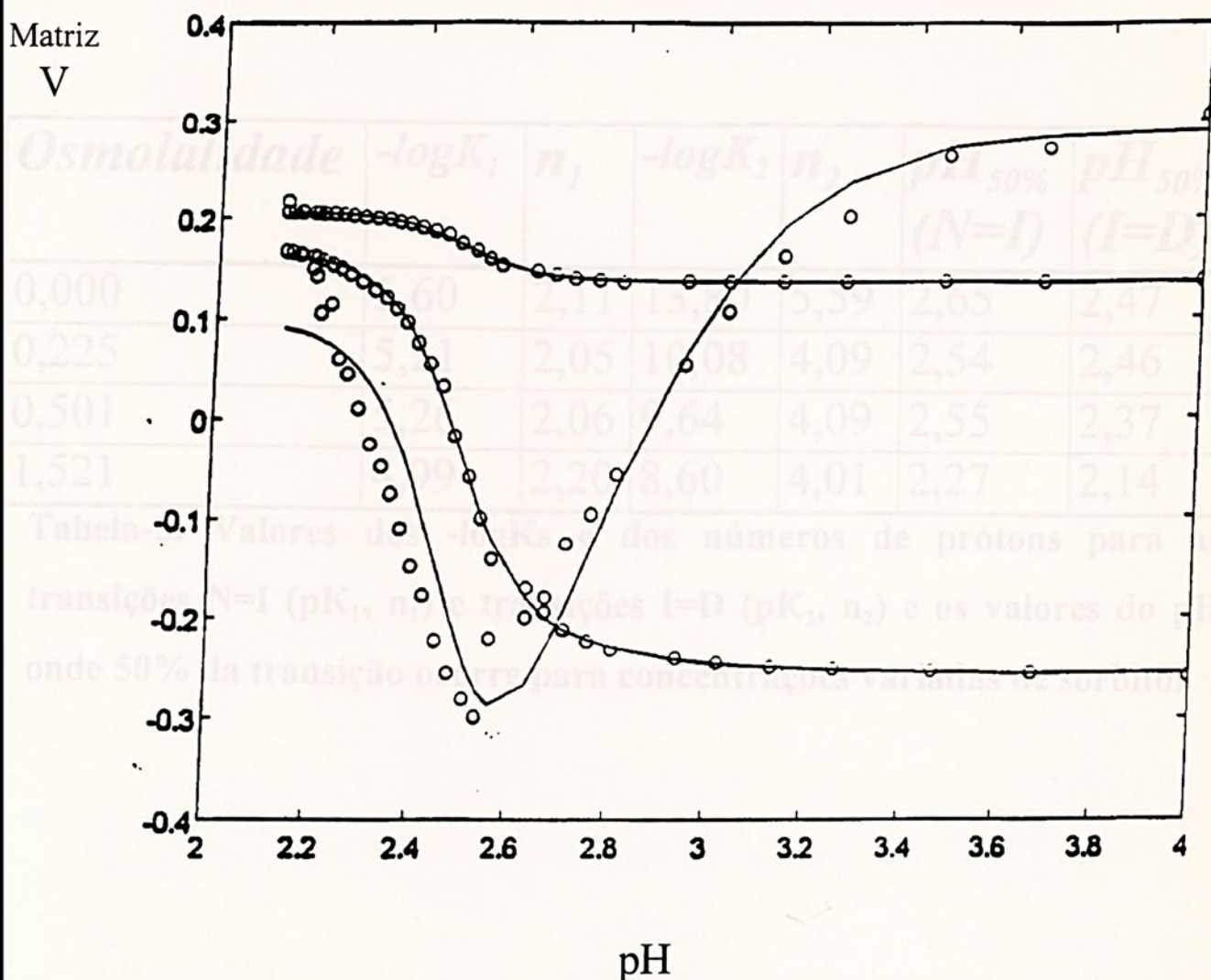


Fig-25: Matriz V versus pH obtida por SVD da matriz A. Nesta figura, os círculos abertos representam os pontos experimentais para a desnaturação do Citocromo-c em água e a linha contínua representa o melhor ajuste da matriz F, que contém as frações de cada uma das espécies moleculares, aos pontos experimentais.



comparamos a matriz D calculada dos experimentos de desnaturação em água com a matriz D calculada dos experimentos na presença de 1,5 molal. Notamos que os espectros reconstruídos em água e em 1,5 molal de sorbitol são bastante semelhantes, indicando que nenhuma espécie espectral nova é formada pela adição de sorbitol.

<i>Osmolalidade</i>	$-\log K_1$	n_1	$-\log K_2$	n_2	$pH_{50\%}$ (N=I)	$pH_{50\%}$ (I=D)
0,000	5,60	2,11	13,80	5,59	2,65	2,47
0,225	5,21	2,05	10,08	4,09	2,54	2,46
0,501	5,26	2,06	9,64	4,09	2,55	2,37
1,521	4,99	2,20	8,60	4,01	2,27	2,14

Tabela-5: Valores dos $-\log K$ s e dos números de prótons para as transições N=I (pK_1 , n_1) e transições I=D (pK_2 , n_2) e os valores do pH onde 50% da transição ocorre para concentrações variadas de sorbitol.

comparamos a matriz D calculada dos experimentos de desnaturação em água com a matriz D calculada dos experimentos na presença de 1,5 molal. Notamos que os espectros reconstruídos em água e em 1,5 molal de sorbitol são bastante semelhantes, indicando que nenhuma espécie espectral nova é formada pela adição de sorbitol.

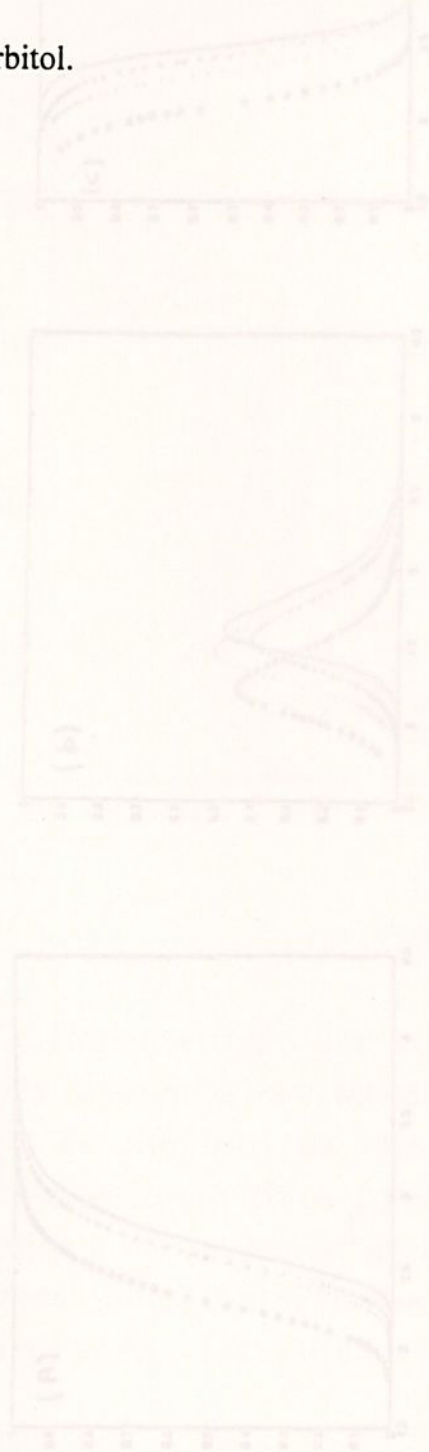


Fig-26: Curva de distribuição de cada uma das espécies moleculares em função da temperatura de desnaturação do Citocromo-c em água (linha contínua) e na presença de concentrações de sorbitol 1 (+) 0,2 molal, (.) 0,5 molal, (o) 1,5 molal. Nas figuras 27a, 27b e 27c, respectivamente, as frações de proteína nos estados nativo, intermediário e desnaturado.

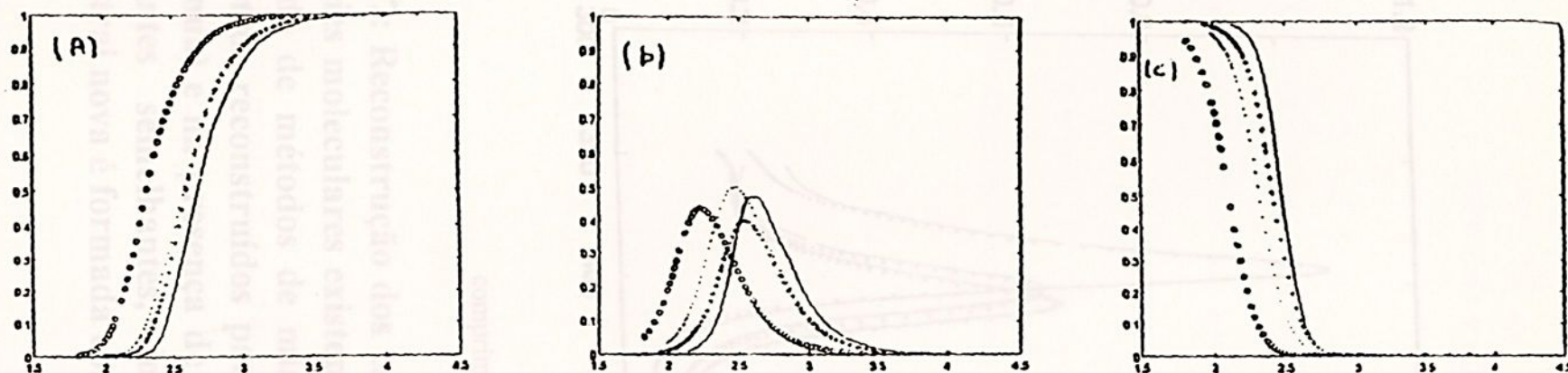


Fig-26: Curva de distribuição de cada uma das espécies moleculares em função do pH para a desnaturação do Citocromo-c em água (linha contínua) e na presença de concentrações variadas de sorbitol [(+) 0,2 molal, (.) 0,5 molal, (o) 1,5 molal]. Nas figuras 27a, 27b e 27c mostramos, respectivamente, as frações de proteína nos estados nativo, intermediário e desnaturado.

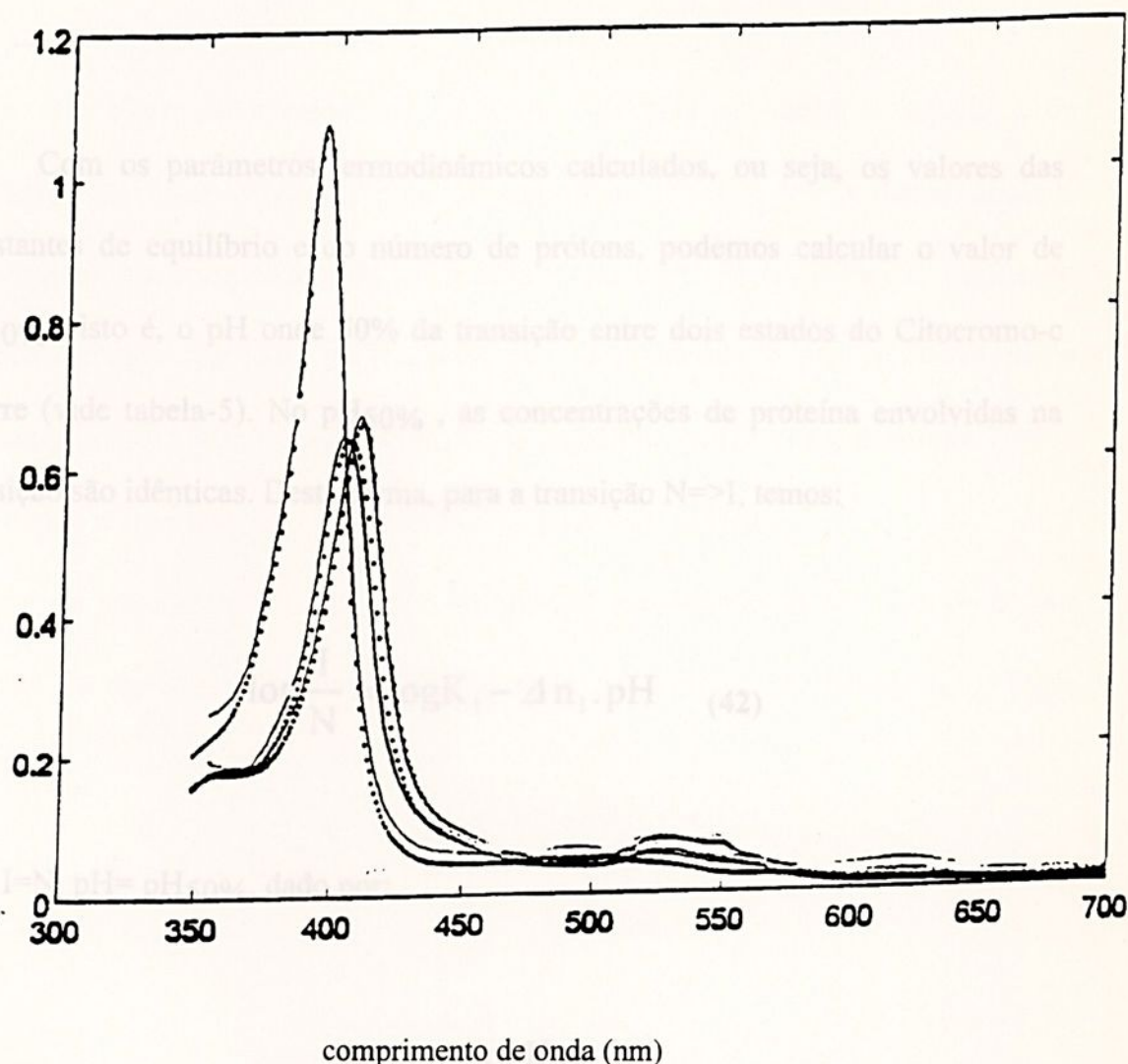


Fig-27: Reconstituição dos espectros originais (matriz D) das 3 espécies moleculares existentes em solução, após aplicarmos o método de mínimos quadrados a matriz A. Os espectros reconstruídos para a desnaturação em água (linha contínua) e na presença de 1,5 molal de sorbitol (pontos) são bastantes semelhantes, indicando que nenhuma espécie espectral nova é formada com a adição do soluto.

5.1.5.10-Equação de Linkage entre a ligação diferencial de prótons e água no Citocromo-c

Com os parâmetros termodinâmicos calculados, ou seja, os valores das constantes de equilíbrio e do número de prótons, podemos calcular o valor de $pH_{50\%}$, isto é, o pH onde 50% da transição entre dois estados do Citocromo-c ocorre (vide tabela-5). No $pH_{50\%}$, as concentrações de proteína envolvidas na transição são idênticas. Desta forma, para a transição $N \Rightarrow I$, temos:

$$\log \frac{I}{N} = \log K_1 - \Delta n_1 \cdot pH \quad (42)$$

com $I=N$, $pH = pH_{50\%}$, dado por:

$$pH_{50\%}^{NI} = \frac{\log K_1}{\Delta n_1} \quad (43)$$

o mesmo acontecendo para a transição $I \Rightarrow D$, onde o $pH_{50\%}$ corresponde a:



$$\text{pH}^{\text{ID}}_{50\%} = \frac{\log K_2}{\Delta n_2} \quad (44)$$

Na figura-28 apresentamos o gráfico de $\text{pH}_{50\%}$ versus o logaritmo da atividade de água ($\log[a_w]$) para as transições $\text{N} \Rightarrow \text{I}$ e $\text{I} \Rightarrow \text{D}$. Estes gráficos apresentam um comportamento linear cuja inclinações são coincidentes, indicando que o trabalho realizado na transição $\text{N} \Rightarrow \text{D}$ mantendo o $\text{pH}_{50\%}$ constante e variando a atividade de água é igual ao trabalho realizado na transição $\text{N} \Rightarrow \text{D}$ mantendo a atividade de água constante e variando o $\text{pH}_{50\%}$.

As constantes de equilíbrio envolvidas nas transições $\text{N} \Rightarrow \text{I}$ e $\text{I} \Rightarrow \text{D}$ são função da atividade de água e da atividade de prótons, ($K = K(a_H, a_w)$), logo, temos:

$$d \ln K = \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_H} \right)_{a_w} d \ln a_H + \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_w} \right)_{a_H} d \ln a_w \quad (45)$$

como $\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_H} \right) = -\Delta n_H$ e $\left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_w} \right) = -\Delta n_w$, corresponde respectivamente à

variação do número de prótons e a variação do número de moléculas de água envolvidas na transição representada por K , (Schellman, 1975; Tanford, 1968; Colombo et al, 1992); temos que:

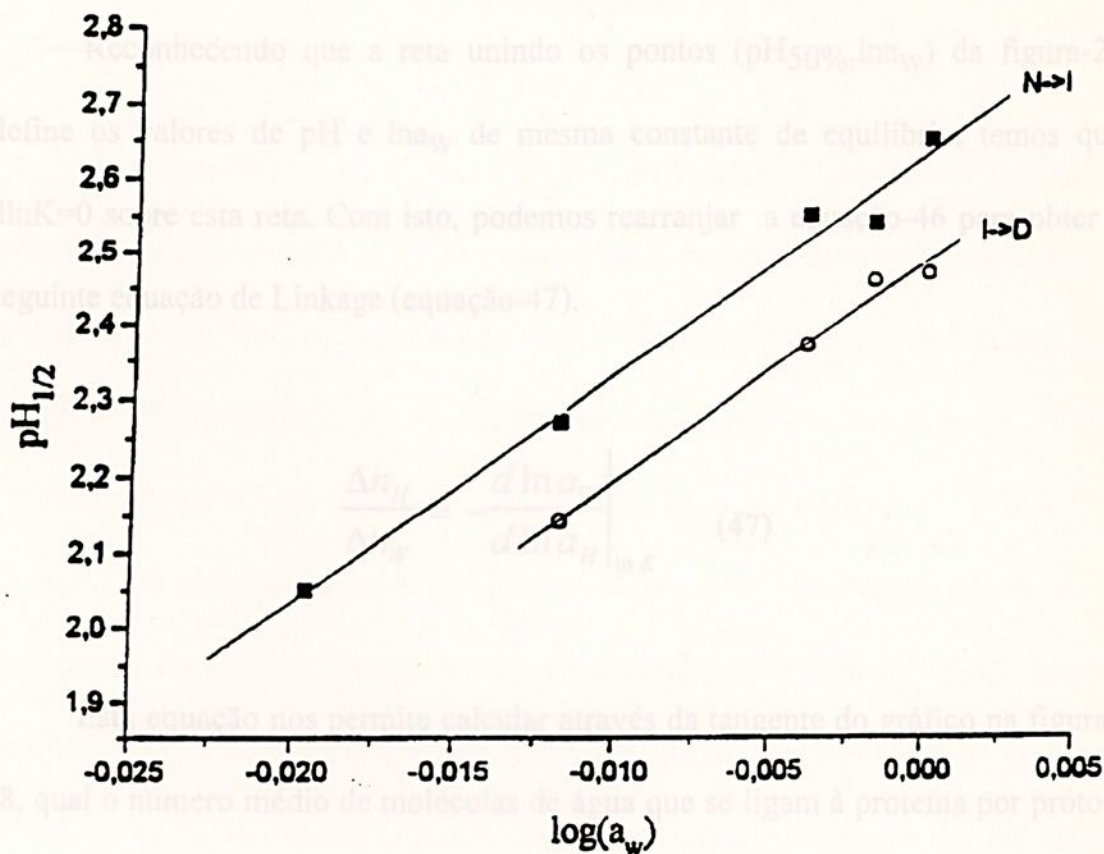


Fig-28: Este gráfico mostra como a energia livre de Gibbs ($\text{pH}_{50\%}$) varia linearmente com o logarítmo da atividade de água, tanto para a transição $\text{N} \Rightarrow \text{I}$ como para a transição $\text{I} \Rightarrow \text{D}$. O coeficiente angular destas retas nos fornece o número médio de moléculas de água que se ligam ao Citocromo-c por próton ligado.

Capítulo $-d \ln K = \Delta n_H \cdot d \ln a_H + \Delta n_W \cdot d \ln a_W \quad (46)$

6.1-Discussão

Reconhecendo que a reta unindo os pontos ($\text{pH}_{50\%}, \ln a_W$) da figura-28 define os valores de pH e $\ln a_W$ de mesma constante de equilíbrio, temos que $d \ln K = 0$ sobre esta reta. Com isto, podemos rearranjar a equação-46 para obter a seguinte equação de Linkage (equação-47).

$$\frac{\Delta n_H}{\Delta n_W} = - \left. \frac{d \ln a_W}{d \ln a_H} \right|_{\ln K} \quad (47)$$

Esta equação nos permite calcular através da tangente do gráfico na figura-28, qual o número médio de moléculas de água que se ligam à proteína por próton ligado. isto é,

$$\frac{\Delta n_H}{\Delta n_W} = \frac{1}{30}$$

A relação entre a variação de $\ln a_W$ e $\ln a_H$ é obtida da relação entre a variação da pressão osmótica da solução e sua respectiva variação do pH. Este resultado indica que para cada próton ligado no processo de desnaturação, 30 moléculas de água se ligam à proteína.



Capítulo-6

6.1-Discussão

Pelo menos um estado intermediário globular de Citocromo-c ao longo do processo de desnaturação ácida tem sido detectado por muitos pesquisadores desde a década de 70 (Stellwagen & Babul, 1975; Tsong, 1975; Dyson & Beattie, 1982), sendo o intermediário ácido do Citocromo-c o primeiro exemplo onde o termo “glóbulo derretido” (do inglês, molten globule) foi usado (Ohgushi & Wada, 1983). O estado de glóbulo derretido não está ainda definido estruturalmente, sendo que um grande número de proteínas sob várias condições e com diferentes graus de desestabilização e compactação se enquadram nessa categoria (Jeng & Englander, 1991). Desta forma, todo e qualquer estado intermediário estável existente entre as formas nativa e desnaturada de proteínas globulares é definido como estado de glóbulo derretido. Este estado intermediário é por sua vez estabilizado devido a ligação preferencial de ânions ao estado mais enovelado de diversas proteínas mantidas a pH desnaturante (Goto et al; 1990, Kuroda et al; 1992, Dyson; H.J. & Beattie: J.K; 1982; Jeng & Englander, 1991). De maneira geral, ânions como cloreto, brometo, iodeto, ferrocianeto etc..., se ligam preferencialmente ao estado intermediário que ao estado desnaturado de proteínas, estabilizando a forma de glóbulo derretido em relação ao estado desnaturado.



No presente trabalho, nós demonstramos que a adição de um soluto neutro, como sorbitol, à solução de Citocromo-c estabiliza seus estados mais compactos contra a desnaturação ácida.

Pudemos confirmar o efeito estabilizador do Sorbitol sobre os estados mais compactos do Citocromo-c fazendo a análise das curvas espectrais obtidas experimentalmente. Nossos experimentos mostraram que o Sorbitol aumenta a estabilidade da proteína em relação a desnaturação. Quando graficamos a fração de proteína no estado nativo (y_n) versus pH, na ausência e presença de Sorbitol, percebemos que, para um mesmo valor de pH desnaturante, a fração de proteína nativa (y_n) é maior na presença deste soluto (fig-5). Ademais, este efeito estabiliza os estados nativo e intermediário em relação ao desnaturado.

Ao observarmos o espectro de absorção óptico na região do visível do Citocromo-C, iremos perceber que na faixa de pH $< 2,5$ na ausência e presença de Sorbitol, ocorre o aparecimento de um ponto isobéstico (fig-1 e fig-3). Nos pHs maiores que 2,5, o espectro se torna difuso e não se percebe nenhum ponto isobéstico neste intervalo (fig-1 e fig-2). Em experimentos de renaturação de Citocromo-c por ligação de ânions a baixo pH, Goto e colaboradores (Goto et al, 1990) obtiveram o espectro de absorção óptica na região do visível na banda de Soret, onde aparece um ponto isobéstico bem definido entre 400 e 405nm, concordante com os nossos espectros. A existência de um ponto isobéstico indica que ocorre uma transição de 2 estados, mas como este se forma na região limitada



do intervalo de pH desnaturante (fig-3), podemos supor que a transição como um todo, ocorre do estado nativo para um estado intermediário e deste para o desnaturado. (V. et al, 1995).

A desnaturação do Citocromo-C ocorre devido a ligação de prótons aos grupos carboxila da proteína, produzindo desta forma, desequilíbrio entre cargas dos aminoácidos da cadeia. Como visto na fig-4, o aumento da repulsão eletrostática entre as cargas positivas começa a tornar-se significativo a valores de pH menores que 3, refletindo o pK dos grupos carboxila. O número de prótons responsáveis pela desorganização da cadeia na ausência e presença de 2,5 molal de Sorbitol foi calculado, graficando-se $\log K$ versus pH (fig-7) e segundo a equação-18. Nos gráficos da fig-7 é nítido, principalmente nos experimentos realizados na presença de sorbitol, a existência de dois processos; o primeiro processo ocorrendo em uma região de pH mais alto e o outro numa região de pH mais baixo. É interessante notar que abaixo deste pH no qual ocorre a mudança de inclinação (primeiro processo), a população de espécie nativa é praticamente nula (figura-26a), implicando que a transição ocorre entre as formas I e D e acima deste valor de pH (segundo processo), a população de espécie desnaturada é praticamente nula (figura-26c), indicando que a transição ocorre entre as formas N e I. Este valor de pH relativo as transições $N \Rightarrow I$ e $I \Rightarrow D$ na presença e ausência de sorbitol, corresponde ao valor do pH no pico da curva de distribuição da espécie intermediária sendo que o pH onde ocorre a transição na ausência de sorbitol é concordante com a transição $N \Rightarrow I$ e $I \Rightarrow D$



através de medidas de velocimetria ultrasônica e compressibilidade adiabática específica parcial em função do pH para a desnaturação do Citocromo-c em água (Chalikian, T.V; et al, 1995).

Os valores de $\log K$ e Δn_H de cada estágio da transição estão apresentados na tabela-2, na qual observamos que o valor da constante de desnaturação e do número de prótons diminuem consideravelmente na presença de sorbitol, o que significa que este soluto estabiliza os estados mais enovelados da proteína, concordante com o comportamento da constante de desnaturação que diminui na presença de sorbitol. Calculamos, também, os valores médios de $\log K \times \text{pH}$ em diversos comprimentos de onda cujo valor é $\log K = 7.67 \pm 0,7$ e $\Delta n = 3.19 \pm 0.2$ obtidos do ajuste dos pontos medidos na região de pH mais alto na ausência de sorbitol. Estes valores são comparáveis aos valores médios de $\log K = 6.81 \pm 0.3$ e $\Delta n = 3.06 \pm 0.1$ encontrados do ajuste dos pontos medidos na presença de sorbitol na região de pH mais baixo em diversos comprimentos de onda. Esta concordância sugere que o sorbitol estabiliza o primeiro estágio da desnaturação do Citocromo-c, isto é, o sorbitol estabiliza as estruturas mais compactas da proteína (estados nativo e intermediário) em relação ao estado desnaturado.

A fim de corroborarmos o efeito estabilizador do sorbitol sobre as formas mais compactas da proteína, graficamos a fração da proteína desnaturada em função da concentração molal de sorbitol mantendo o pH constante para os valores pH~2.2, pH~2.4 e pH~2.6. A proteína que se encontra desnaturada nesses valores de pH na



ausência de sorbitol, reenovela-se quando aumentamos a concentração de sorbitol mostrando, assim, que este soluto estabiliza as formas compacta do Citocromo-c (fig-8, fig-9 e fig-10, respectivamente).

Para podermos explicar a origem do aumento da estabilidade dos estados conformacionais compactos na presença de sorbitol, consideramos a priori, duas hipóteses:

- 1) A estabilização se deve a ligação diferencial do soluto aos diversos estados conformacionais da proteína, semelhante ao efeito de ânions (Goto et al, 1992).
- 2) A estabilização se deve ao efeito indireto do aumento da concentração do soluto em solução sobre a atividade da água, diminuindo-a; o que deslocaria o equilíbrio das formas conformacionais mais hidratadas para as formas menos hidratadas.

Nós testamos estas hipóteses investigando o comportamento do logaritmo da constante de equilíbrio aparente ($\log K_{ap}$) com o logaritmo da atividade do ligante ($\log[L]$). Quando o equilíbrio químico é deslocado por um efeito de ligação específico do ligante a sítios de alta afinidade, a análise de $\log K_{ap}$ em função do $\log[L]$ na região de saturação deve apresentar um comportamento linear cuja inclinação fornece a diferença do número de ligantes ligados aos estados enovelado e desenovelado (Schellman, 1975). Nossa análise no efeito da concentração do soluto no equilíbrio entre os estados nativo e desnaturado mostrou uma dependência linear da energia livre de Gibbs de enovelamento (que é proporcional a $\log K$) em função do logaritmo da atividade de água (que define o potencial químico da água)



e, a partir da inclinação, calculamos que há em torno de 180 moléculas de água envolvidas na transição glóbulo derretido/estado desnaturado (fig-13). O gráfico $\log K_{ap}$ versus $\log[\text{sorbitol}]$ (fig-12) não apresenta um comportamento linear, sendo que a inclinação aumenta cada vez mais conforme aumenta a concentração de sorbitol fazendo com que o número de ligantes tenda a infinito, o que não é compatível com a realidade, uma vez que a proteína esta se enovelando. Portanto, os nossos dados experimentais indicam que a estabilidade do Citocromo-c na presença de soluto se deve a variação da atividade de água e não a ligação preferencial do soluto.

Esse comportamento pode ser interpretado como sendo um efeito indireto do sorbitol sobre a proteína devido à sua influência na atividade de água.

Em trabalhos de variação volumétrica da transição de glóbulo derretido do ferriCitocromo-c de coração de cavalo, Foygel (Foygel et al, 1995) e colaboradores encontraram um número máximo de 594 moléculas de água entre as formas N e D, onde foi considerado que não há variação da densidade da proteína, pois se houver, o número de moléculas de água expulsas será muito menor. Estes resultados implicam uma concordância qualitativa com os valores por nós obtidos.

Com o objetivo de explorar estes resultados mais detalhadamente, usamos um procedimento de análise numérica que permite fazer uma avaliação mais criteriosa do processo de desnaturação estudado. Este procedimento é a técnica de decomposição de valor singular (SVD) (K.F.Vandegriff.; R.I.Shrager, 1994)



acompanhada de um método de ajuste não linear de várias variáveis. As rotinas para a implementação deste procedimento foram por nós implementadas e estão descritas e exemplificadas no texto deste trabalho. Esta técnica foi utilizada para determinar as constantes de equilíbrio, a variação do número de prótons e as curvas de distribuição de espécies moleculares encontradas em água e na presença de 0,2, 0,5, 1,5 e 2,5 molal de sorbitol em função do pH. Estas curvas demonstram que conforme aumentamos a concentração de sorbitol dificultamos o processo de desnaturação mostrando, desta forma, o efeito estabilizador do sorbitol sobre as estruturas mais compactas da proteína, o que está em concordância com nossos resultados obtidos a partir da dependência de $\log K$ com $\log a_w$. Através desta técnica, pudemos também identificar três espécies espectrais encontradas em solução.

Obtivemos os parâmetros termodinâmicos (constantes de equilíbrio e número de prótons) da transição nativo-intermediário e da transição intermediário-desnaturado sendo em média 2 prótons para a transição $N \Rightarrow I$ e 4 prótons para a transição $I \Rightarrow D$, totalizando 6 prótons responsáveis pela desestabilização do Citocromo-c entre as formas nativa e desnaturada. Este resultado concorda com o obtido na análise do comportamento de $\log K$ determinado em um comprimento de onda com o pH. Esta variação do número de prótons entre os estados N e D do Citocromo-c também foi estimado em 6,5 para experimentos de desnaturação térmica (Kuroda et al, 1992). Em experimentos de calorimetria, a variação do



número de prótons entre as formas N e D foi estimada em 5,6 (Pothekhin & Pfeil, 1989) e em experimentos de volumetria e compressibilidade adiabática de Citocromo-c, o valor foi estimado em 6 prótons (Chalikian, T.V; et al, 1995). Portanto, nossos resultados são bastante consistentes com os da literatura. Entretanto, só com estes experimentos da análise do efeito combinado de pH e atividade de água utilizando a técnica de SVD e o método de ajuste de funções não lineares de várias variáveis foi possível determinar isoladamente o número de prótons em cada transição. Calculamos o pH onde a concentração de proteína envolvida na transição são idênticos ($\text{pH}_{50\%}$), utilizando a equação-43 ($\text{N} \Rightarrow \text{I}$) e a equação-44 ($\text{I} \Rightarrow \text{D}$) e graficamos contra o logaritmo da atividade de água. Este gráfico apresenta um comportamento linear tanto para a transição $\text{N} \Rightarrow \text{I}$ como para a transição $\text{I} \Rightarrow \text{D}$. As retas formadas são paralelas com coeficiente angular próximo de 30, o que fornece uma variação do número de moléculas de água que se ligam a proteína 30 vezes maior que o número de prótons. Como no Citocromo-c se ligam 6 prótons, isto implica dizer que há por volta de 180 moléculas de água que estabilizam o estado desnaturado da proteína em relação ao seu estado nativo. Este número foi encontrado anteriormente graficando $\log K$ versus $\log a_w$ mantendo-se o pH constante, o que demonstra consistência entre os 2 métodos de análise utilizados.



A relação de Linkage (equação-47) e o gráfico de Linkage da figura-28, representam evidências extras para o papel desempenhado pela água de hidratação no processo de enovelamento protéico.



6.2-Conclusões

1. O Citocromo-c apresenta pelo menos 3 espécies moleculares em solução: a nativa (N), a intermediária (I) e a desnaturada (D).
2. A diferença do número de prótons que se ligam as formas nativa e intermediária são $2,10 \pm 0,05$ com um $\log K$ de $5,3 \pm 0,2$.
3. A diferença do número de prótons que se ligam as formas intermediária e desnaturada são $4,4 \pm 0,6$ com um $\log K$ de $10,5 \pm 1,6$.
4. A estabilização dos estados mais compactos não se deve a ligação do soluto aos diversos estados conformacionais da proteína e sim a diminuição da atividade de água, deslocando o equilíbrio conformacional das formas mais hidratadas para as formas menos hidratadas.
5. A relação entre número de prótons e número de moléculas de água envolvidas no processo de enovelamento do Citocromo-c é de 1próton para cada 30 moléculas de água ligadas ao polipeptídeo.



6.3 Contribuições deste trabalho

O problema fundamental no estudo de enovelamento de proteínas é saber:

1. Como o equilíbrio das forças que estabilizam a conformação nativa de proteínas está codificada na sequência de aminoácidos?
2. Quais são as forças que direcionam o enovelamento de proteínas?
3. Qual é a hierarquia das interações que estabilizam o estado nativo?

Na tentativa de responder as questões relativas ao problema de enovelamento de proteínas, diversos autores têm demonstrado que, em relação as forças que dirigem o colapso protéico, as pontes de hidrogênio internas à proteína e o efeito hidrofóbico são os principais responsáveis não só pela compactação da proteína mas também pela estabilização do estado nativo.

Este trabalho contribui para o entendimento das forças que dirige o enovelamento de proteínas mostrando que (juntamente com as pontes de hidrogênio e o efeito hidrofóbico que são os responsáveis pelo colapso protéico e estabilização da estrutura nativa) a água de hidratação tem uma contribuição preponderante no que se refere a estabilização de estruturas de proteínas e regulação do equilíbrio conformacional. Provavelmente, as variações de hidratação mensuradas neste trabalho reflatam uma porção importante da energia livre associada a formação de pontes de hidrogênio e a energia de transferência de grupos hidrofóbicos do solvente para o interior protéico, energia esta que define o efeito hidrofóbico.

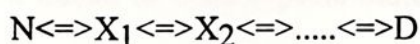


Apêndices

Apêndice A

O estado intermediário

Agora vamos supor uma reação geral de equilíbrio conformacional entre as formas nativa (N) e desnaturada (D) envolvendo estados intermediários. Esquematicamente temos:



onde cada X_i é um estado intermediário. A existência de estados intermediários entre as formas nativa e desnaturada faz com que a transição ocorra em dois ou mais estágios distintos. Devido a natureza cooperativa das interações que determinam a estrutura nativa, a maior parte destes estados intermediários apresentam relativamente pouca estabilidade (C.Tanford, 1968). Apesar disso, alguns estados intermediários podem ser suficientemente estáveis para representarem frações significativas em algum estágio da transição. Estas frações significativas de intermediários devem ocorrer ao longo da transição entre as espécies nativa e desnaturada, fazendo com que este processo se desenvolva em estágios separados, dentro de uma faixa limitada da variável experimental (pH, por exemplo).



Agora, se nós designarmos por $f_1, f_2, \dots, f_i$, o valor da propriedade física mensurável que caracteriza totalmente a molécula de proteína em alguns desses estados, sendo estes valores a média das propriedades características das várias espécies em solução, com pesos para respectiva frequência de ocorrência de cada espécie (C.R.Cantor; P.R.Schimmel, 1980), então o valor de f em algum estágio da transição será dado por:

$$f = y_0 \cdot f_0 + \sum_i y_i \cdot f_i + y_\infty \cdot f_\infty \quad (48)$$

onde o termo y representa a fração de cada espécie indicada pelos índices $i, 0$ e ∞ que designam, respectivamente, ao i -ésimo intermediário, a forma nativa e a forma desnaturada da proteína.

Substituindo o valor da fração de espécie nativa da relação de conservação:

$$y_0 + y_\infty + \sum_i y_i = 1 \quad (49)$$

na equação-48, obtemos:

$$f = f_0 + \sum_i y_i \cdot (f_i - f_0) + y_\infty \cdot (f_\infty - f_0) \quad (50)$$

Por questões de simplicidade nos cálculos, vamos supor que o processo de desnaturação protéica envolva um único estado intermediário ($i=1$); logo, podemos reescrever a equação-50 na forma:

$$f = f_0 + y_i \cdot (f_i - f_0) + y_\infty \cdot (f_\infty - f_0) \quad (51)$$

de onde obtemos

$$\frac{(f - f_0)}{(f_\infty - f_0)} = y_\infty + y_i \cdot \frac{(f_i - f_0)}{(f_\infty - f_0)} \quad (52)$$

A equação-52 pode ser representada:

$$y_{ap} = y_\infty + y_i \cdot d_i \quad (53)$$

sendo

$$y_{ap} = \frac{(f - f_0)}{(f_\infty - f_0)} \quad \text{definido como a fração aparente de proteína no estado}$$

$$\text{desnaturado e } d_i \text{ como sendo a relação } d_i = \frac{(f_i - f_0)}{(f_\infty - f_0)}.$$

Determinada a fração aparente de proteína no estado desnaturado, podemos calcular a constante de equilíbrio aparente ao longo da transição, que é expressa por:

$$K_{ap} = \frac{y_{ap}}{1 - y_{ap}} \quad (54)$$

Note que na expressão que define a fração aparente de proteína no estado desnaturado, os valores de f_0 e f_∞ são conhecidos devido unicamente as



conformações nativa (N) e desnaturada (D) existentes na etapa inicial e final do processo de desnaturação, onde somente nestas duas etapas, o valor da propriedade física f é praticamente constante. O valor de f_i não é conhecido, mas é possível extrapolá-lo na região da transição onde ocorre uma mudança de estágio. Esta mudança de estágio caracteriza a região em duas fases, sendo que cada fase é tratada como um modelo de desnaturação protéica entre dois estado conformacionais, a partir dos valores de f_0 , f_i e f_∞ .

Se inicialmente a transição ocorrer de um estado nativo (N) para um intermediário (X_i), dentro de uma faixa limitada de pH, tal que no extremo de pH inferior desta transição só exista a forma intermediária, então podemos dizer que os estados nativo e intermediário dominam neste intervalo de pH e, desta forma, a fração de desnaturado nesta região torna-se desprezível. Desta maneira então, a propriedade física f nesta primeira fase do processo de desnaturação será expressa por:

$$f = y_0 \cdot f_0 + y_i \cdot f_i \quad (55)$$

sendo a fração de proteína nativa expressa por

$$y_0 = 1 - y_i \quad (56)$$

podemos substituí-la na equação-55, de onde obtemos a fração aparente de proteína no estado intermediário, sendo mostrada a seguir



$$y_i = \frac{(f - f_0)}{(f_i - f_0)} \quad (57)$$

A segunda fase da transição ocorre entre os estados intermediário e desnaturado, numa faixa de pH menor que aquele na qual ocorre a transição nativo $\rightleftharpoons$ intermediário, onde nesta região de pH, os estados intermediário e desnaturado dominam.

Tanto para a primeira fase do processo de desnaturação que corresponde a transição nativo $\rightleftharpoons$ intermediário quanto para a segunda fase do processo correspondente a transição intermediário $\rightleftharpoons$ desnaturado, a constante de equilíbrio aparente ao longo de toda transição depende diretamente das constantes K_i e K_D , sendo K_i a constante de equilíbrio de um processo de transição que, supostamente, possua apenas os estados nativo e intermediário e K_D a constante de equilíbrio correspondente a uma transição onde supostamente possuísse só os estados nativo e desnaturado. Podemos verificar que K_{ap} está em função de K_i e K_D simplesmente relacionando a fração aparente de proteína no estado desnaturado (y_{ap}) mostrado na equação-53 com a fração de proteína no estado nativo (y_0) e relacionando a fração aparente de proteína no estado nativo ($1-y_{ap}$) com a fração de proteína no estado nativo (y_0) (Cantor, C.R; Schimmel, P.R; 1980) onde, rearranjando estas duas relações, obtemos



$$K_{ap} = K_D \cdot \left[\frac{\left(1 + d_i \cdot \frac{K_i}{K_D} \right)}{1 + (1 - d_i) \cdot K_i} \right] \quad (58)$$

Podemos notar que K_{ap} só será igual a K_D quando não for detectado nenhum estado intermediário ($K_i=0$). Caso seja detectado algum tipo de estado intermediário ($K_i \neq 0$), a constante de equilíbrio aparente estará em função das propriedades físicas mensuráveis relativa ao estado intermediário e da fração d_i .

Então, podemos concluir que, tanto no equilíbrio entre as formas nativa e intermediária quanto no equilíbrio entre as formas intermediária e desnaturada, está inserido um erro, onde o valor numérico da constante de equilíbrio aparente em cada fase da transição está contaminado com os parâmetros das propriedades físicas (d_i) e com as constantes de equilíbrio K_i e K_D .

Apêndice B

Rotinas de SVD e ajuste não linear

Rotinas desenvolvidas e utilizadas para a decomposição de valor singular e ajuste e minimização de função foram escritas com Matlab-386 for 80386-based MS-DOS Personal Computers, desenvolvida por The MathWorks, Inc. Estas rotinas foram designadas por SVDDemo e FITSVD2 e estão mostradas a seguir:

1) SVDDemo

ESCREVENDO UM DEMO TEST PARA SVD BUSCANDO A SOLUCAO FINAL DA SOMA DE DUAS GAUSSIANAS CUJAS FRACOES DEPENDEM DO PH

defina o intervalo de pH

```
ph=(6:-0.05:2)';
```

```
K1=10^8
```

```
K2=10^13
```

```
for i=1:length(ph)
```

```
    h(i)=10^(-ph(i));
```

```
    yn(i)=1/(1+K1*h(i)^2+K1*K2*h(i)^6);
```

```
    yi(i) = K1*yn(i)*h(i)^2;
```

```
    yd(i) = 1-(yi(i)+yn(i));
```

```
end
```

```
plot(ph,yn,ph,yi,ph,yd)
```

```
pause
```

```
lambda= (450:-1:350);
```

```
for k=1:length(lambda)
```

```
    N(k)=50*exp(-(((lambda(k)-418)/20)^2));
```

```
    D(k)=100*exp(-(((lambda(k)-395)/15)^2));
```

```
    I(k)=60*exp(-(((lambda(k)-400)/20)^2));
```

```
end
```



```

plot(lambda,N,lambda,l,lambda,D)
pause
gerar os espectros fake
for i = 1:length(ph)
    n(:,i) = yn(i)*N';
    mg(:,i) = yi(i)*l';
    d(:,i) = yd(i)*D';
end
abs = n + mg + d;
plot(lambda,abs)
pause
proceda a decomposicao do valor singular
[U,S,V]=svd(abs)

```

2) FITSVD2

ESTE EXEMPLO DEMOSTRA O AJUSTE DE UMA FUNÇÃO NÃO LINEAR PARA UM CONJUNTO DE DADOS. NÓS USAREMOS UMA FUNÇÃO CHAMADA FMINS QUE IMPLANTA O ALGORÍTIMO SIMPLEX DE NELDER-MEAD PARA A MINIMIZAÇÃO DE UMA FUNÇÃO NÃO-LINEAR DE VÁRIAS VARIÁVEIS.

Considere os seguintes dados:

pausa
 aperte alguma tecla para continuar

Dados Globais

Data = [V(:,1) V(:,2) V(:,3) h' ph]

Vamos plotar esses dados.

pausa
 aperte alguma tecla para plotar
 y = [Data(:,1) Data(:,2) Data(:,3)];
 hh = Data(:,4);
 plot(ph,y,'o'), título('dados'), pausa
 clc

Nós gostaríamos de ajustar a função



$y = c(1)*y_n(cteq1, cteq2, deltanh1, deltanh2) + c(2)*y_i(cteq1, deltanh1) + c(3)*y_d(cteq1, cteq2, deltanh1, deltanh2);$

$c(1)$, $c(2)$ e $c(3)$ correspondem aos espectros 1, 2 e 3 respectivamente para esses dados. Essa função apresenta 3 parâmetros lineares e 3 parâmetros não-lineares.

Para ajustar os dados dessa função, nós escrevemos uma função chamada

FITN_I_D, que nos dá os parâmetros não-lineares e os dados, retornam o erro no ajuste. Nós podemos então, atribuir para estimativas iniciais dos parâmetros não-lineares, e invocar **FMINs**:

lam = [10^9 1.5 10^12 5.5]';

lam = fmins('fitnmgd',lam) estou mantendo **lam** como variável: a primeira coluna é a **consteq1**; a segunda coluna é a **consteq2**; a terceira coluna é o **deltanh1**; a quarta coluna é o **deltanh2**;

pausa

aperte alguma tecla para iniciar o ajuste.

lam = fmins('fitnmgd',lam,10)

pausa

aperte alguma tecla para finalizar

Referências Bibliográficas

- Baum, J; Dobson, C.M; Evans, P.A; Hanley, C; (1989), **“Characterization of a partly folded protein by NMR methods: studies on the molten globule state of guinea pig α -lactoalbumin”**, Biochemistry, 28, 7-13.
- Cantor, C.R; Schimmel, P.R; **Biophysical Chemistry, The behavior of biological macromolecules**, part III, 1980.
- Chan, H.S; Dill, K.A; **“The Protein Folding Problem”**, (1 993), Physics Today, 24-32.
- Chang, R; (1990), **Physical Chemistry with applications to biological systems**, second edition, Macmillan Publishing CO.,INC.
- Cohn, E.J.; et al. (1933), J.Biol.Chem., 100, 33.
- Colombo, M. F., Rau, D.C., Parsegian, V. A. - **Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allosterism.**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.1, p. 10517-10520, Oct. 1994.
- Colombo, M.F; Rau, D.C; Parsegian, V.A; **“Protein Solvation in Allosteric Regulation:A Water Effect on Hemoglobin”**, (1 992), Science, Vol 256, 655-659.



- Colombo, M.F; Bonilla-Rodrigues, G.O; **"The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions"**; (1996), J.Biol.Chem; Vol 271, 4895-4899.
- Dill;K.A, **"Dominant Forces in Protein Folding"**, (1 990), Biochemistry, Vol 29.
- Doty, P; **"Proteins"**, (1 957), Scientific American.
- Dyson, H.J; Beattie, J.K; **Spin state and unfolding equilibria of ferricytochrome c in acidic solutions**; 1982, J.Biol.Chem.; **257**, 2267-2273.
- Eisenberg, D; Crothers, D; **"Physical Chemistry"**, (1 979), Vol 1.
- Ewing, G.W; (1972), **Métodos Instrumentais de Análise Química**, Ed. Edgard Blucher Ltda, Vol-1.
- Goto, Y; Fink, A.L; (1989), **"Conformational states of β -lactamase: molten globule states at acid and alkaline pH with high salt"**, Biochemistry, 28, 945-952.
- Goto, Y; Takahashi, N; Fink, A.L; **Mechanism of acid-induced folding of proteins**; 1990, Biochemistry, 29, 3480-3488.
- Henry, E.R; Hofrichter, J; **Singular Value Decomposition: Application to Analysis of Experimental Data**, 210, Methods in Enzymology.
- Iizuka, T; Yonetani, T; **"Spin Changes in Hemoproteins"**, (1 970), Advan.Biophys., vol 1, 157-182.



- Jeng; M.F; Englader; S.W., "Stable Submolecular Folding Units in a Non-compact Form of Cytochrome-c", (1 991), J.Mol.Biol., 221, 1 045-1 061.
- Jeng; M.F; Englader; S.W., Elöve, G.A; Wand, J; Roder, H; (1990), "Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2D NMR", Biochemistry, 29, 10433-10437.
- Kataoka; M; Hagihara; Y; Mihara; K; Goto; Y; "Molten Globule of Cytochrome-c Studied by Small Angle X-ray Scattering", (1 993), J.Mol.Biol., 229, 591-596.
- Kauzmann, W; (1 959), "Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation", Adv.Protein.Chem., 14, 1.
- Kim, P.S; Baldwin, R.L; (1982), "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", Annu.Rev.Biochem., 18, 459-489.
- Kuroda, Y; Kidokoro, S; Wada, A; Thermodynamic characterization of cytochrome c at low pH; 1992, J.Mol.Biol.; 223, 1139-1153.
- Kuroda; Y; "Residual Helical Structure in the C-Terminal Fragment of Cytochrome-c, (1 993), Biochemistry, 32, 1 219-1 224.
- Kuwajima, K; (1977), "A folding model of α -lactoalbumin deduced from the three state denaturation mechanism", J.Mol.Biol., 114, 241-258.
- Lehninger, A.L; (1 977), "Fundamentos de Bioquímica", Ed. Sarvier S.A.



- Levinthal, C; **"Are There Pathways for Protein Folding?"**, (1 968),
J.Chim.Phys., 65, 44-45
- Lopes, J.L; (1 993), **"A Estrutura Quântica da Matéria: do átomo pré-socrático as partículas elementares"**, Ed. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências e Ed. Erca.
- Matheus, C.K; Van Holde, K.E; (1 990), **"Biochemistry"**, the
Benjamim/Cummings Publishing Company Inc.
- Miranker, A; Radford, S.E; Karplus, M; Dobson, C.M; (1 991),
"Demonstration by NMR of Folding Domains in Lysozyme", Nature,
349, 633-636.
- Mirsky, A.E.; Pauling, L.; (1936), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A; 22,439.
- Ohgushi, M. & Wada, A.; **"Molten Globule State": a compact form of
globular proteins with mobile side chains**, 1983, Febs Letters, 164, 21-
24.
- Ohgushi, M. & Wada, A.; (1 984), **Liquid-Like State of Side Chains at the
Intermediate Stage of Protein Denaturation"**, Advan.Biophys., 18, 75-
90.
- Potekhin, S; Pfeil, W; (1989), **"Microcalorimetric studies of conformational
transition of ferricytochrome c in acid solution"**, Biophys.Chem, 34, 55-
62.



- Press, W.H; Brian, P.F; Teukolssy, S.A; Vetterling, W.T; **Numerical Recipes: The art of Scientific Computing**, 1987.
- Privalov, P.L.; Kechinashvili, N.N.; (1974), J.Mol.Biol; 86, 665.
- Raw, I; Colli, W; “**Fundamentos de Bioquímica**”, parte 1, EDART, (1967).
- Richards, F; “**The Protein Folding Problem**”, (1 991), Scientific American, 54-63.
- Roder, H.; Elöve, G.A.; Englander, W.; “**Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR**”, (1988), Nature, 335, 700-704.
- Russel, J.B; (1 982), “**Química Geral**”, Ed. Mcgraw-Hill do Brasil Ltda.
- Schellman, J.A; (1 975), “**Macromolecular Binding**”, Biopolymers, 14, 999-1018.
- Shrager, R.I; 1984, **Optical Spectra from Chemical Titration: An Analysis by SVD**, 5, SIAM J.Alg.Disc.Meth.
- Shrager, R.I; 1986, **Chemical Transitions Measured by Spectra and Resolved Using Singular Value Decomposition**, 1, Chemometrics and Intelligent Laboratory.
- Slabaugh, W.H; Parsons, T.D; **Química Geral**, 2ª edição, livros técnicos e científicos editora S/A.
- Smith, E.L; Hill, R.L; Lehman, I.R; Lefkowitz, R.J; Handler, P; White, A; (1983), “**Bioquímica: Aspectos Gerais**”, Ed. Guanabara-Koogan S.A.



- Stellwagen, E. & Babul, J.; **Stabilization of the globular structure of ferricytochrome c by chloride in acidic solvents**, 1975, *Biochemistry*, 14, 5135-5140.
- Tanford, C; 1968, **Protein Denaturation**, 23, *Advances in Protein Chemistry*, 121-282
- Timasheff, S; (1 992), *Biochemistry*, 31, 9 857-9 864.
- Tsong, T.Y, **An acid-induced conformational transition of denatured cytochrome c in urea and guanidine hydrochloride solutions**, 1975, *Biochemistry*, 14, 1542-1547.
- Udgaonkar, J.B; Baldwin, R.L; *Nature*, (1988), **"NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A"**, 335, 694-699.
- Vandegriff, K.D; Shrager, R.I; 1994, **Hemoglobin-Oxygen Equilibrium Binding: Rapid-Scanning Spectrofotometry and Singular Value Decomposition**, 232, *Methods in Enzymology*.
- Voet, D; Voet, J.G; (1 990), **"Biochemistry"**, Vol I.
- Volkenshtein, M.V; **"Biofisica"**, (1 985), Vol 1.
- Wu, H; (1 929), *Am.J.Physiol.*, 90, 562.
- Wu, H; Wu, D; (1 931), *Chin.J.Physiol*, 5, 369.
- Wyman, J; (1964), *Adv. Protein Chem.*; 19, 223,



